

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS JABOTICABAL**

**ANÁLISE FUNCIONAL DE UM CONSÓRCIO
MICROBIANO DE SOLO E PROSPECÇÃO DE GENES
ENVOLVIDOS NA DESCONSTRUÇÃO DA BIOMASSA**

Milena Tavares Lima

Tecnóloga em Biocombustíveis

2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS JABOTICABAL**

**ANÁLISE FUNCIONAL DE UM CONSÓRCIO
MICROBIANO DE SOLO E PROSPECÇÃO DE GENES
ENVOLVIDOS NA DESCONSTRUÇÃO DA BIOMASSA**

Milena Tavares Lima

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lucia Maria Carareto Alves

Coorientador: Prof. Dr. Alessandro de Mello Varani

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.

2014

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Milena Tavares Lima- Nascida em 19 de abril de 1990, em Taquaritinga, São Paulo, Brasil, filha de Márcio Francisco de Oliveira Lima e Maria Cristina da Rocha Tavares Lima. Tecnóloga em Biocombustíveis formada em fevereiro de 2012 pela Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal-FATEC. Ingressou em março do mesmo ano no Curso de Mestrado, área de concentração em Microbiologia Agropecuária, da Faculdade de Ciências Agrárias e veterinárias-UNESP, Campus de Jaboticabal.

“Eis que coloquei diante de você uma porta aberta
que ninguém pode fechar.” (Apocalipse 3:8)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir realizar mais um sonho;

A professora Lucia pela oportunidade e confiança depositada em mim para a realização deste projeto a orientação por uma excepcional professora, que compartilhou seu conhecimento e experiência;

Ao professor Alessandro pela coorientação e auxílio nas análises de bioinformática;

A professora Eliana pela oportunidade de trabalhar no laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas;

Aos estudantes, amigos e funcionários do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas pela ajuda, pela amizade e companheirismo;

Aos meus familiares pelo amor, carinho, apoio e amizade. Por sempre acreditarem em meus sonhos;

Ao meu noivo e melhor amigo Rafael com sua paciência, compreensão, otimismo e seu incentivo, sempre me fazendo acreditar que tudo daria certo;

A Capes pela concessão da bolsa de mestrado;

Enfim a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Página

RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	3
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
Material Lignocelulósico.....	4
Celulose.....	4
Hemicelulose.....	5
Lignina.....	6
Amido.....	7
Biomassa.....	8
Celulases.....	10
Degradação da Hemicelulose e Lignina.....	11
Amilases.....	12
Consórcios Microbianos.....	13
Sequenciadores de Nova Geração.....	14
MATERIAIS E MÉTODOS	15
Isolamento e Estabilização do Consórcio.....	15
Capacidade de Degradação Enzimática.....	16
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	17
Sequenciamento, Análise Evolutiva e Diversidade dos Genes.....	18
RESULTADOS	18
Capacidade de Degradação Enzimática.....	18
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	20
Análise dos Genes Relacionados à Desconstrução da Biomassa.....	21
Análise Evolutiva.....	25
Genes Relacionados com a Hidrólise do Amido.....	27
Genes Relacionados com a Hidrólise da Celulose.....	27
DISCUSSÃO	33
CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	37

ANÁLISE FUNCIONAL DE UM CONSÓRCIO MICROBIANO DE SOLO E PROSPECÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA DESCONSTRUÇÃO DA BIOMASSA

RESUMO- A desconstrução da lignocelulose pela ação dos microrganismos é um processo essencial para o ciclo do carbono e para a conversão da biomassa em combustíveis e produtos químicos. A extensa variedade de carboidratos encontrados na parede celular das plantas requer uma multiplicidade de enzimas para sua degradação. O objetivo desse trabalho foi isolar um consórcio microbiano de amostra de solo, contendo bagaço de cana-de-açúcar em decomposição, que fosse eficiente na desconstrução da biomassa e sequenciar o DNA total para isolamento de genes envolvidos na desconstrução da lignocelulose. O consórcio microbiano degradador de biomassa foi obtido através de amostra de solo cultivado com cana de açúcar em decomposição e mostrou ser eficiente na degradação de um potencial substrato lignocelulósico, o bagaço de cana. Para se comprovar a eficiência na liberação de açúcar da biomassa com potencial de ser usado em processos fermentativos foi realizada a análise cromatográfica de açúcares, quando esse conjunto de microrganismos foi cultivado em meio contendo apenas bagaço de cana como fonte de carbono. Esse ensaio mostrou a liberação de glicose no meio de cultivo. Do mesmo modo, foram realizados testes microbiológicos que mostraram a produção de enzimas hidrolíticas como celulasas e amilases. O sequenciamento do DNA total extraído das amostras do consórcio cultivadas em meio com celulose possibilitou a identificação dos microrganismos presentes no consórcio. Através dessas sequências também foi realizada a prospecção de genes envolvidos na degradação da biomassa e nessa avaliação foram encontrados os genes das enzimas alfa amilase, glucoamilase, alfa glucosidase, beta glucosidase e endoglucanase, enzimas de suma importância no processo de desconstrução da lignocelulose. Todos os genes das enzimas foram similares a sequências da bactéria *Burkholderia sp SJ98*, que já foi descrita na literatura como sendo um microrganismo eficiente na biodegradação de diferentes compostos. Desta forma no presente trabalho ficou demonstrado que o consórcio isolado é eficaz na desconstrução de material lignocelulósico liberando da biomassa açúcares que podem ser utilizados em processos fermentativos. Fundamentalmente a desconstrução do bagaço da cana observado esta sendo realizada através de enzimas hidrolíticas de organismos como a *Burkholderia sp SJ98*. Concluindo, esta obra mostrou um resultado significativo para a desconstrução de materiais lignocelulósicos por um consórcio microbiano, com potencial para novas aplicações biotecnológicas especialmente voltadas ao melhor aproveitamento da biomassa lignocelulolítica da cana de açúcar.

Palavras-chaves: Bagaço de cana-de-açúcar, Enzimas hidrolíticas, Lignocelulose

FUNCTIONAL ANALYSIS OF A MICROBIAL CONSORTIUM OF SOIL AND PROSPECT OF GENES INVOLVED IN BIOMASS DEGRADATION

ABSTRACT-The deconstruction of lignocellulose by the action of microorganisms is an essential process for the carbon cycle and the conversion of biomass into fuels and chemicals. A wide variety of carbohydrates found in plant cell walls requires a multitude of enzymes for their degradation. The aim of this study was to isolate a microbial consortium of soil sample containing bagasse cane sugar decomposition, which is efficient in the deconstruction of biomass and the total DNA sequence for the isolation of genes involved in the deconstruction of lignocellulose. The biomass degrading microbial consortium was obtained from soil sample cultivated with sugarcane decomposed and shown to be efficient in the degradation of a potential lignocellulosic substrate, sugarcane bagasse. To prove the efficiency of the release of sugar from the biomass potential to be used in fermentation processes chromatographic analysis of sugars was performed when the number of microorganisms were cultivated only in a medium containing cane bagasse as a source of carbon. This test showed the release of glucose in the culture medium. Similarly, microbiological tests have shown that the production of hydrolytic enzymes such as cellulases and amylases have been made. The sequencing of total DNA extracted from the samples cultured in medium with cellulose consortium made possible the identification of microorganisms present in the consortium. Through these sequences to search for genes involved in the degradation of biomass and this assessment was also carried the genes of the enzymes alpha amylase, glucoamylase, alpha- glucosidase, beta glucosidase and endoglucanase enzymes of paramount importance in the process of deconstruction of lignocellulose found. All genes of the enzymes were similar to sequences of the bacterium *Burkholderia* sp SJ98, which has been described in the literature as an efficient organism in biodegradation of different compounds. Thus in the present study demonstrated that the consortium alone is effective in releasing deconstruction of lignocellulose biomass sugars that can be used in fermentation processes. Fundamentally deconstruction of bagasse observed this being accomplished by hydrolytic enzymes of organisms such as *Burkholderia* sp SJ98. In conclusion, this work showed a significant deconstruction of lignocellulosic by a microbial consortium, with the potential for new biotechnological applications especially aimed at better utilization of biomass lignocelulolítica sugarcane materials result.

Keywords: marc cane sugar, hydrolytic enzymes, Lignocellulose

I. INTRODUÇÃO

A capacidade de converter a celulose da parede celular vegetal em substrato simples é de importância crucial para o ciclo do carbono (HERVE et al., 2010). Consórcios bacterianos podem ser eficientes na desconstrução e liberação de açúcares que possam ser utilizados nos processos fermentativos. A extensa variedade de carboidratos encontrados na parede celular das plantas requer uma multiplicidade de enzimas para sua degradação. Um dos carboidratos mais importantes a ser hidrolisado é a celulose. A celulose é o biopolímero renovável mais abundante na terra e é o principal polímero constituinte da parede celular das plantas sendo constantemente ressintetizado pela fotossíntese (ARISTIDOU; PENTILLA, 2000). No entanto, esse material celulósico é notoriamente difícil de ser hidrolisado enzimaticamente porque contém ligações glicosídicas resistentes (HIMMEL et al., 2007). O amido assim como a celulose é um composto importante a ser hidrolisado ele é o maior polissacarídeo de reserva das plantas e o segundo mais abundante depois da celulose (SUN et al., 2010). Constituído de um arranjo de dois carboidratos a amilose e amilopectina, o amido não consegue ser hidrolisado pela maioria das enzimas oxidantes sendo necessário um processo de sacarificação para hidrolisar o polissacarídeo em monossacarídeo (YAMAMOTO et al., 2013).

Atualmente esses dois compostos de origem vegetal possuem grande aplicação tecnológica, enquanto o amido é usado como importante fonte energética animal e vegetal, a celulose é uma importante fonte de energia, principalmente na produção de biocombustíveis. Entretanto, uma das principais barreiras para a produção em larga escala de biocombustíveis e produtos químicos oriundos de material celulósico, que poderiam reduzir a dependência mundial do petróleo, é a capacidade de desconstruir eficientemente a biomassa em fonte de carbono fermentável, tais como glucose e xilose (WONGWILAIWALIN et al., 2013).

Material celulósico ou lignocelulósico é um termo genérico para descrever os constituintes principais da biomassa na maioria dos vegetais, ou seja, a celulose, a hemicelulose e a lignina, cuja composição depende não apenas do tipo de vegetal, mas também de condições de crescimento, da parte da planta escolhida, do tempo de colheita, etc. (OGEDA; PETRI, 2010).

O processo de hidrólise biológica desses polímeros é conduzido por enzimas altamente específicas, liberando açúcares redutores incluindo a glicose. Existem enzimas comerciais que degradam a lignocelulose em monômeros, estas foram desenvolvidas principalmente para as indústrias de papel, celulose e de alimentos (JENSEN; HARDIN; CLARKE, 2009). Embora essas enzimas comerciais sejam eficientes, elas possuem restrições que incluem desde a exigência de grandes quantidades e altas concentrações, além de precisarem para sua ação de temperaturas elevadas e pH extremo, o que torna o processo muito mais caro (MERINO; CHERRY, 2007; SHI; SHARMA-SHIVAPPA; CHINN, 2009). Além disso, as preparações comerciais não contêm todas as enzimas sinérgicas incluindo as enzimas ligninolíticas que são necessárias para tornar a celulose mais acessível à hidrólise.

Concluindo, o fator que impede a emergência de uma indústria que converta biomassa lignocelulósica em energia não é o custo ou disponibilidade da matéria prima e sim a ineficiência do processo e seu alto custo de conversão da biomassa em açúcar fermentescível (PESSI, 2009).

Atualmente o processo da desconstrução da lignocelulose para liberação de açúcares utilizáveis em processos fermentativos é responsável por um aumento de 100% no valor final do produto, eliminando assim a vantagem econômica de sua utilização sobre outras fontes de energia. Portanto, todos os benefícios potencialmente gerados pela produção em larga escala de energia derivada de biomassa lignocelulósica dificilmente serão alcançados, a menos que novas tecnologias permitam a obtenção de açúcares destes estoques de uma maneira economicamente mais competitiva (LINDY et al., 2008), como por exemplo, sistemas enzimáticos eficientes.

Considerando tais problemas é interessante a pesquisa de processos que possam proporcionar a desconstrução estrutural da biomassa com a transformação dos açúcares liberados em moléculas capazes de serem fermentadas. Nesse sentido dois caminhos podem ser seguidos: um consiste na utilização de microrganismos transformados geneticamente e outro na associação de microrganismos, onde cada espécie realiza uma função biológica (consórcios microbianos).

Os consórcios microbianos podem ser utilizados para desconstrução parcial da biomassa e liberação de açúcares que possam ser utilizadas nos processos fermentativos. Sendo assim essa possibilidade técnica de degradação enzimática de biomassa para liberação de açúcares fermentáveis está sendo amplamente estudada.

Em consórcios microbianos existem diferentes comunidades microbianas que podem ser identificadas para a degradação composta de uma matéria. Essas comunidades podem ser caracterizadas por diversos processos e servir como fonte alternativa de enzimas degradadoras de biomassa (WETLER-TONINI; REZENDE; GRAVITOL, 2011), uma maneira de caracterizar essas comunidades por técnicas independentes de cultivo, a metagenômica e procurar nesse conjunto de genomas genes importantes para serem usados na transformação de microrganismos e produção de enzimas úteis na desconstrução da biomassa.

II. OBJETIVOS

Avaliar um consórcio bacteriano de solo contendo bagaço de cana-de-açúcar quanto à capacidade de degradação de material lignocelulósico e liberação de açúcares fermentáveis. Determinar por sequenciamento, genes de interesse biotecnológico para degradação da biomassa.

III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Material Lignocelulósico

Material lignocelulósico ou biomassa lignocelulósica é uma fonte de matéria prima renovável que está sendo amplamente estudada. Vásquez et al. (2007) já reportaram a tendência por processos biotecnológicos que permitam a utilização de biomassas residuais de composição lignocelulósica. Essas matérias primas são provenientes de resíduos agroindustriais como o sabugo e palha de milho, o bagaço de cana-de-açúcar, caule e cascas, resíduos sólidos urbanos (papel e papelão, lixo de jardim) e da indústria de papel e celulose (JEFFRIES, 1994).

O material lignocelulósico é constituído por estruturas organizadas e fibrosas, compostas principalmente por celulose, hemicelulose e lignina.

A partir da biomassa podem ser produzidos combustíveis sólidos líquidos e gasosos. Assim, independentemente da forma e da fonte de energia utilizada, ela tem se mostrado, ao longo de décadas, um dos mais determinantes fatores de desenvolvimento econômico e social dos países industrializados e, por extensão, se tornando igualmente determinante em muitos aspectos da vida econômica e social.

3.2 Celulose

A celulose é o principal constituinte da lignocelulose. Ela possui uma estrutura relativamente simples, sendo formada por monômeros de D-glicoses unidos por ligações glicosídicas do tipo β -1,4, como mostra a Figura 1. Cada resíduo de glicose tem uma orientação de 180° em relação ao resíduo adjacente. Esta conformação resulta em uma cadeia molecular com estruturas fibrosas e cristalinas de alta resistência à tensão.

A estrutura cristalina da celulose está disposta em glicoses unidas por ligações de hidrogênio tanto intra quanto intercadeias de celulose. As camadas

adjacentes de celulose são unidas por forças de Van der Waals. Isso resulta em uma estrutura compacta, capaz de impedir o acesso de enzimas e até mesmo de moléculas pequenas, como a água. As regiões cristalinas da celulose são intermediadas por regiões menos compactas, chamadas amorfas, em que os polímeros de celulose apresentam maior distância um dos outros. Além dessas regiões, as fibras de celulose apresentam irregularidades, falhas e micro poros que aumentam a superfície de contato da celulose e permite o acesso de moléculas de água e outras moléculas maiores, como enzimas celulolíticas (ALVES, 2011).

Estas características, juntamente com o envoltório de lignina, conferem à macromolécula celulose grande resistência à hidrólise, o que representa um grande desafio para a utilização dos materiais lignocelulósicos em aplicações biotecnológicas, como a produção de etanol de segunda geração (ARANTES; SADDLER, 2010).

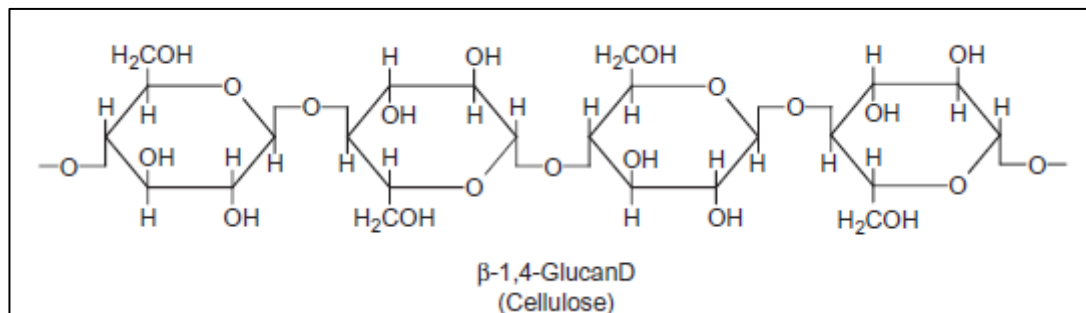


Figura 1. Estrutura química da celulose

3.3 Hemicelulose

A Hemicelulose é o segundo maior constituinte da lignocelulose, responsável por 15-30% da parede celular da planta é um complexo altamente ramificado e tem uma estrutura aleatória e amorfa, que consiste em cadeias ramificadas de açúcares como a D-xilose e L-arabinose, mas também apresenta D-manose, D-galactose, D-glicose, 4-O-metil-glicurônico, D-galaturônico e ácido D-glicurônico ligados entre si por ligações glicosídicas β -1,4 e, ocasionalmente, β -1,3. A composição deste polímero, entretanto, é dependente da planta do qual ele se originou. A principal

diferença com a celulose é a presença de cadeias laterais curtas compostas por diferentes açúcares que variam de acordo com a fonte de xilana. A Figura 2 mostra a estrutura da molécula de hemicelulose. (PÉREZ et al., 2002; ABDEL-HAMID; SOLBIATI; CANN, 2013)

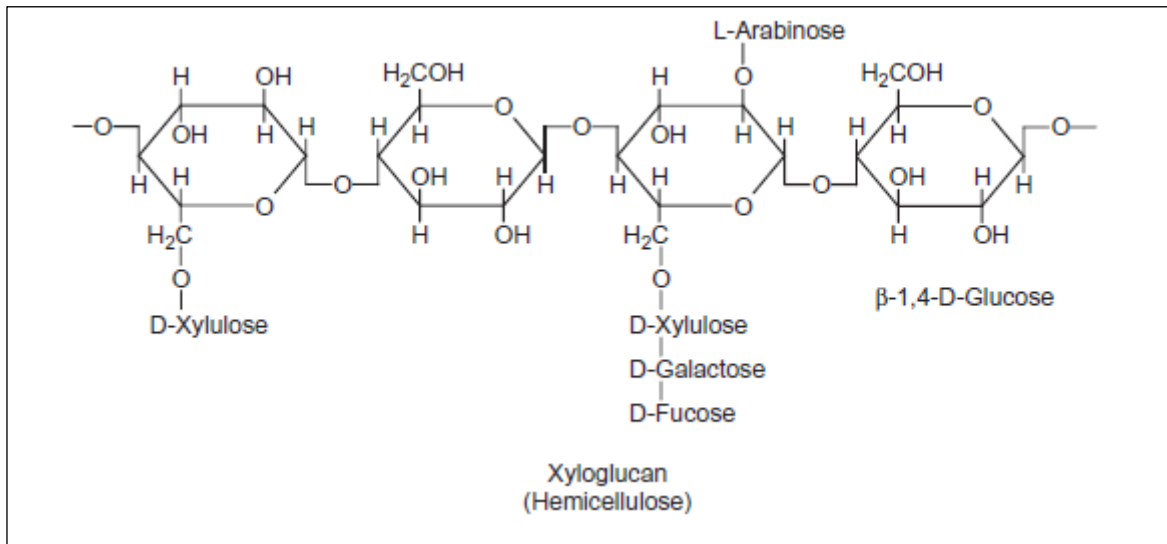


Figura 2. Estrutura geral da molécula de hemicelulose

3.4 Lignina

A molécula de lignina não está relacionada a moléculas simples de açúcar por isso não é pretendida para a produção de bioetanol por rotas fermentativas, mas ela desempenha um papel fundamental para o sucesso da tecnologia de hidrólise, uma vez que dificulta o acesso à celulose.

A lignina pertence a uma família de macromoléculas complexas e altamente ramificadas de cadeias alifáticas e aromáticas (NEVELL; ZERORIAN, 1985). Ela é um constituinte integral da parede celular dos vegetais, sendo uma matriz rígida em torno das fibras de celulose/hemicelulose caracterizando assim suporte estrutural, impermeabilidade e resistência contra a degradação microbiana (BURTON; GIDLEY; FINCHER, 2010). Além de ser um heteropolímero amorfo, não solúvel em água e óticamente inativa, a lignina apresenta forma tridimensional e consiste de unidades

de fenilpropano unidas por diferentes ligações, a Figura 3 mostra a estrutura da lignina (PÉREZ et al., 2002).

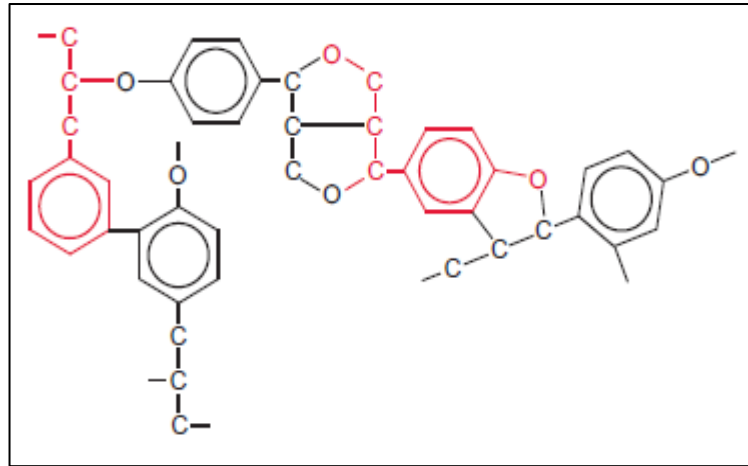


Figura 3. Estrutura da lignina

3.5 Amido

O amido é um dos polímeros mais abundantes na natureza e depois da celulose, é o principal carboidrato sintetizado pelas plantas. O amido que é uma substância de reserva para a maioria das plantas superiores, é composto inteiramente de D-glicose, esse polímero constitui também uma fonte de energia essencial para muitos organismos, inclusive o homem. O amido presente nos vegetais pode ser hidrolisado, gerando glicose, maltose, e xaropes de oligossacarídeos de menores massas moleculares, que por sua vez podem ser utilizados para a produção de outros compostos químicos e também como substratos em fermentações (VIEILLE; ZEIKUS, 2001).

No amido os resíduos de glicose se organizam em dois tipos de polímeros, a amilose e a amilopectina. A amilose é essencialmente formada por cadeias lineares helicoidais constituídas de unidades de glicose unidas por ligação glicosídica α -1,4 enquanto que a amilopectina é formada por uma estrutura altamente ramificada, possuindo cadeias de resíduos de glicose em ligação glicosídica α -1,4, das quais partem ramificações com ligações α -1,6 a cada série de 25 resíduos de glicose

(LASZLO et al., 1986). A Figura 4 mostra a estrutura da amilose e da amilopectina e a disposição dessas moléculas no amido.

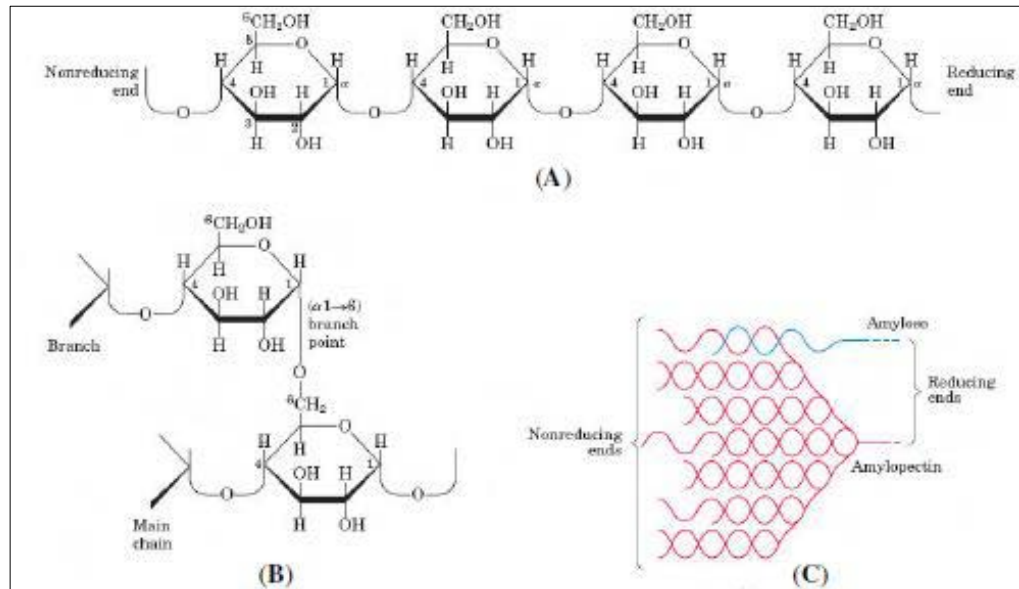


Figura 4. (A) pequeno segmento de amilose. (B) Estrutura da amilopectina mostrando um ponto de ramificação (C) Disposição das moléculas de amilose e amilopectina no grão de amido (LEHNINGER et al., 2002)

3.6 Biomassa

Pode ser considerada biomassa todo recurso renovável que provém de matéria orgânica, de origem vegetal ou animal, tendo por objetivo principal a produção de energia. Entre as biomassas de cultivos agrícolas, o bagaço e a palha de cana são considerados algumas das mais importantes no contexto da agricultura brasileira.

A biomassa também provém de restos de madeira, lenha, carvão vegetal, dejetos de animais papel e papelão, etc. Ela constitui a maior fonte de carboidratos naturais do mundo e a dificuldade de converter a biomassa lignocelulósica em insumos químicos é atribuída às suas características químicas e morfológicas. Esses materiais lignocelulósicos são constituídos de fibras de celulose envolvidas em uma matriz amorfa de polioses e lignina. Essa matriz amorfa age como uma barreira

natural ao ataque de microrganismos e/ou enzimas e torna esses materiais estruturalmente rígidos e pouco reativos (FENGEL, 1989).

O bagaço da cana-de-açúcar é a fração de biomassa resultante após os procedimentos de limpeza, preparo e extração do caldo de cana. Não é uma biomassa homogênea, apresentando variações em sua composição, assim como na sua estrutura morfológica, em função dos procedimentos de corte no campo e no processamento industrial.

Mesmo após a extração da sacarose e outros nutrientes, o bagaço ainda contém muita matéria orgânica, sendo assim uma possível fonte de mais energia e de outros produtos de química fina. Atualmente o bagaço da cana-de-açúcar é reaproveitado principalmente para gerar energia elétrica, mas também é usado na incorporação ao solo ou como parte integrante da dieta bovina. Mesmo sendo utilizado para estes fins ainda há um grande excedente de bagaço que pode ser utilizado para produção de diversos bens da sociedade. Algumas alternativas para sua utilização como matéria-prima são a produção de etanol, papel e celulose, revestimentos acústicos, madeira prensada, forragem para agricultura, álcool, alcaloides e enzimas (Carvalho, 2005).

O álcool obtido através do bagaço é conhecido como bioetanol ou etanol de segunda geração e vem sendo produzido pela hidrólise e fermentação de materiais lignocelulósicos desde o fim do século XIX, mas somente nos últimos 20 anos essa tecnologia tem sido proposta para atender o mercado de combustíveis.

As tecnologias para a obtenção de etanol de segunda geração envolvem a hidrólise dos polissacarídeos da biomassa em açúcares fermentáveis e sua posterior fermentação. Para executar essa tarefa, o processo de hidrólise utiliza tecnologias complexas e multifásicas, com base no uso de rotas ácidas e/ou enzimáticas para a separação dos açúcares e remoção da lignina (PEREIRA et al., 2008).

Os principais programas de pesquisa e desenvolvimento são conduzidos nos Estados Unidos e na Europa, basicamente em escalas experimentais de produção, mas seu sucesso poderia transformar o bioetanol em um biocombustível passível de ser produzido em quase todas as regiões do mundo, aproveitando a alta disponibilidade de resíduos orgânicos de diversas fontes (MACEDO et al., 2008).

3.7 Celulases

A utilização de enzimas nas indústrias é indispensável, pois através dela pode-se melhorar a qualidade de um produto ou tornar mais fácil a obtenção do mesmo. Essa capacidade deve-se ao fato de que as enzimas atuam sobre as substâncias que compõem um determinado produto, sendo que, para cada substância, existem enzimas específicas que a degradam (LIMA et al., 2001).

As enzimas responsáveis pela hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica são definidas pelo “Carbohydrate Active Enzymes Database” (CAZY) (CASTRO et al., 2010) como Glicosil Hidrolases (GH). As Glicosil Hidrolases são enzimas que hidrolisam carboidratos fazendo parte do grupo de enzimas que reconhecem e clivam as ligações β 1-4 entre as cadeias de glicose.

Sistemas enzimáticos envolvidos na degradação da celulose podem compreender tanto celulases livres e/ou complexos chamados celulosomos, atuando sinergicamente na hidrólise da molécula. Os celulosomos são protuberâncias encontradas fora da célula, na parede celular de algumas bactérias celulolíticas. Esta estrutura é complexa e dinâmica e auxilia a interação sinérgica entre as enzimas. Tipicamente encontrados em ambientes anaeróbios, estes complexos apresentam algumas vantagens para a bactéria como oferecer uma concentração significativa de enzimas na superfície da molécula de celulose e permitir ao microrganismo o acesso rápido aos produtos da hidrólise (BAYER et al., 1994; HENRISSAT; DAVIES, 1998; SCHWARZ, 2001).

As celulases são enzimas que agem em conjunto e podem ser separadas em três classes: endoglucanases (EC 3.2.1.4), exoglucanases (EC 3.2.1.91) e β -glucosidase (EC 3.2.1.21) (LYND, 2002).

As endoglucanases (EC 3.2.1.4) catalisam a hidrólise interna de ligações β -1,4-D- glucosídicas da celulose, gerando oligossacarídeos de vários tamanhos e, conseqüentemente, novas extremidades da cadeia. As exoglucanases (EC 3.2.1.91) atuam nas extremidades redutoras e não redutoras da cadeia de celulose liberando principalmente celobiose, além de glicose e celotriose (BISCHOFF, 2006).

Já as β -glucosidasas (EC 3.2.1.21) são responsáveis pela hidrólise da celobiose liberada no meio reacional, em moléculas de glicose.

As celulasas são empregadas em diversos setores da indústria, como na utilização no processamento de algodão, reciclagem de papel, formulação de detergente, extração de sucos, bioestonagem e biopolimento de tecidos, produtos dermatológicos, pigmentos, extração de óleo vegetal, produção de álcool, como adjuvante para malte na fabricação de cerveja, sendo também utilizadas como constituintes de rações animais e em indutores de silagem. As enzimas celulasas são atualmente a terceira maior indústria de enzimas em todo o mundo e acredita-se que, caso venham a ser empregadas na produção de biocombustíveis, passem a ocupar a primeira posição (Wilson, 2009).

3.8 Degradação da Hemicelulose e Lignina

Na degradação da hemicelulose a xilana é um dos principais carboidratos encontrados. Ela pode realizar um papel significativo na integridade da estrutura da parede celular através de associações covalentes e não covalentes. A degradação da xilana envolve a ação de pelo menos dois grupos de enzimas, endo-1,4- β -xilanasas (EC 3.2.1.8) e β -D-xilosidades (EC 3.2.1.37) atuando na cadeia principal. Dependendo do tipo de xilana, podem ser também necessárias enzimas auxiliares para a hidrólise das cadeias laterais, como α -D-glucoronidasas (EC 3.2.1.131) e acetil-xilana-esterases (EC 3.1.1.72) (JEFFRIES, 1994; SAHA, 2003; ARO; PAKULA; PENTILLA 2005).

As xilanases possuem importantes aplicações biotecnológicas tais como: processos de branqueamento de polpa kraft na indústria do papel (Dhillon, 2000), na maceração de matérias vegetais, na liquefação de mucilagem do café, na recuperação de óleo de minas subterrâneas, na extração de aromas e pigmentos e também na panificação (COUGHLAN E HAZEWOOD, 1993).

Enzimas como lacase (EC 1.10.3.2), manganês-peroxidase (MnP) (EC 1.11.1.13) e lignina-peroxidase (LiP) (EC 1.11.1.14), atuam na degradação da lignina e detoxificam o meio dos metabólitos gerados durante sua degradação (CARVALHO et al., 2009). A degradação e/ou biotransformação da lignina permite que as enzimas hidrolíticas como as xilanases e celulasas atuem nas fontes de

carbono liberando glicose e xilose, que podem ser utilizadas em diversos processos microbiológicos que necessitam de uma fonte de carbono (AGUIAR-FILHO, 2008; ALEXANDRINO et al., 2007; GOMES, 2007). Essas enzimas são utilizadas principalmente na indústria de alimentos, no tratamento de efluentes de esgoto, na indústria têxtil e na indústria farmacêutica.

3.9 Amilases

As amilases têm ganhado um papel importante na conversão do amido em álcool utilizando-se, simultaneamente, a sacarificação e a fermentação. A aplicação das amilases na produção de etanol tem solucionado, em parte, os problemas que alguns países apresentam em função da escassez de reservas de combustível (SINGH et al., 1995). As amilases estão entre as primeiras enzimas conhecidas do homem, assim como todas outras enzimas são denominadas de acordo com o substrato sobre o qual atuam, portanto, o termo amilase indica a ação sobre o amido (amilo), que contém dois tipos de polissacarídeos: a amilose (15-20%) e a amilopectina (80-85%) (HARGER, 1982).

As amilases podem ser divididas em 4 tipos de acordo com a sua atividade catalítica:

I. As endoamilases, que são enzimas capazes de clivar as ligações glicosídicas α -1,4 presentes no interior das cadeias de amilose e amilopectina, tendo como produto final oligossacarídeos de tamanhos variados;

II. As exoamilases, que hidrolisam ligações glicosídicas α -1,4 externas ou ambas ligações α -1,4 e α -1,6 glicosídicas, produzindo somente glicose;

III. Enzimas desramificadoras, que clivam exclusivamente ligações glicosídicas α -1,6;

IV. As transferases, que quebram ligações glicosídicas α -1,4 da molécula doadora e transferem parte do doador para um aceptor glicosídico com a formação de uma nova ligação glicosídica.

As α amilases (1,4- α -glucan-4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.1.) são enzimas que quebram as ligações α 1-4 dos polissacarídeos que possuem três ou mais

unidades de D-glucose em união α 1-4 (PANDEY et al., 2005), podendo atuar isolada ou em conjunto com outras enzimas amilolíticas. A hidrólise ocorre na forma não seletiva (endoenzima) sobre vários pontos da cadeia simultaneamente, sendo que os primeiros produtos da hidrólise são sempre oligossacarídeos de 5 a 7 unidades de glicose. Isso significa que a quebra ocorre preferencialmente sobre cada passo da hélice, da cadeia espiral da amilose ou da amilopectina, liberando dessa forma unidades de glicose, oligossacarídeos e dextrinas.

As amilases podem ser derivadas de diversas fontes, incluindo plantas, animais e microrganismos, sendo que nos últimos anos as α -amilases bacterianas tem recebido mais atenção dos pesquisadores devido à sua maior termo estabilidade. Assim, no campo da biotecnologia pesquisas sobre a produção de α -amilases termoestáveis de menor custo, são recomendadas (H. SUN et al., 2010).

Atualmente várias amilases microbianas estão disponíveis comercialmente e tem aplicação quase completa na hidrólise do amido em diversos tipos de indústrias, como para a produção do malte para cervejarias, produção de detergentes, na indústria papelreira, no processamento de alimentos, para a produção de etanol (conversão do amido em etanol) e principalmente na indústria sucroalcooleira para melhorar a eficiência e qualidade na produção do açúcar (hidrolisando as moléculas de amido presentes no caldo).

3.10 Consórcios Microbianos

Consórcios microbianos são microrganismos do solo e aquáticos, principalmente bactérias e fungos atuando em conjunto para a degradação de uma matéria. Os consórcios microbianos podem fazer com que compostos orgânicos poluentes sejam transformados em biomassa, água, dióxido de carbono e minerais, sendo esse processo denominado mineralização.

Na degradação da celulose múltiplas espécies de microrganismos celulolíticos coexistem uns com os outros e também com outras espécies não-celulolíticas. Essas espécies competem diretamente por celulose, e pelos produtos gerados na hidrólise da celulose. Dessa maneira a remoção de certos polissacarídeos da parede celular da planta por uma espécie ou grupo de microrganismo pode aumentar o

acesso de um segundo grupo à celulose ou a hemicelulose, ocorrendo assim à desconstrução do material lignocelulósico por comunidades microbianas (Lynd et al 2002).

Kato et al. (2004) demonstraram em seus estudos, uma efetiva degradação de celulose por um sistema de cultivo misto constituído por bactérias celulolíticas *Clostridium* e bactérias aeróbias não celulolíticas. Os autores concluíram que através da comunidade selecionada do ambiente natural e sucessivas sub-culturas, que os microrganismos presentes teriam interações positivas. Além disso, Kato e seus colaboradores sugerem que as interações positivas entre microrganismos servem como um bom modelo para demonstrar que na natureza existem várias interações positivas que ainda não foram esclarecidas.

Também na literatura observamos a utilização de consórcios microbianos para a degradação de resíduos da agricultura (BAG-VASQUEZ et al., 2008; DUNSON et al., 2007; SILVA, 2008), inclusive com o lançamento de produtos comerciais a serem utilizados na sacarificação da biomassa lignocelulolítica como o Accelerase 1500 da empresa Genencor.

3.11 Sequenciadores de Nova Geração

O sequenciamento de nova geração – Next Generation Sequencing, em inglês, ou simplesmente NGS – são processos de sequenciamento de DNA que utilizam metodologias diferentes da de Sanger (primeiro método popular de sequenciamento de DNA realizado por determinação de cadeia), com o objetivo de acelerar e baixar o custo do processo de sequenciamento. Apesar de se diferenciarem consideravelmente entre si todos os sequenciadores de Nova Geração se baseiam no processamento paralelo massivo de fragmentos de DNA. Enquanto que um sequenciador de metodologia Sanger processa, no máximo, 96 fragmentos por vez, os sequenciadores de nova geração podem ler até bilhões de fragmentos ao mesmo tempo.

Os novos sequenciadores são: a plataforma 454 pirosequenciador da Roche, Solexa da Illumina, a plataforma da Applied Biosystems, denominada SOLID

System, e o HeliscopeTrue Single Molecule Sequencing (TSMS), da Helicos dentre outros (METZKER, 2010). Cada tecnologia de sequenciamento possui uma estratégia diferente, mas em geral podemos identificar etapas comuns entre todos os sequenciadores: preparo da amostra, amplificação da biblioteca e sequenciamento.

No sequenciamento utilizando a plataforma SOLID (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection) primeiramente é realizado a fragmentação do DNA no tamanho de 60 a 90 pb ou de 1 a 10 Kb. Em seguida as extremidades do material a ser sequenciado são ligadas a adaptadores de sequencias específicas que serão utilizados para ligação dos fragmentos de DNA à microesferas, onde ficarão imobilizados durante a PCR. Após a amplificação, essas microesferas são depositadas em uma lamina de vidro e primers específicos se unem às moléculas imobilizadas nas microesferas. Durante o processo de incorporação de novos nucleotídeos, a fluorescência é emitida e captada (MOROZOVA; MARRA, 2008).

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Isolamento e Estabilização do Consórcio

O consórcio bacteriano utilizado no trabalho foi isolado de solo de área de cultivo comercial de cana-de-açúcar com colheita mecanizada, apresentando palhada em decomposição (ALMEIDA, 2011). Foram coletadas amostras simples e aleatórias do solo em profundidade de 0 a 20 cm em ziguezague. As amostras foram reunidas e homogeneizadas resultando em uma amostra composta, a qual foi utilizada para o isolamento do consórcio (PAIXÃO et al., 2010). Do montante das amostras coletadas (aproximadamente 500gr), 1g da amostra (solo) foi adicionado a 50 ml de meio mineral Bushnell-Haas Broth (BHB) estéril contendo 0,1g/ml de ciclohexamida. A ciclohexamida foi utilizada para garantir o crescimento e estabilização de um consórcio de bactérias. O meio BHB é composto por (g/L): KH_2PO_4 , 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,02; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0,02; KNO_3 , 1;

FeCl₃, 0,05, soluções esterilizadas individualmente e reunidas na hora do uso (BUSHNELL; HAAS, 1941).

A amostra foi mantida nesse meio por 12hs a temperatura de 30°C com agitação de 150rpm. Após o período de incubação, a suspensão ficou em repouso por 1 hora, para decantação da fase sólida. Para o enriquecimento, uma alíquota de 500µl do sobrenadante da suspensão de solo foi inoculada em 50 ml de meio de cultivo BHB estéril, contendo 0,5% de bagaço de cana de açúcar seco e triturado. A fonte de carbono utilizada foi esterilizada em água a 120°C, 1 atm e 20 min antes da mistura com os sais.

Desse modo iniciou-se a estabilização do consórcio, a suspensão foi incubada por 7 dias, a 30° com agitação de 150rpm e após este intervalo, uma alíquota de 500µl da suspensão foi transferida para um novo frasco com meio enriquecido contendo 50 ml de meio BHB com bagaço de cana.

Esse procedimento foi realizado durante 8 semanas e a cada transferência, alíquotas de 800µl das amostras foram estocadas em glicerol a temperatura de -80°C.

4.2 Capacidade de Degradação Enzimática

A avaliação da produção de enzimas foi realizada através do cultivo do consórcio em meio BHB contendo 0,5% de Carboxi-Metil-Celulose (BHB-CMC), por sete dias a 30°C. Após o cultivo a detecção da enzima celulase foi avaliada pelo aparecimento de halo claro e amarelado ao redor do cultivo após coloração das placas com vermelho congo (SOUZA; OLIVEIRA; ANDRADE, 2008). Para o teste de degradação do amido foi utilizado o meio BHB sólido enriquecido com 0,5% de amido solúvel, e após sete dias de cultivo as placas foram coradas com Lugol (1% I₂: 2% KI – iodeto de potássio) por 15 minutos, em seguida, descartou-se do mesmo, lavou-se com solução salina 0,85% por 10 minutos e o excedente foi descartado o aparecimento de halo claro em volta da cultura demonstrou a presença de amilase (SOUZA; OLIVEIRA; ANDRADE, 2008).

4.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para a análise da liberação de açúcares liberados pela desconstrução da celulose das amostras o consórcio foi cultivado em 50 ml de meio BHB com bagaço de cana, por 18 dias, a 30°C, com agitação de 150 rpm. Em intervalos de 48 horas o sobrenadante dos cultivos foi coletado por centrifugação (centrífuga Sorvall a 16266 x g por 30 minutos a 4°C), e armazenado em freezer -20. Posteriormente cada amostra foi concentrada até o volume final de 1 mL. A amostra obtida foi filtrada em filtro de ester de celulose de 0,45 µm antes que fosse submetida a análise cromatográfica.

Para a normalização da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), foram utilizados os seguintes açúcares padrão: frutose, glucose e sacarose, em que foram empregados 50 µmoles de cada açúcar padrão. Para a construção da curva de calibração, foram usadas as seguintes concentrações da mistura de açúcar padrão: 0.12; 0.25; 0.37 e 0.5 µmol/mL. A análise das amostras foi desenvolvida num sistema de HPLC equipado com um detector de RID (Shimadzu, modelo RID - 10A). A separação dos açúcares foi realizada através de uma coluna Supelcosil LC-NH2 (25 cm x 4.6 mm) com uma velocidade de fluxo constante de um mL / min usando tampão de acetonitrilo: H2O (75: 25). A quantidade de amostras padrão e injetadas foi de 20 µL, e como controle negativo utilizou-se o meio de cultivo no tempo zero. As análises foram realizadas em triplicatas, em seguida foi calculado a média e gerado seu desvio padrão.

4.4 Sequenciamento, Análise Evolutiva e Diversidade dos Genes

A extração do DNA total do consórcio foi realizada pelo quite de extração Wizard Genomic DNA purification, e o material foi sequenciado em sequenciador SOLID 5500 (Life Technologies), usando biblioteca mate pair de 3 kb com tamanho do read de 75pb. O sequenciamento foi realizado pela Life Technologies na cidade de Foster, Califórnia, EUA.

Os dados do sequenciamento foram processados utilizando o algoritmo “De Novo Assembly” do pacote CLC Genomics Workbench 6.5.1. Os contigs foram submetidos à plataforma de anotação de dados metagenoma MG-RAST (MEYER et al., 2008). As sequencias dos genes de interesse foram submetidas ao programa BLATX do NCBI- National Center for Biotechnology Information, para análise de similaridade com sequencias desse banco de dados foram selecionadas as 20 primeiras sequencias mais semelhantes. O alinhamento das sequencias obtidas foi realizado pelo ClustalW pertencente ao pacote de programas disponíveis no software BioEdit version 7.0.5.3. Foi gerado um arquivo de saída utilizando o programa MEGA 5 ©1993-2011, onde realizou-se a construção da árvore de distância utilizando o método “*Neighbor-joining*” e “*Bootstrap*” para 500 repetições (TAMURA et al., 2011), para a comparação das sequencias encontradas no DNA do consórcio analisado.

V. RESULTADOS

5.1 Capacidade de Degradação Enzimática

A produção de enzimas com atividade degradadora do amido e celulose pelas células do consórcio pode ser observada na Figura 5. Para o teste da produção de amilase nota-se que o meio BHB enriquecido com o amido é ligeiramente opaco, sendo possível visualizar o halo sem a coloração, pois há a formação de uma área translúcida próxima a cultura, porém para a melhor definição do diâmetro do halo realizou-se a coloração com Lugol. A Figura 5-A mostra o halo produzido pela atividade amilolítica dos microrganismos presentes no consórcio.

Já o teste bioquímico para detecção de celulases consiste na hidrólise da celulose disponível no meio. Essa degradação da celulose disponível no meio de cultura é visualizada por meio de halos de coloração amarelo formados ao redor da

cultura. Na Figura 5-B, é possível visualizar o resultado do teste para a presença de celulase.

O iodo e o vermelho congo são corantes que interagem com as moléculas de amido e celulose respectivamente quando essas moléculas são hidrolisadas perdendo a sua estrutura tridimensional, devido à ação enzimática, o corante deixa de interagir com as moléculas e o meio com esses polímeros hidrolisados que sofre um processo de descoloração (WOO et al., 2003).

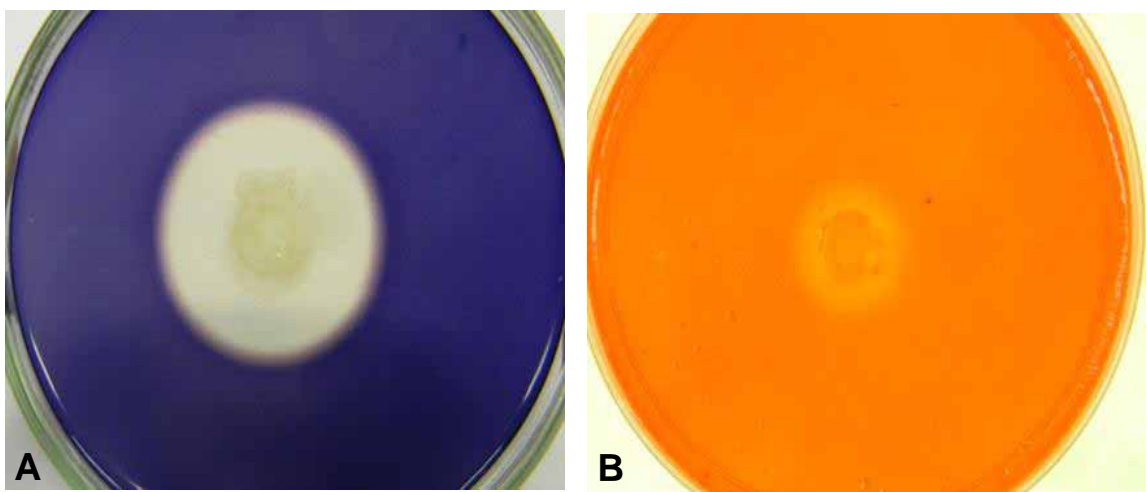


Figura 5. Teste de detecção de enzimas hidrolíticas após cultivo do consórcio bacteriano por 7 dias. (A) Teste para detecção de amilase do cultivo em meio BHB-amido sólido e posterior coloração com Lugol; (B) Teste para detecção de celulase através do cultivo em meio BHB-CMC sólido, e posterior coloração com vermelho congo.

5.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para comprovar a atividade degradadora do material lignocelulósico, determinou-se através da CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). Os açúcares presentes no sobrenadante da cultura do consórcio, que foram coletados em intervalos de 48 horas de cultivo em meio contendo bagaço de cana e açúcar como fonte de carbono. A Figura 6 mostra o perfil cromatográfico representativo de uma mistura de açúcares padrões (glicose, frutose e sacarose) que foram

pesquisados nas amostras de meio do consórcio bacteriano em estudo. Esses açúcares foram escolhidos para se comprovar a inexistência de sacarose no bagaço utilizado no meio. Após a determinação do tempo de retenção de cada açúcar as amostras de sobrenadante dos cultivos foram analisadas.

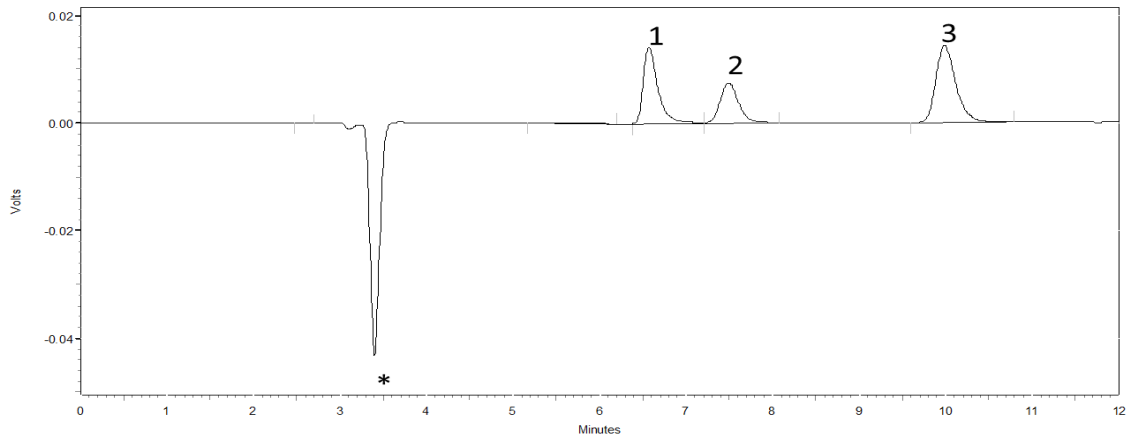


Figura 6. Perfil cromatográfico do padrão representativo de uma mistura de monossacarídeos e dissacarídeos padrões. (*) Solventes; (1) Frutose; (2) Glicose e (3) Sacarose.

Os resultados da concentração de glicose obtidas na degradação dos materiais lignocelulósicos estão apresentados na Figura 7, os outros açúcares quantificados (frutose e sacarose) não foram detectados em nenhuma das amostras, inclusive no tempo inicial, imediatamente após o inoculo. Os resultados mostram a presença de glicose livre no sobrenadante do cultivo que foi observada em todos os tempos de cultivo, a partir de dois dias de incubação. A maior taxa de liberação de açúcares foi após 18 dias de incubação, talvez pela diminuição natural dos microrganismos presentes no meio de cultivo causado pelo esgotamento de outros nutrientes necessários para a manutenção da multiplicação celular.

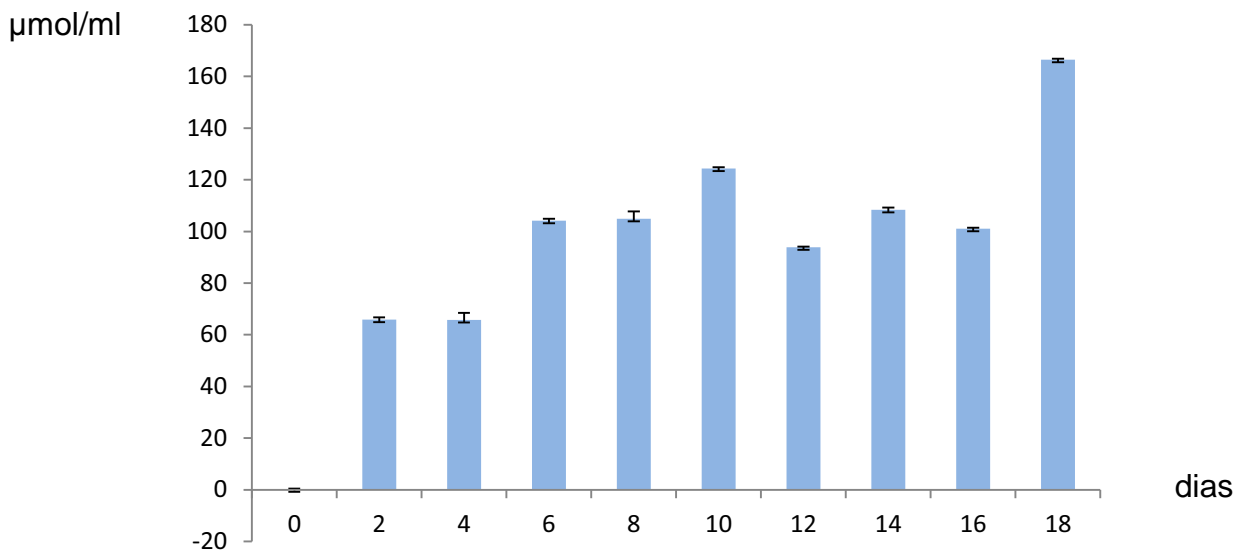


Figura 7. Concentração de glicose presente no sobrenadante da cultura do consórcio. Concentração de glicose ($\mu\text{mol/ml}$) liberada no sobrenadante do meio em relação ao tempo (dias) de cultivo do consórcio bacteriano estudado.

5.3 Análise dos Genes Relacionados à Desconstrução da Biomassa

O resumo da análise do sequenciamento do DNA total do consórcio isolado de solo e cultivado em bagaço de cana-de-açúcar se encontra na Tabela 1. Foram obtidos aproximadamente 700 milhões de reads com tamanho médio de 37pb e a grande maioria com qualidade PHRED ≥ 20 . Os reads obtidos (cerca de 500 milhões) foram arranjados em 28 mil contigs com tamanhos descritos na Figura 8. A maioria dos contigs formados são menores que 1Kb, mas 52 contigs formados apresentam sequencia maior que 10Kb, e nenhum contig maior que 30Kb. O maior contig tem 28 mil pb e cobertura de 4x. O conteúdo em CG do material sequenciado apresentou distribuição normal com valores mais frequentes entre de 50 a 60% de conteúdo (Figura 9).

Tabela 1. Resumo dos resultados obtidos pelo sequenciamento total de DNA do consórcio pela plataforma SOLID e clusterização/montagem pelo CLC Genomics Workbench 6.0.1.

	READS TOTAL	READS SINGLET	READS CONTIGS
NÚMERO DE READS	728.631.529	198.939.628	529.691.911
TAMANHO MÉDIO (pb)	37.5	14.48	46.13
NÚMERO CONTIG			28.001
MAIOR CONTIG (kb/cobertura)			27.943/4.000x

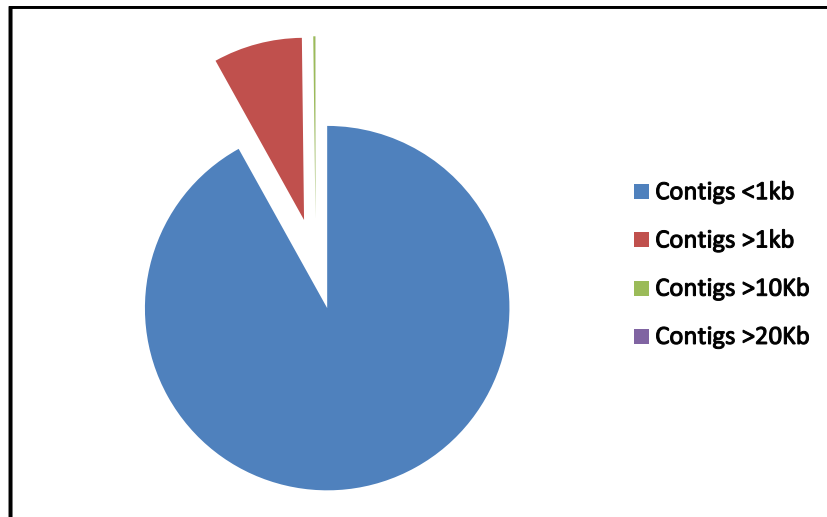


Figura 8. Distribuição dos tamanhos dos contigs formados durante a clusterização/montagem pelo programa CLC Genomics Workbench 6.0.1 do DNA metagênomico do consórcio.

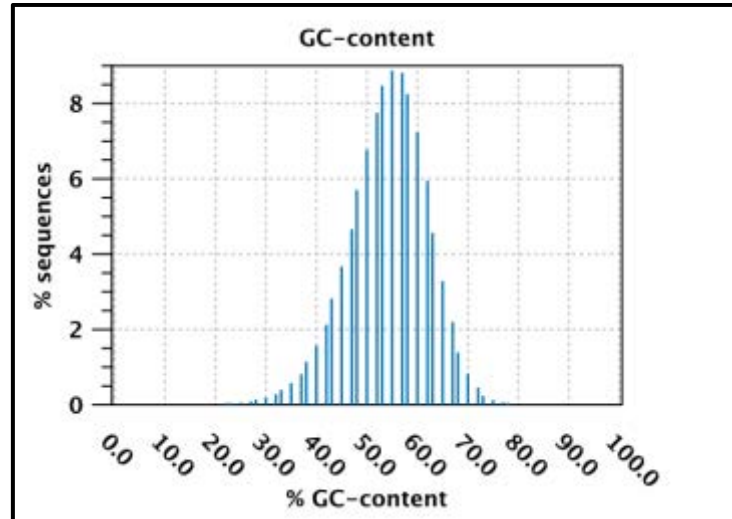


Figura 9. Distribuição do conteúdo GC do DNA total do consórcio gerado pelo programa CLC Genomics Workbench 6.0.1

Os dados de sequenciamento na plataforma SOLID foram analisados no servidor de análises metagenômicas MG-RAST, essa análise resultou em um total de 8.520.006 pares de bases arranjadas em 7.150 sequencias com comprimento médio de 1.191bp. Destas sequencias 0,2% (17 sequencias) correspondem a genes de RNA ribossomal, 67,7% (4.839 sequencias) representam genes de proteínas com funções conhecidas, 26,1% (1.865) genes de proteínas preditas com funções desconhecidas e 6,0% (429 sequencias) não correspondem a quaisquer genes. A diversidade bacteriana do consórcio calculada corresponde a uma distribuição dos genes encontrados na amostra para todos os bancos de dados utilizados pelo MG-RAST, esses bancos de dados revelam os microrganismos que foram identificados através das sequencias gênicas. Por esta abordagem foram obtidas aproximadamente 55 espécies.

Além disso, através desses dados foi gerada uma curva de abundancia x classificação, que é uma ferramenta para representar visualmente a riqueza taxonômica e uniformidade dos genes. A Figura 10 mostra três gráficos contendo as abundancias de filo, classe e gêneros encomendados desde o mais abundante para o menos abundante.

Os resultados mostraram que os organismos mais abundantes identificados tem similaridade com sequencias do filo *Proteobacteria* e *Firmicutes* como mostra a Figura 10-A. Com importantes organismos produtores de enzimas hidrolíticas as *Proteobacterias* representaram 92% (14.223 hits) e o filo *Firmicutes* 4,2% (656 hits), outros filios também foram classificados as *Actinobacterias*, *Streptophyla* e *Cynobacterias* estão dentre os mais abundantes encontrados.

A classe de organismos identificadas com maior representatividade foi a do grupo *Betaproteobacteria* com 82,6% (12.770 hits), seguido pelas *Gamaproteobacterias* com 5% (773 hits), e do grupo *Bacilli* com 4% (618 hits) outras classes que foram encontradas no sequenciamento estão representadas na Figura 10-B. Depois dos filios e classes os gêneros também foram estudados, e com maior abundancia foi identificado as *Burkholderias* que corresponderam a 72,4% (11.192 hits) sendo seguida do gênero *Bacillus* com 3.8% (594 hits), *Cupriavidus* 3.3% e *Pseudomonas* com 1.9%.

5.4 Análise Evolutiva

As sequencias de enzimas selecionadas para o estudo de análise evolutiva no DNA do consórcio foram às codificadoras de enzimas catalizadoras de reações de hidrólise do amido como a alfa-amilase (EC 3.2.1.1) e a glucoamilase (EC 3.2.1.3) e as relacionadas à desconstrução da celulose como a alfa-glicosidase (EC 3.2.1.20), beta-glicosidase (EC 3.2.1.21) e a endoglucanase (EC 3.2.1.4). Essas sequencias foram escolhidas por apresentarem maior qualidade e comprimento médio de 3.500 pb. Também foram encontradas outras enzimas hidrolíticas importantes na desconstrução da biomassa lignocelulósica como: a beta-xilosidase (EC 3.2.1.37) e a 6-fosfo-beta-glicosidase (EC 3.2.1.86), mas que não foram escolhidas para estudo, por apresentarem sequencia sem qualidade ou tamanho inadequado. As sequencias dos genes de interesse foram submetidas ao programa BLASTN do NCBI - National Center for Biotechnology Information, para análise de similaridade com sequencias desse banco de dados, os resultados obtidos encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Características do alinhamento obtido através do programa BLASTN com as sequências das enzimas prospectadas.

Enzima	Tamanho seq.	% id	% cov	Microorganismo	Tamanho seq.MO	cord.Alinh."query"	cord.alinh."subject"	Accession
Alfa amilase								
seq1 (872)	4792	87	34	Burkholderia sp. Y123 chromosome 3, complete sequence	1569570	1064-2728	1450993-1452657	CP003089.1
seq2 (3467)	1557	88	99	Burkholderia sp. Y123 chromosome 2, complete sequence	1773019	1-1544	1317382-1318950	CP003088.1
seq3 (2453)	378	91	12	Burkholderia thailandensis E264 chromosome II, complete sequence	2914771	180-225	1105725-1105680	CP000085.1
seq4(8)	1120	85	100	Burkholderia sp. Y123 plasmid byi_1p, complete sequence	1951047	1-1120	317776-318898	CP003090.1
6-phospho-beta-glucosidase								
seq1	196	100	100	Bacillus thuringiensis serovar kurstaki str. HD73, complete genome	5646799	1-196	5343515-5343320	CP004069.1
Alfa-glucosidase								
seq1 (207)	4603	88	99	Burkholderia sp. RPE64 DNA, chromosome 3, complete genome	900830	2;-4597	41022-45647	AP013060.1
seq2 (410)	3118	85	89	Burkholderia sp. RPE64 DNA, chromosome 3, complete genome	900830	54-1627	35565-37138	AP013060.1
Beta-glucosidase								
seq1 (3083)	2800	89	97	Burkholderia sp. Y123 chromosome 1, complete sequence	3131280	57- 2787	2136777-2134067	CP003087.1
seq2 (4299)	288	90	86	Burkholderia sp. RPE64 DNA, chromosome 1, complete genome	3013410	2-249	2049855-2049608	AP013058.1
Endoglucanase								
seq1 (1707)	2387	89	79	Burkholderia sp. Y123 chromosome 2, complete sequence	1773019	16-1912	971622-973536	CP003088.1
seq2 (4571)	423	86	17	Burkholderia sp. CCGE1002 chromosome 1, complete sequence	3518940	347-422	1177609-1177534	CP002013.1
seq3 (3441)	579	81	97	Burkholderia mallei ATCC 23344 chromosome 2, complete sequence	2325379	5-570	1723842-1724407	CP000011.2
Beta-xilosidase								
seq1 (3692)	812	83	98	Burkholderia sp. Y123 chromosome 2, complete sequence	1773019	8-806	854411-853611	CP003088.1
Glucamilase								
seq1(2097)	2875	90	98	Burkholderia sp. Y123 chromosome 1, complete sequence	3131280	41-2869	953331-956179	CP003087.1
seq2(879)	1258	87	67	Burkholderia sp. RPE64 DNA, chromosome 1, complete genome	3013410	395-1239	906235-905393	AP013058.1
seq3(4656)	578	86	96	Burkholderia sp. Y123 chromosome 2, complete sequence	1773019	3-561	726678-727136	CP003088.1
seq4(1366)	8884	83	40	Burkholderia sp. CCGE1001 chromosome 1, complete sequence	4063449	4210-7765	2675327-2671766	CP002519.1

5.5 Genes Relacionados com a Hidrólise do Amido

No sequenciamento foram identificados genes de enzimas capazes de hidrolisar o amido, como o da enzima alfa amilase EC 3.2.1.1 e o da glucoamilase EC 3.2.1.3. Para análise evolutiva dessas enzimas, as sequencias correspondentes ao gene de interesse foram submetidas ao programa BLASTX, tal programa traduz sequencias de nucleotídeos para proteínas e faz alinhamentos com as sequencias depositadas no banco de dados NCBI - National Center for Biotechnology Information. As 20 primeiras sequencias mais semelhantes foram resgatadas, e serviram de parâmetros para a construção dos agrupamentos filogenéticos (dendogramas), que possibilitaram a identificação dos microrganismos mais proxicamente relacionados aos genes das amilases encontradas. Essas informações foram utilizadas para fazer o alinhamento e para a construção dos agrupamentos pelo método de distância “neighbor-joining”. Na Figura 11 e na Figura 12 observamos que a estirpe *Burkholderia sp SJ98* foi o organismo mais próximo para as duas enzimas alfa amilase e glucoamilase.

5.6 Genes Relacionados com a Hidrólise da Celulose

As sequencias de enzimas degradadoras de celulose escolhidas para estudo foram as que codificam a alfa-glicosidase EC 3.2.1.20, beta-glicosidase EC 3.2.1.21 e a endoglucanase EC 3.2.1.4. Como explicado anteriormente os genes correspondentes às enzimas prospectadas foram submetidas ao BLASTX e capturadas as 20 sequencias de organismos mais semelhantes. Em seguida esses dados foram analisados e geraram-se os dendogramas. As Figuras 13, 14 e 15 mostra a similaridade das sequencias genicas estudadas com as de diferentes microrganismos encontradas nos bancos de dados. Observou-se assim como nas amilases a similaridade das sequencias com as de diferentes espécies do gênero *Burkholderia*, o agrupamento ocorreu com as sequencias da *Burkholderia SJ98*.

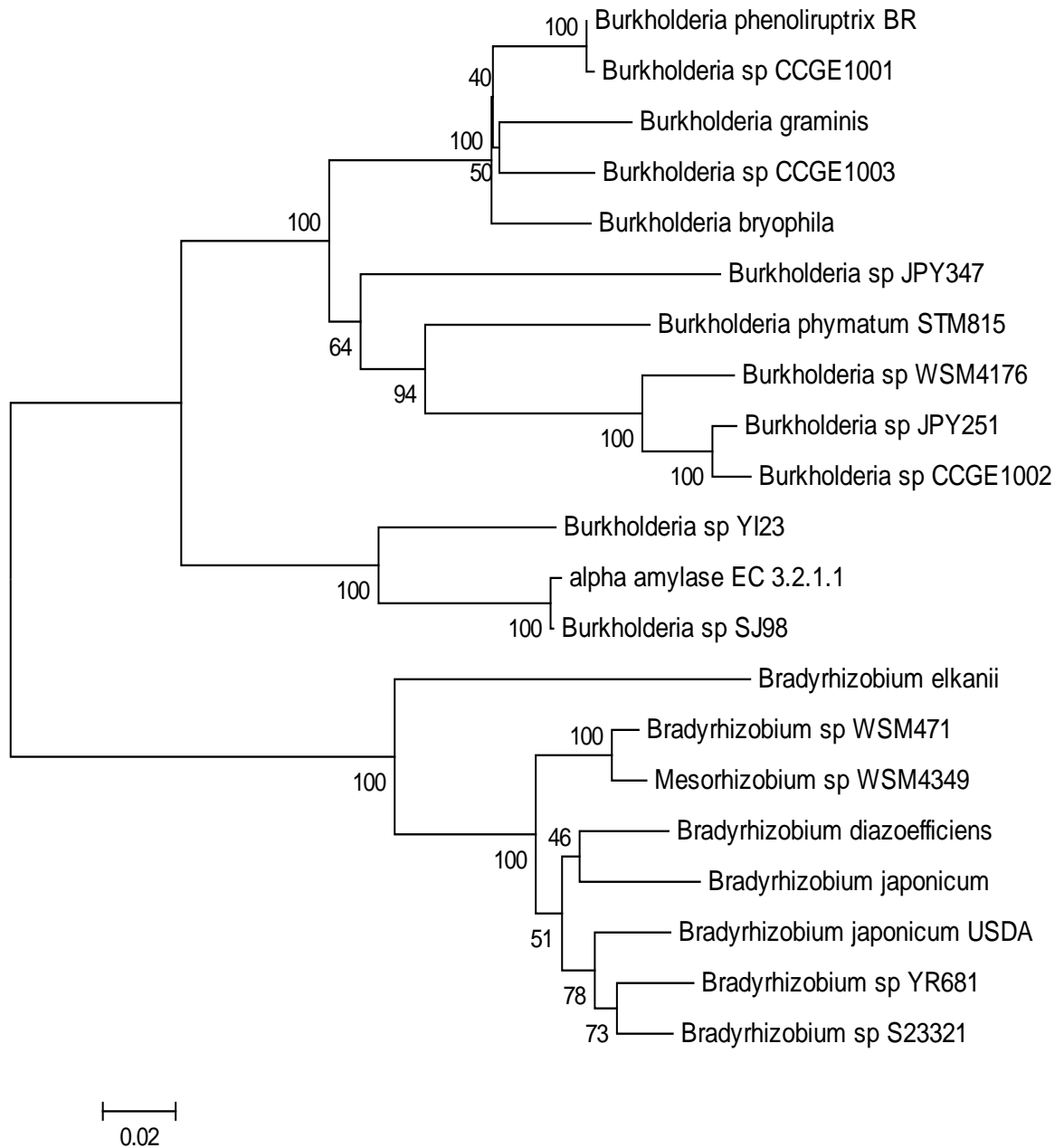


Figura 11. Dendrograma comparativo da sequencia da Alfa-amilase utilizando o agrupamento neighbor-joining e bootstrap para 500 repetições. O tamanho do fragmento estudado foi de 4.792 pares de bases.

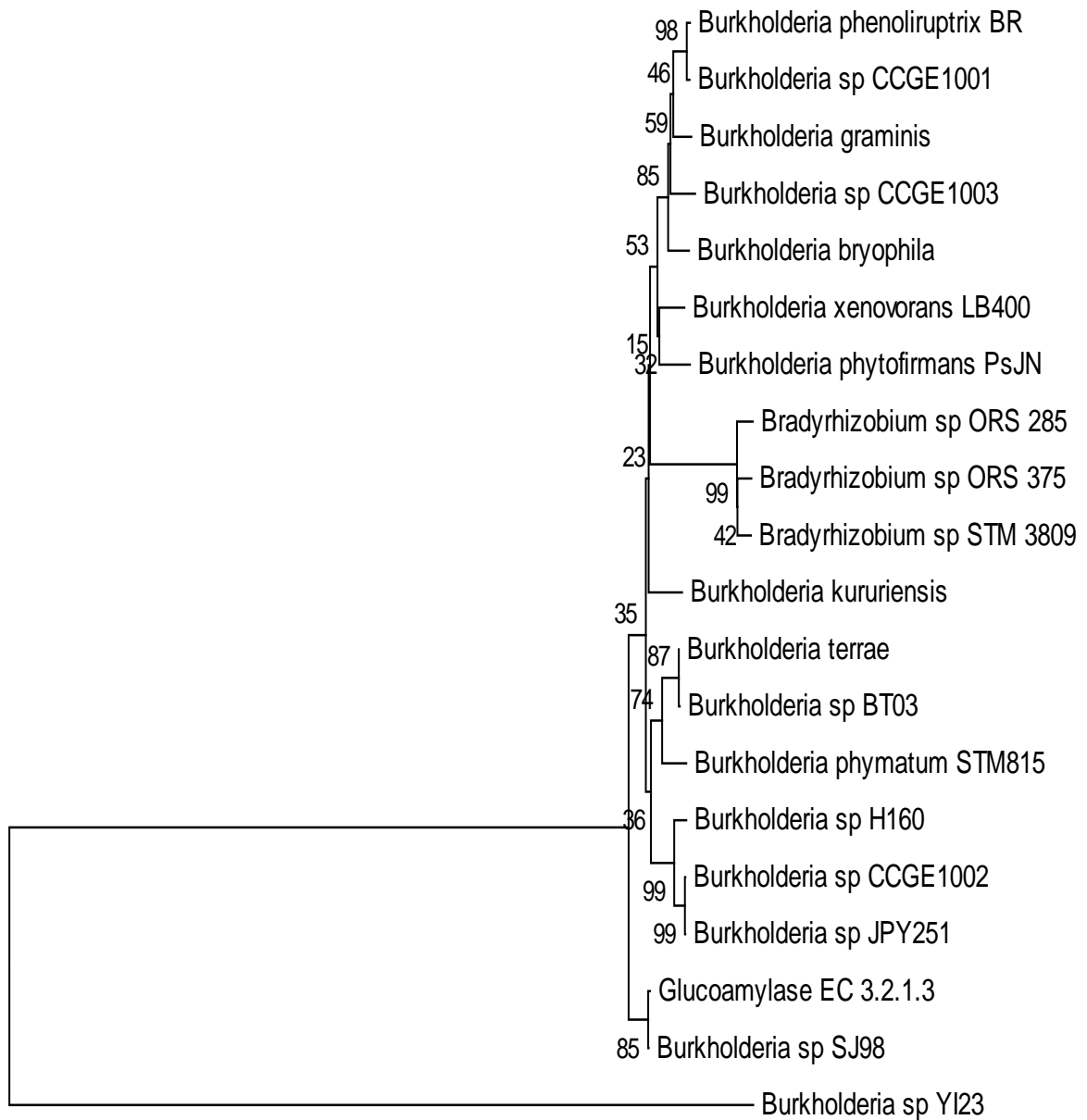


Figura 12. Dendrograma comparativo da sequencia da Glucoamilase utilizando o agrupamento neighbor-joining e bootstrap para 500 repetições. O tamanho do fragmento estudado foi de 2.872 pares de bases.

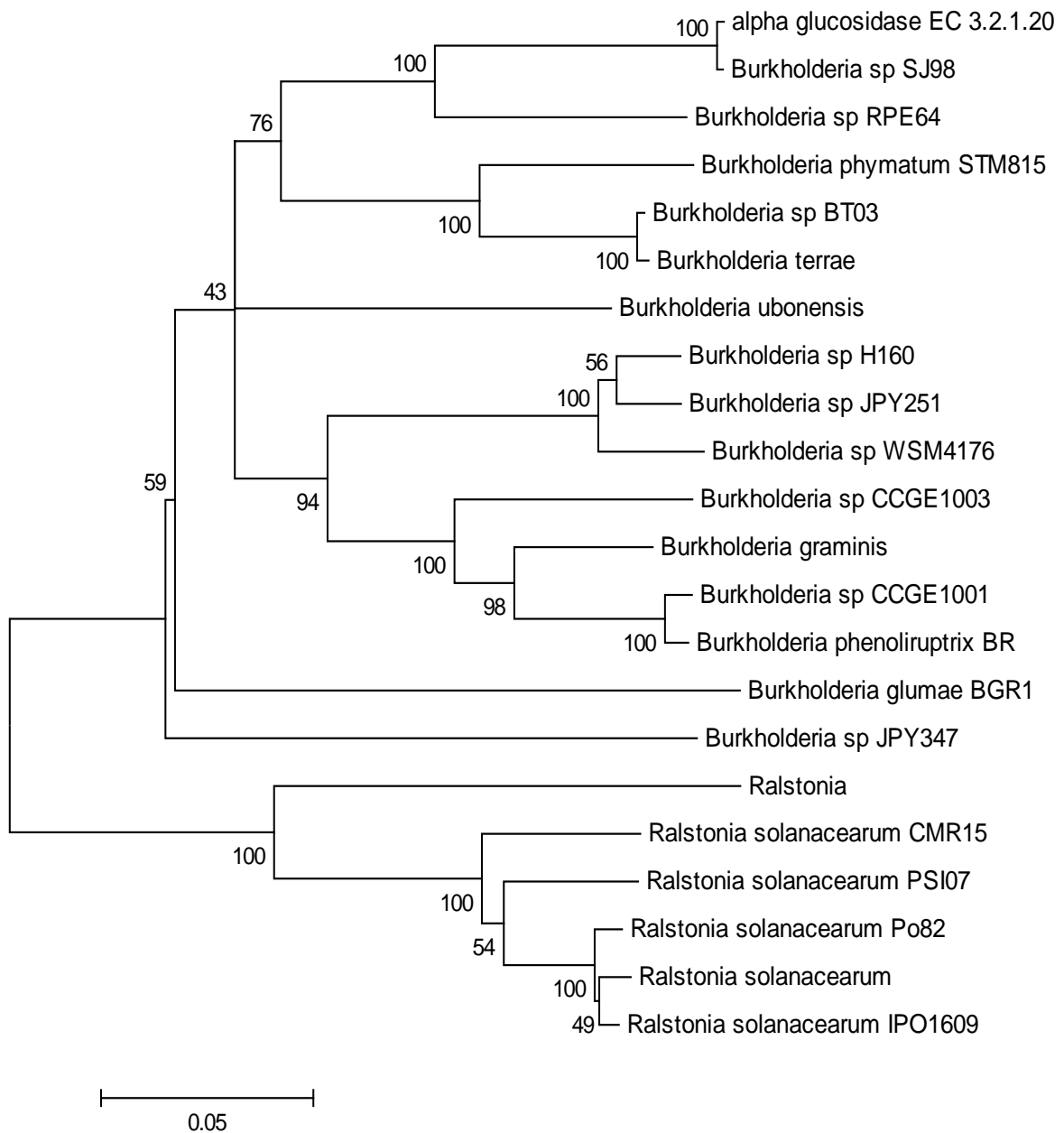


Figura 13. Dendograma comparativo da sequencia da alfa-glucosidase utilizando o agrupamento neighbor-joining e bootstrap para 500 repetições. O tamanho do fragmento estudado foi de 4603 pares de bases.

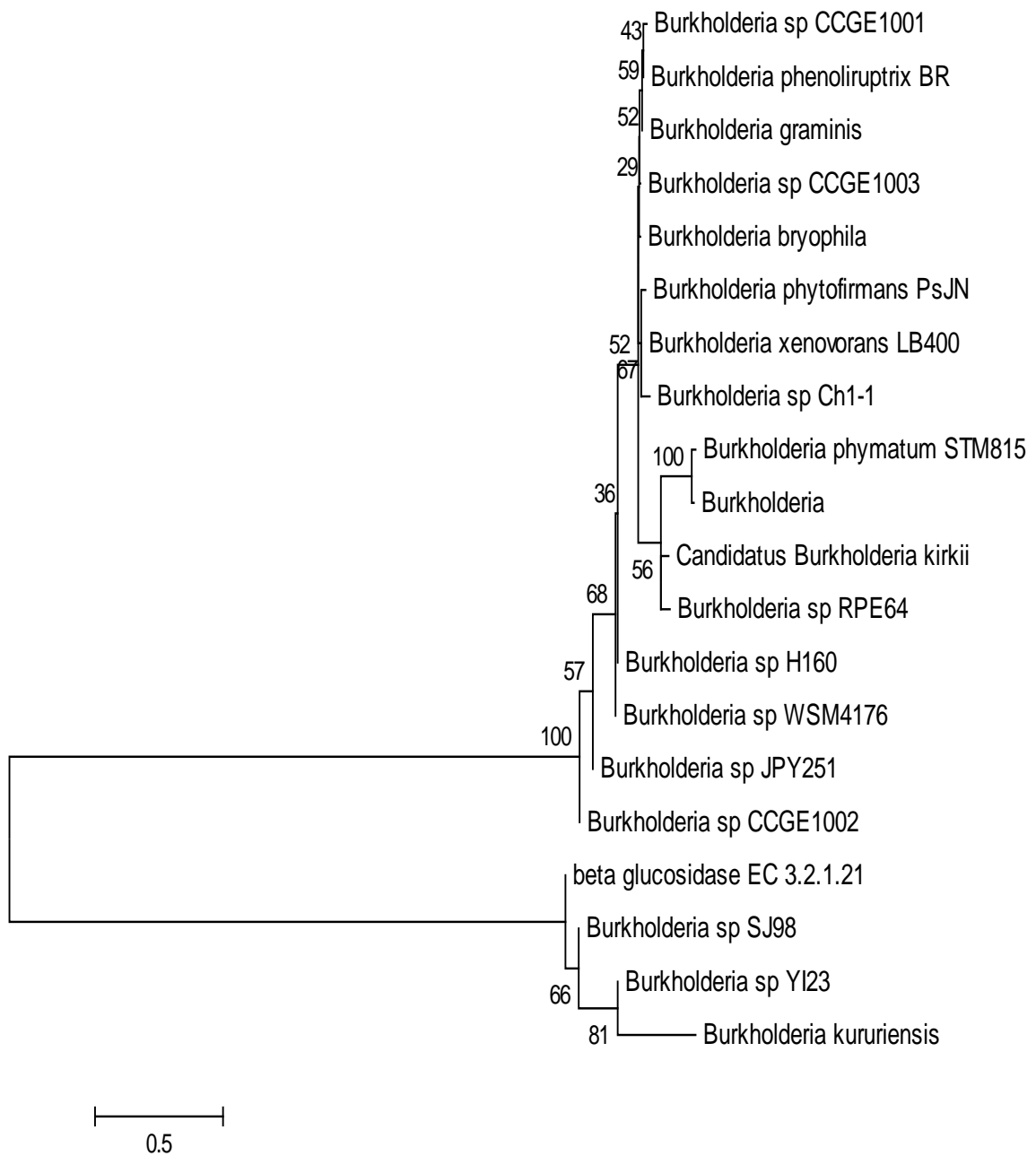


Figura 14. Dendrograma comparativo da sequencia da Beta-glucosidase utilizando o agrupamento neighbor-joining e bootstrap para 500 repetições. O tamanho do fragmento estudado foi de 2.800 pares de bases.

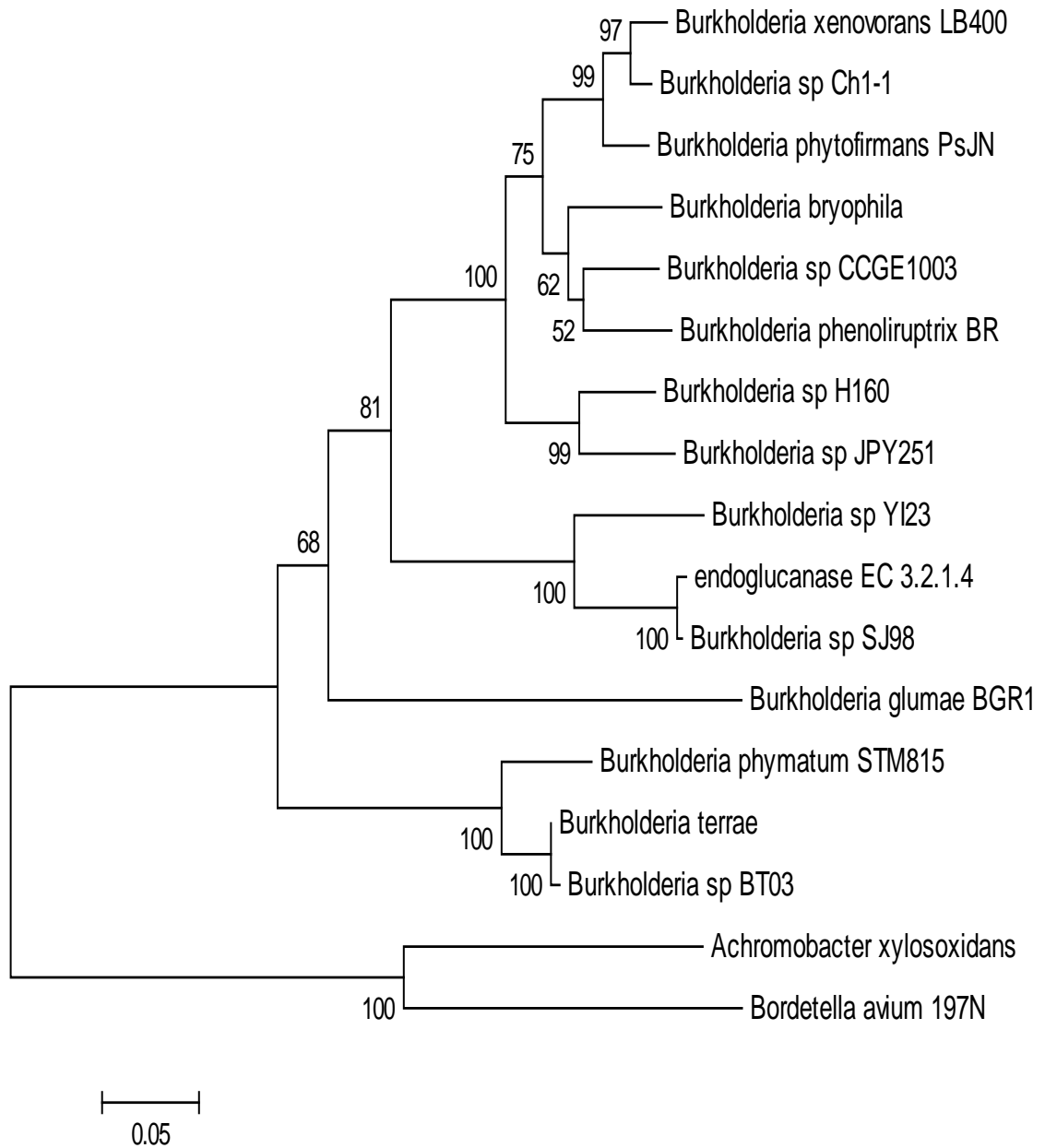


Figura 15. Dendograma comparativo da sequencia da Endoglucanase utilizando o agrupamento neighbor-joining e bootstrap para 500 repetições. O tamanho do fragmento estudado foi de 2.387 pares de bases.

VI. DISCUSSÃO

Neste estudo um consórcio bacteriano degradador de carboidratos como celulose e amido foi obtido. Capaz de desconstruir um potencial substrato lignocelulósico, o bagaço de cana, o consórcio mostrou ser eficaz na liberação de açúcar (glicose) do bagaço e na produção de enzimas como celulasas e amilases gerando halos significativos que mostraram a degradação da celulose e do amido a partir dos testes bioquímicos. Os resultados foram compatíveis com o obtido por Romano et al. (2013) que avaliou a atividade celulolítica de três consórcios bacterianos isolados a partir do solo de uma floresta na região do Chago, Argentina e por Souza et al. (2008) que utilizou a mesma técnica para prospecção das enzimas amilase e celulase em *Basidiomycetes* da Amazônia. A eficiência da degradação do consórcio foi comprovada através da análise dos açúcares presentes no meio através da CLAE, onde observamos a presença de glicose livre no meio de cultivo em todos os tempos o que gera um resultado promissor com relação à utilização de um consórcio bacteriano com capacidade de degradar a biomassa lignocelulolítica.

Wang et al. (2011), obteve um consórcio microbiano a partir de palha de arroz e no seu estudo identificou que 14 bactérias aeróbias degradavam o material lignocelulósico, esta degradação foi eficiente a partir de três dias de incubação a 50°C . Em comparação, o presente trabalho mostrou ser mais eficiente ao mostrar que aproximadamente 55 espécies de bactérias sobrevivem em conjunto utilizando como fonte de carbono apenas o bagaço de cana-de-açúcar. Também foi constatada nesse consórcio a capacidade de liberação de glicose no meio de cultivo que aconteceu a partir do segundo dia após o inóculo e cresceu progressivamente até o 18^o dia, lembrando que a liberação da glicose no meio de cultivo deve-se a hidrólise do material celulósico. A degradação da lignocelulose na natureza é um processo realizado por uma variedade de microrganismos que trabalham cooperativamente para hidrolisar diferentes frações deste complexo biopolímero. O processo requer a aplicação de vários tipos de enzimas celulolíticas, que agem sinergicamente (ROMANO et al., 2013).

A hidrólise enzimática do amido é uma das mais importantes reações enzimáticas ocorridas em escala industrial. As enzimas envolvidas no processo de

degradação do amido são as amilases e entre elas estão as glucoamilases e as α -amilases. As glucoamilases são caracterizadas como exoenzimas que produzem β -D-glicose a partir da extremidade não redutora da cadeia de amilose, amilopectina e glicogênio pela hidrólise de ligações do tipo α -1,4 por meio da remoção de sucessivas unidades de glicose. As α -amilases são endoenzimas que hidrolisam as ligações glicosídicas α -1,4 internas da amilose e amilopectina, liberando oligossacarídeos de cadeias com comprimentos variáveis. O resultado da hidrólise resulta em oligossacarídeos de menores massas moleculares, que por sua vez podem ser utilizadas para a produção de outros compostos químicos e também como substratos em fermentações (VIEILLE; ZEIKUS, 2001).

Enzimas produzidas por microrganismos são preferidas, do ponto de vista científico e comercial, por estes apresentarem rápido desenvolvimento, espaço limitado de cultivo e fácil manipulação genética. Apesar das amilases mais utilizadas nas indústrias atualmente provir de bactérias como as do gênero *Bacillus*, a busca por novas fontes microbianas vem crescendo em todo o mundo, Daniel (2010) em seu estudo analisou clones amilolíticos obtidos a partir de bibliotecas metagenômicas e identificou genes de amilase em organismos do gênero *Burkholderia*, semelhante aos resultados obtidos neste trabalho.

O consórcio apresentou predominância dos filos *Proteobacteria* e *Firmicute*, com predominância na classe das *Betaproteobacterias*, *Gammaproteobacterias* e *Bacilli*. O filo das *Proteobacterias* é considerado o mais extenso e variado dentre os filos de bactérias, apresentando uma grande diversidade em termos morfológicos e metabolismo, autotróficos e heterotróficos, aeróbios e anaeróbios (PEREIRA et al., 2006; CHAVES, 2007), este filo representa as bactérias caracterizadas por serem consumidoras de moléculas de C (carbono), como metano, metanol e atuarem no processo de remoção de nitrogênio (BOON et al., 2002). Este grupo se divide em 5 subdivisões: alfa (α), beta (β), gama (γ), delta (δ) e epsilon (ϵ). As *Proteobacterias* estão presentes nos mais diversos ambientes, mas, ocorrem predominantemente em solos cultiváveis como demonstra o trabalho de Val-Moraes et al. (2009).

Já o filo dos *Firmicutes* apresentam bactérias Gram-positivas, formadoras de esporos exemplo os gêneros *Bacillus* e *Clostridium* (CANHOS; VAZOLER, 1997), eles se caracterizam pela produção de toxinas e enzimas, frequentemente são

encontrados em solos, em zonas tropicais ou temperadas (URIBE; MARTINEZ; CERÓN, 2003) o que demonstra sua versatilidade ambiental. A maioria das bactérias dos filos *Proteobacterias* e *Firmicutes* podem ser cultivadas. Em seu estudo Pereira et al. (2008) analisou o solo de mata e cultivo de eucalipto e chegaram à conclusão que a presença do filo *Firmicutes* especificamente o gênero *Bacillus* foi encontrado somente em solo cultivado.

Quanto à análise evolutiva das enzimas encontradas no consórcio, observamos a predominância das classes *Betaproteobactéria* e *Gamaproteobactéria* sendo que o gênero *Burkholderia* obteve maior representatividade, possuindo 72,4% de todas as sequencias. O gênero *Burkholderias* foi descrito em 1992, e atualmente contém cerca de 70 espécies isoladas e caracterizadas, provenientes de uma vasta gama de nichos ecológicos como solo, água, humanos, vegetais e amostras clínicas, dentre outras. Quanto à evolução as bactérias do gênero *Burkholderias* são caracterizadas por aumentar o tamanho do seu genoma e alterar a ordem dos genes (TREVORS, 1996). Também são descritas por degradar muitos compostos xenobióticos incluindo hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, hidrocarbonetos alogenados e pesticidas (O'SULLIVAN; MAHENTHIRALINGAM, 2005).

As cinco enzimas encontradas no consórcio são muito próximas a estirpe *Burkholderia* sp. SJ98. Esta é uma bactéria gram-negativa responsável pela biodegradação de diferentes compostos nitro aromáticos, anteriormente conhecida como *Ralstonia* sp SJ98. Conhecida pelo seu potencial na biorremediação, Kumar et al.(2013) em seu estudo determinou todo o genoma da estirpe SJ98, identificou diferentes genes envolvidos na quimiotaxia bacteriana, e revelou que a bactéria tem alta semelhança com a *Burkholderia* sp Y123 e é estreitamente relacionada com as estirpes CCGE1001, CCGE1002 e CCGE1003, que também foram semelhantes com as enzimas encontradas no consórcio em estudo. No trabalho de Pandey (2011) a *Burkholderia* SJ98 foi isolada e caracterizada por realizar a degradação e co-transformação metabólica de uma serie de compostos nitroaromaticos, os resultados revelaram quem a estirpe pode degradar o 2-cloro-4-nitrofenol e utiliza-lo como única fonte de carbono, nitrogênio e energia em condições aeróbias.

Como descrito anteriormente o gênero *Burkholderia* é encontrado em diferentes ambientes e seu filo *Proteobacteria* é predominante em solos cultiváveis.

Esses dados justificam o fato de todas as enzimas encontradas no consórcio serem semelhantes a este filo. Como visto na literatura as *Burkholderias* são eficientes na biodegradação de diferentes compostos, tendo potencial para a biorremediação e possuindo enzimas com potencial biotecnológico. Podemos concluir de que através do seu poder de adaptação em diferentes ambientes e sua alta capacidade de produção enzimática, as *Burkholderias* são capazes de degradar eficientemente material lignocelulósico.

VII. CONCLUSÃO

Neste estudo um consórcio microbiano degradador de carboidratos como celulose e amido foi obtido. Eficiente na desconstrução de um potencial substrato lignocelulósico, o bagaço de cana, o consórcio mostrou ser eficaz na liberação de açúcar (glicose) do bagaço e na produção de enzimas como celulasas e amilases. Pelo sequenciamento foi possível analisar a diversidade dos microrganismos contidas no consórcio e prospectar os genes de interesse.

VIII. REFERÊNCIAS

ABDEL-HAMID, M.A; SOLBIATI, O.J; CANN, O. K. I. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, p. 1-28, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.10.1016/B978-0-12-407679-2.00001-6>>.

AGUIAR-FILHO, J. M. M. **Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar**. 2008. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

ALEXANDRINO, A. M; FARIA, H. G; SOUZA, C. G. M; PERALTA, R. M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus*. **Ciência Tecnologia e Alimentos**, v. 27, p. 364-368, 2007.

ALMEIDA MLM (2011). **Diversidade bacteriana de um consórcio degradador de resíduos celulolítico**. (Trabalho de Graduação)-Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal, Jaboticabal, 2011.

ALVES, R.E. **Caracterização de fibras lignocelulósicas pré-tratadas por meio de técnicas espectroscópicas e microscópicas ópticas de alta resolução**. 2011. 117 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

ARANTES, V; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 4. 2010. Disponível em: <<http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/3/1/4>>. Acesso em: 08 dez. 2013.

ARISTIDOU, A; PENTILLÂ M. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, p. 187-198, 2000.

ARO, N; PAKULA, T; PENTILLA, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology reviews**, v. 29, p. 719-739, 2005.

BAG-VASQUEZ, M; BURLINGAME, R; MAGNUSON, J. K; BRADFORD, M; SINITSYN, A. P. Methods and compositions for degradation of lignocellulosic material. United States, **Patent Application Publication**, US2008/0076159 A1, 2008.

BAYER, E. A; MORAG, E; LAMED, R. The cellulosome-a treasure-trove for biotechnology. **Trend in Biotechnology**, v. 12, p. 379-386, 1994.

BISCHOFF, K. M; ROONEY, A. P; LI, X. L; LIU, S; HUGHES, S. R. Purification and characterization of a family 5 endoglucanase from a moderately thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 1761-1765, 2006.

BOON, N; WINT, W; VERSTRAETE, W; TOPO, E. M. Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with Group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 39, p. 101-112, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi: 10.1111/j.1574-6941.2002.tb00911.x>>.

BURTON, R. A.; GIDLEY, M. J.; FINCHER, G. B.; Heterogeneity in the chemistry structure and function of plant cell walls. **Nature chemical Biology**, v. 6, p. 724-732, 2010.

BUSHNELL, L. D; HAAS, H.F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. **Journal of Bacteriology**, v. 41 p. 653-673, 1941.

CANHOS, V. P; VAZOLLER, R. F. Diversidade no domínio Bactéria. In: Canhos, V. P; Vazoller, R. F. Biodiversidade do estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX. **Revista FAPESP**, p1 – 13, 1997.

CARVALHO, G. B. M; GINÓRIS, Y. P; CÂNDIDO, E. J; CANILHA, L; CARVALHO, W; ALMEIDA E SILVA, J.B. Estudos do hidrolisado de eucalipto em diferentes concentrações utilizando evaporação a vácuo para fins fermentativos. **Revista Analitica**, v. 14 p.54-57, 2005.

CARVALHO, W; CANILHA, L; FERRAZ, A; MILAGRES, A. M. F. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 38, p. 2191-2195, 2009.

CASTRO, A. M; FERREIRA, M. C; CRUZ, J. C; PEDRO, K. C. N. R; CARVALHO, D. F; LEITE S. G. F; PEREIRA, N. Jr. High-yield endoglucanase production by *Trichoderma harzianum* IOC-3844 cultivated in pretreated sugarcane mill by product. **Enzyme Research**, v.2010, p.854526, 2010.

CHAVES, A. C. O. **Comportamento Ambiental da Ametrina e suas influências sobre a diversidade da comunidade microbiana dos solos**. 2007. Dissertação (Mestrado)-Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

COUGHLAN, M. P; HAZLEWOOD G. β -1,4-D xylan degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.17, p. 259-289, 1993.

DANIEL, K. R. P. (2010) **Atividades amilolíticas identificadas em bibliotecas metagenômicas do solo do cerrado**. Dissertação (mestrado)-Curso de biologia molecular- Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

DHILLON A, GUPTA JK, KHAMNA S. Enhanced production purification and characterization of a novel cellulose-poor thermostable alkali tolerant xylanase from *Bacillus circulans* AB 16. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 849:56, 2000.

DUNSON, J. B; ELNDER, R. T; TUCKER, M. P; HENNESSEY, S. M. Treatment of biomass to obtain fermentable sugars. United States, **Patent Application Publication** US2007/0031918 A1, 2007.

FENGEL, D; WEGENER, G. Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions. **Walter de Gruyter**, Berlin, 1989.

GOMES, D. N. F. **Biodiversidade e potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados do manguezal Barra das Jangadas**. 2007. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2007.
HARGER, C; SPRADA, D; HIRATSUKA, E. Amilase Fúngica. In: **Bioquímica das Fermentações**, 1982. 56 p.

HENRISSAT, B; DAVIES, G. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 7, p. 637-644, 1998.

HERVE, C.; ROGOWSKI, A.; BLAKE, A.W.; MARCUS, S.E.; GILBERT, H.J.; KNOX, J.P. Carbohydrate-binding modules promote the enzymatic deconstruction of intact plant cell walls by targeting and proximity effects. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.107, 2010 Disponível em: <[http://dx. doi.org/10.1073/pnas.1005732107](http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1005732107)>.

HIMMEL, M. E; DING, S. Y; JOHNSON, D. K; ADNEY, W. S; NIMLOS, M. R; BRADY, J. W; FOUST, T. D. Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, v. 315, p. 804-807, 2007.

JEFFRIES, T. W. Biodegradation of lignin and hemicelluloses. **Biochemistry of microbial degradation**, p. 233–277, 1994.

JENSEN, P. D; HARDIN, M. T; CLARKE, W. P. Effect of biomass concentration and inoculum source on the rate of anaerobic cellulose solubilization. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5219–5225, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.10.1016/j.biortech.2009.05.018>>.

KATO, S; HARUTA, S; CUI, Z; ISHII, M; IGARASHI, Y. Effective cellulose degradation by a mixed-culture system composed of a cellulolytic *Clostridium* and aerobic non-cellulolytic bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 51, p. 133-142, 2004.

KUMAR, S; VIKRAM, S; RAGHAVA, G. P. Genome Annotation of *Burkholderia sp. SJ98* with Special Focus on Chemotaxis Genes. **PLoS ONE**, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi:10.1371/journal.pone.0070624>>.

LASZLO, H; BASSO, L. M; COELHO, C. M. L. **Química de Alimentos**, Nobel, São Paulo, p.98, 1986.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: EDITORA SARAIVER, 2002. 975 p.

LIMA, U. A; AQUARONE, E; BORZANI, W; SCHIMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**, v. 3, Ed. Edgard Blucher, São Paulo, p. 593, 2001.

LINDY, 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 p. 169-172, 2008. Disponível em: <[http://dx. doi: 10.1038/nbt0208-169](http://dx.doi.org/10.1038/nbt0208-169)>.

LYND, L. R; PAUL, J; WEIMER P. J; WILLEM H; VAN Z. Y. L; ISAK, S. PRETORIUS, Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. , v. 66, p. 506-577, 2002.

MACEDO, I. C; SEABRA, J. E. A; SILVA, J. E. A. R, S. (2008). Greenhouse gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020". **Biomass and Bioenergy**, v. 32, p. 582-595.

MERINO, S. T; CHERRY, J. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**, v. 108, p. 95–120, 2007.

METZKER, M. L. Sequencing technologies-the next generation, **Nature reviews genetics**, V. 11, p. 31-46, 2010.

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, p 386, 2008. Disponível em: <[http://dx.doi: 10.1186/1471-2105-9-386](http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-9-386)>.

MOROZOVA, O; MARRA, M. A. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. **Genomics, Langford Lane**, v. 92, p. 255-264, 2008.

NEVELL, T. P; ZERONIAN, S. H. **Cellulose Chemistry fundamentals**.In: Nevell TP, Zeronian, SH(ed) Cellulose chemistry and its applications. New York. John Wiley 552p. 1985.

OGEDA, T; PETRI, D; Hidrólise enzimática de biomassa. **Quimica Nova**, v. 33, p. 1549-1558, 2010.

O'SULLIVAN, L. A; MAHENTHIRALINGAM, E. Biotechnological potential within the genus *Burkholderia*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 41, p. 8-11, 2005. Disponível em: < <http://dx.doi: 10.1111/j.1472-765X.2005.01758.x>>.

PAIXÃO, D; DIMITROV, M; PEREIRA, R; ACCORSINI, F; VIDOTTI, M; LEMOS, E. G. M. Molecular analysis of bacterial diversity in a specialized consortium for diesel oil degradation. **Revista Brasileira de Ciências do Solo** v.43, p. 773-781, 2010.

PANDEY, A; WEBB, C; SOCCOL, C. R; LARROCHE, C. Enzyme Technology. 1. ed. New Delhi: **Asiatech Publishers**, p. 760, 2005.

PANDEY, J; HEIPIEPER, H. J; CHAUHAN, A; ARORA, P. K; PRAKASH, D; TAKEO, M; JAIN, R. K. Reductive Dehalogenation Mediated Initiation of Aerobic Degradation of 2-chloro-4-nitrophenol (2C4NP) by *Burkholderia sp. strain SJ98*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92 p.597-607, 2011. Disponível em: < <http://dx.doi: 10.1007/s00253-011-3254-y>>.

PEREIRA Jr. N; COUTO, M. A. P. G; SANTA ANNA, L. M. M. (2008). **Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery**. In **Series on Biotechnology**, Ed. Amiga Digital UFRJ, Rio de Janeiro, v.2, 45 p.

PEREIRA, R. M; SILVEIRA, E. L. D. A; CARARETO, A. L. M; LEMOS, E. G. M. Avaliação de Populações de Possíveis Rizobactérias em Solos Sob Espécies Florestais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 1921-1927, 2008.

PEREIRA, R. M; SILVEIRA, É. L; SCAQUITO, D. C; PEDRINHO, E. A. N; VAL-MORAES, S. P; WICKERT, E; CARARETO-ALVES, L. M; LEMOS, E. G. M. Molecular characterization of bacterial populations of different soils. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 439-447, 2006.

PÉREZ, J; MUÑOZ-DORADO, J; DE LA RUBIA, T; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin. **International Microbiology**, v. 5, p. 53 – 63, 2002.

PESSI, S. I. **Estudo de consórcios microbianos na degradação da celulose** 2009. (Trabalho de Graduação)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2009.

ROMANO, N; GIOFFRÉ, A; SEDE, S. M; CAMPOS, E; CATALDI, A; TALIA, P. Characterization of cellulolytic activities of environmental bacterial consortia from an Argentinian native forest. **Current Microbiology**, v. 67, p.138-147, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00284-013-0345-2>>.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 279 – 291, 2003.

SCHWARZ, W. H. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 634-649, 2001.

SHI, J; SHARMA-SHIVAPPA, R. R; CHINN, M. S. Microbial pretreatment of cotton stalks by submerged cultivation of *Phanerochaete chrysosporium* for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 4388–4395, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.10.060>>.

SILVA, K. S. F. **Degradação de resíduos sólidos agrícolas por microrganismos isolados de bagaço de cana e seu percolado, e de afluentes de agroindústria**. 2008. Dissertação (mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Federal de Alagoas, Alagoas, 2008.

SINGH, A; HAYASHI, K. Microbial cellulase, protein architecture, molecular properties and biosynthesis. **Advances in Applied Microbiology**, v. 40, p. 1- 44, 1995.

SOUZA, H; OLIVEIRA, L; ANDRADE, J. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v 28, p. 116-124, 2008.

SUN, H; ZHAO, P; GE, X; XIA, Y; HAO, Z; LUI, J; PENG, M. Recent advances in microbial raw starch digesting enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 988-1003, 2010.

TAMURA, K; PETERSON, D; PETERSON, N; STECHER, G; NEI, M.; KUMAR, S; MEGA 5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731-2739, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi:10.1093/molbev/msr121>>.

TREVORS, J. T (1996) Genome size in bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 69, p. 293-303. 1996. Disponível em: < <http://dx.doi:10.1007/BF00399618>>.

URIBE, D; MARTINEZ, W; CERÓN, J. Distribution and diversity of cry genes in native strains of *Bacillus thuringiensis* obtained from different ecosystems from Colombia. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 82, p. 119 -127, 2003.

VAL-MORAES, S; VALARINI, M; GHINI, R; LEMOS, E. G. M; CARARETO, A. L. M. Diversidade de bactérias de solo sob vegetação natural e cultivo de hortaliças. **Ciência Agrônômica**, v. 40, p. 7-16, 2009.

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

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

WANG, W; YAN, L; CUI, Z; GAO, Y; WANG, Y; JING, R. Characterization of a microbial consortium capable of degrading lignocellulose. **Bioresource Technology**, v.102, p. 9321-9324, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi:10.1016/j.biortech.2011.07.065>>.

WETLER-TONINI, R. M. C; REZENDE, C. E; GRATIVOL, A. D. Biodegradação bacteriana de petróleo e seus derivados. **Revista Virtual Química**, v. 3, p. 78-87, 2011.

WILSON, D. B. Cellulases and biofuels. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 295-9, 2009.

WONGWILAIWALIN, S; LAOLHANACHREON, T; MHUANTONG, W; TANGPHATSORNRUANG, S; EURWILAICHI, L; IGARASHI, Y; CHAMPREDA, V. Comparative metagenomic analysis of microcosm structures and lignocellulolytic enzyme systems of symbiotic biomass-degrading consortia. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 8941–8954, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.10.1007/s00253-013-4699-y>>.

WOO, S. W; CHO, J.S; HUR, B. K; SHIN, D.H; RYU, K. G; KIM, E.K. Hydrogen peroxide, its measurement and effect during enzymatic decoloring of Congo red. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.13, p. 773-777, 2003.

YAMAMOTO, K; MATSUMOTO, T; SHIMADA, S; TANAKA, T; KONDO, A; Starchy biomass powered enzymatic biofuel cell based on amylases and glucose oxidase multi immobilized bioanode. **New Biotechnology**, v. 30, p. 531-535, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.10.1016/j.nbt.2013.04.005>>.