

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

FÁBIO LINO SOARES JÚNIOR

**Descrição e caracterização de uma nova β -N-acetil-hexosaminidase
(GH3) por metagenômica de solo de manguezal**

Piracicaba

2015

FÁBIO LINO SOARES JÚNIOR

**Descrição e caracterização de uma nova β -N-acetil-hexosaminidase
(GH3) por metagenômica de solo de manguezal**

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

**Tese apresentada ao Centro de Energia
Nuclear na Agricultura da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Doutor
em Ciências**

**Área de Concentração: Biologia na Agricultura
e no Ambiente**

Orientador: Prof. Dr. João Lucio de Azevedo

**Co-Orientador: Prof. Dr. André O. de Souza
Lima**

Piracicaba

2015

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Soares Júnior, Fábio Lino

Descrição e caracterização de uma nova β -N-acetil-hexosaminidase (GH3) por metagenômica de solo de manguezal / Fábio Lino Soares Júnior; orientador João Lucio de Azevedo; co-orientador André O. de Souza Lima. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.

81 p. : il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Biodiversidade 2. Ecossistemas de mangue 3. Enzimas celulolíticas
4. Matéria orgânica do solo 5. Metagenoma I. Título

CDU (631.465 + 575.111) : 631.461.6

*Ao meu Pai Fábio L. Soares e
minha Mãe Marcia I. Soares.
Dedico.*

*Aos que me concederam a oportunidade
de carreira, por acreditarem em meu
potencial de trabalho: Dr. Itamar Soares Melo,
Dr. Fernando Dini Andreote e Dr. João Lúcio de Azevedo.
Ofereço.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Pai Fábio L. Soares (Fubeka), minha Mãe Marcia I. Soares (D. Marcia), minha irmã Jéssika I. Soares (Keka), e Deus, pessoas com extrema importância, os quais constituem a minha Família estando sempre ao meu lado em todas as horas da minha história.

A minha namorada Bárbara Suave (Bá), pelo seu amor, apoio, companheirismo, amizade, enfim por participar de maneira afetiva das minhas conquistas.

Ao meu grande amigo Prof. Dr. Fernando Dini Andreote, pela amizade, ensinamentos, e principalmente agradeço a sua compreensão e confiança em meus potenciais.

Ao amigo Dr. Itamar Soares de Melo, por ter concedido a oportunidade de iniciar minha carreira nas dependências do Lab. de Microbiologia Ambiental-LMA (Embrapa Meio Ambiente), além de ser um exemplo de alegria e espontaneidade com seu jeito de viver a vida.

Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, pela sua prestatividade, atenção, força de vontade em colaborações, além da confiança e oportunidade de trabalho concedida junto a sua equipe do Lab. de Genética de Microrganismos.

Ao Prof. Dr. Jorge Luiz Mazza Rodrigues, pelo seu excelente exemplo de pessoa, pelos ensinamentos, conselhos e amizade concedidos no tempo de convívio, durante o período sanduiche em seu laboratório na University of Texas at Arlington – TX.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. André O. de Souza Lima, pelas dicas, ensinamentos e contribuições neste trabalho.

A Profa. Dra. Valéria Maia e Prof. Dra. Suzan P. Vasconcellos, pela oportunidade de trabalho no projeto temático o qual este trabalho esteve vinculado.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA/USP, pela oportunidade de desenvolver o Doutorado, além dos funcionários da SPG: Neuda, Fábio, Daiane, Sonia e da Biblioteca: Marilia, os quais sempre se apresentaram dispostos a ajudar com seriedade, confiança, agilidade e dignidade.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pelo apoio financeiro.

Aos amigos, pessoas especiais com participação no desenvolvimento deste trabalho: Joelma Marcon (Jô), Rodrigo G. Taketani (Kani Kani) e Júlia R. Ottoni (Julin.), deixo o meu sincero agradecimento pela amizade, risadas, dificuldades, nervosismos, enfim todas etapas importantes que passamos juntos, ao longo de nossos trabalhos de Pós-Doutorados e Doutorados.

Aos técnicos/colegas de laboratório, Fernandinho, Denise e Zezo, pelo apoio diário e contribuição positiva em nossos trabalhos.

Aos amigos de Dept. de Solos e do Lab. de Solos e Nutrição de Plantas (Esalq/USP), que trabalharam em conjunto ao longo do desenvolvimento deste trabalho, em especial os meus sinceros agradecimentos para os amigos de todas as horas: Marcus Venicius (Polé), Pedro Andrade (Manco), Diogo Costa (Moelinha), Armando C. F. Dias (Véi), Cristiane C. Fasanella (Cris), Juliana Piedade (Ju.-english).

Aos amigos da Embrapa Meio Ambiente - CNPMA, João (“peraumpouquinho”) e sua esposa Magali, a minha colega Natalia Franco (Naty), meu colega Tiago Zucchi, meu amigo Alexandre Sereda (Ale.) e ao meu amigo/parceiro de pesca Leonardo Silva (Léo).

Enfim agradeço a todos os amigos que contribuíram de maneira positiva e sincera para realização deste trabalho, muito obrigado.

*(...) A ciência conseguiu juntar,
o mangue com o mundo (...)
Malungo - Nação Zumbi*

RESUMO

SOARES JUNIOR, F. L. **Descrição e caracterização de uma nova β -N-acetil-hexosaminidase (GH3) por metagenômica de solo de manguezal.** 2015. 81 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

Bactéria e fungos são as principais fontes de enzimas envolvidas na transformação de compostos chave para o fluxo de carbono em solos de manguezal, caracterizado por alta prevalência de anaerobiose, salinidade e elevado teor de matéria orgânica. A decomposição de plantas ou resíduos de animais nestas condições é muito lenta, devido à pressão seletiva sobre a evolução de enzimas envolvidas nos processos de mineralização de nutrientes. A metagenômica, permitiu o acesso a grande maioria da diversidade microbiana no ambiente, por meio da geração de bibliotecas de clones, o que resulta em um cenário promissor para bioprospecção de novas atividades enzimáticas. Neste estudo, foi relatada a descrição e caracterização de uma nova β -N-acetil-hexosaminidase (EC 3.2.1.52) da família GH3, envolvida na degradação da matéria orgânica em solo de manguezal contaminado por derramamento de óleo localizado no município de Bertioga-SP, por meio de uma triagem de 12.960 clones metagenômicos. O clone positivo para a atividade celulolítica foi sequenciado e um total de 1.175.586 reads foram gerados com tamanho médio de 198 pb. As sequências foram trimadas com base na qualidade de índice PHRED \geq 30.0, e remoção de sequências do hospedeiro (*E. coli*) e do vetor (fosmídeo), originando um contig final com 39.586 Kb. Entre as ORF's anotadas a partir do contig gerado, uma sequência de 1.065 nucleotídeos foi identificada como codificante para a enzima β -N-acetil-hexosaminidase, evidenciando baixa similaridade (32 %) com as demais encontradas nos bancos de dados comparativos. A enzima foi expressa e purificada, onde uma banda isolada foi visualizada por SDS-PAGE com massa molecular prevista de 43 kDa. Por fim, as atividades ótimas da enzima (30 °C; pH 5.0; 0.5 M de NaCl; diminuição de atividade após 3hs de incubação) foram caracterizadas por meio do indicador p-nitrophenol (*pNP*) ligados aos substratos GINac, GalNac e Glc. A detecção da enzima por meio da metagenômica, evidenciou que os manguezais são reservatórios de novas enzimas com características diferenciadas e altos potenciais de aplicabilidades biotecnológicas.

Palavras-chave: Enzimas. Bioprospecção. SDS-PAGE. Triagem. Fosmídeo.

ABSTRACT

SOARES JUNIOR, F. L. **Description and characterization of a novel β -N-acetylhexosaminidase (GH3) by metagenomic mangrove soil.** 2015. 81 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

Bacteria and fungi are major sources of enzymes involved in the transformation of key compounds for the carbon fluxes on mangrove soils, characterized by the high prevalence of anaerobiosis salinity and high content of organic matter. The decomposition of plant or animals residues under these conditions is very slow, acting as a selective pressure on the evolution of enzymes involved in the mineralization process of nutrients. Metagenomics has provided access to the vast majority of the microbial diversity in the environment through the generation of fosmid libraries, resulting in a promising scenario for bioprospection enzymatic activities. In this study, we report the description and characterization of a novel β -N-acetylhexosaminidase (EC 3.2.1.52) of GH3 family, involved in the degradation of organic matter in mangrove soils contaminated by oil spill located in the city of Bertioga-SP through of a *screening* of 12.960 metagenomic clones. The positive clone for cellulolytic activitie was sequenced and a total of 1.175.586 reads were generated with measuring size 198 bp. The sequences were trimmed based on the index of quality PHRED ≥ 30.0 and removing the sequences to host (*E. coli*) and vector (fosmid) resulting in a contig of 39.586 Kb. Between the anoted ORF's from generated contig a sequence of 1.065 nucleotides was identified coding for a β -N-acetylhexosaminidase showing low similatrity (32 %) with the other found in comparatives databases. The enzyme was expressed and purified where an isolated band can be visualized by SDS-PAGE with molecular mass of 43 kDa. Finally, as optimum activity of the enzyme (30 °C; pH 5.0; 0.5M NaCl; decreased activity after 3 h incubation) were characterized by the indicator p-nitrophenol (*pNP*) linked to the substrates GINac, GalNac and Glc. The detection of the enzyme through metagenomics indicated that mangroves are reservoirs of novel enzymes with different characteristics and high potential for biotechnological applicability.

Key-words: Enzymes. Bioprospecting. SDS-PAGE. *Screnning*. Fosmid.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 DESENVOLVIMENTO	17
2.1 Objetivo.....	17
2.1.1 Objetivos específicos	17
2.2 Revisão da literatura	18
2.2.1 O ambiente mangue	18
2.2.2 Enzimas microbianas.....	20
2.2.3 Avanços nas pesquisas enzimáticas	23
2.2.4 Microbiologia molecular: acesso a biodiversidade microbiana não cultivável ..	24
2.2.5 Descrição de enzimas utilizando-se bibliotecas metagenômicas	26
2.2.6 Celulose	27
2.2.7 Glicosil hidrolases (GH3): β -N-acetil-hexosaminidase (EC 3.2.1.52)	30
2.3 Material e Métodos	32
2.3.1 Amostragem do manguezal	33
2.3.2 Obtenção da biblioteca metagenômica	35
2.3.3 Triagem da atividade celulolítica	37
2.3.4 Extração do DNA fosmidial dos clones positivos.....	37
2.3.5 Preparo das amostras para o sequenciamento via Ion Torrent.....	37
2.3.6 Montagem e anotação dos contigs	38
2.3.7 Análise da enzima identificada	40
2.3.8 Amplificação, clonagem e transformação	40
2.3.9 Purificação por 6xHis-tagged.....	42
2.3.10 Ensaio enzimáticos	43
3 RESULTADOS.....	45
3.1 Prospecção do clone positivo para a atividade celulolítica.....	45
3.2 Sequenciamento via Ion Torrent e análises dos fosmídeos positivos	46
3.3 Análise da modelagem proteica	50
3.4 Clonagem e purificação da β -N-acetil-hexosaminidase (EC 3.2.1.52).....	53
3.5 Caracterização enzimática	54
4 DISCUSSÃO.....	61
5. CONCLUSÕES.....	68
REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

A descrição de novas enzimas é fator chave para sua ampla utilização industrial. Tradicionalmente, diversas enzimas foram descritas como originadas a partir de células ou extratos de materiais vegetais e animais (SCHMIDT; PENNACCHIOTTI, 2001). Dentre os usos destas moléculas, destacam-se os relacionados aos mecanismos de ação e suas propriedades biológicas, o que faz do aprofundado estudo de enzimas uma ferramenta importante nos diversos segmentos indústrias, como a medicina analítica, fármacos, alimentos, agroquímicos, detergentes, intermediários químicos, biomateriais, biocombustíveis e mineração (BOMMARIUS; RIEBEL, 2004; ZHANG et al., 2005). A vasta importância da utilização de enzimas em diversos setores industriais se refere a sua excelente aplicação, no aceleração de reações químicas atuando como catalisadores biológicos, diminuindo o consumo energético, minimizando a formação de subprodutos e consecutivamente gerando baixos custos e impactos ambientais (NASCIMENTO et al., 2007). Logo, com o avanço do conhecimento na microbiologia, tornou-se possível a obtenção de enzimas a partir de células microbianas, sendo algumas destas obtidas de forma exclusiva destes microrganismos, e capazes de desempenhar atividades não encontradas em enzimas de animais e plantas (SILVA; LACERDA, 2003).

Os produtos gerados por microrganismos dependem diretamente das suas vias metabólicas, sendo estes produtos divididos em primários, que são considerados as macromoléculas como coenzimas: produtos intermediários ou finais de vias metabólicas; e secundários: produtos não essenciais as atividades metabólicas que incluem os antibióticos, pigmentos, toxinas dentre outros compostos que aparentemente não interferem no desenvolvimento do microrganismo, porém podem ser aproveitados pelo homem, agregando importantes valores econômicos (SERAFINI et al., 2002).

A alta taxa de “redescoberta” de produtos naturais, principalmente metabólitos secundários a partir de microrganismos que podem ser cultivados em laboratórios, atualmente, tem levado à ideia de que esta “fonte inestimável” de produtos naturais possa se esgotar, onde esta informação contribuiu de maneira a agregar maiores interesse e preocupação na conservação dos diferentes ambientes, dos quais,

podemos acessar uma determinada comunidade microbiana, responsável pelas reações químicas de interesse (TAN; ZOU, 2001).

Além de serem considerados fonte de produtos naturais, os microrganismos apresentam papel fundamental na manutenção dos ciclos vitais, onde designam funções como a ciclagem de nutrientes, e a degradação de compostos orgânicos que resultam na interação destes com os demais organismos presentes no ecossistema (SILVA et al., 2003). Neste contexto, de maneira a exemplificar o fato descrito vinculado a um ecossistema, podemos destacar como importantes ecossistemas, os manguezais.

Localizados nas planícies de inundação das marés, os manguezais caracterizam-se por ser um ecossistema muito rico em matéria orgânica, em contrapartida, compõem um dos ambientes naturais mais degradados, decorrentes de sérios impactos ambientais antropogênicos. Berçários de vida, com importância dada a sobrevivência de diversas espécies de animais e vegetais, os manguezais sofrem deficiência de alguns nutrientes, especialmente o nitrogênio e o fósforo. Uma alta taxa de suprimento desses nutrientes está relacionada à atividade bacteriana, que em manguezais transformam a vegetação morta em fontes nutricionais que podem ser assimilados, posteriormente pelas plantas (BASHAN; HOLGHIN, 2002).

Isto justifica a importância dos microrganismos neste ambiente, atuando diretamente na disponibilização destes nutrientes. No entanto, as frações funcionais da comunidade microbiana presente nos manguezais ainda são pouco conhecidas e estudadas. Mesmo com o desenvolvimento de técnicas de estudo de ecologia microbiana independente de cultivo, a maioria dos estudos acessa apenas a diversidade destas comunidades, focando as análises em genes ribossômicos, como 16S, e inferindo sobre alterações na composição destas comunidades (MARGOLIN; NAVIA, 2001).

Desta forma, por meio do estudo da metagenômica funcional, o presente trabalho de pesquisa tem como objetivo, correlacionar as informações salientadas, através do projeto de detecção e caracterização de genes codificadores de enzimas relacionadas à degradação da celulose, a partir das comunidades microbianas existentes nos manguezais do Estado de São Paulo.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Objetivo

O objetivo geral deste trabalho foi detectar e caracterizar enzimas com capacidade celulolítica do ecossistema de manguezal do estado de São Paulo (Bertioga) utilizando bibliotecas metagenômicas. Dessa forma, busca-se contribuir para um conhecimento mais aprimorado sobre a diversidade funcional da microbiota responsável pela degradação de carbono ainda pouco explorada neste bioma.

2.1.1 Objetivos específicos

- Realização da triagem de genes envolvidos na degradação de celulose, através da avaliação da atividade endoglicolítica e exoglicolítica na biblioteca metagenômica, construída pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Valéria Maia de Oliveira (CPQBA/UNICAMP - SP);
- Sequenciamento dos insertos metagenômicos dos clones positivos para as atividades avaliadas;
- Anotação da sequência dos insertos positivos, descrevendo os genes/enzimas sintetizadores para degradação de fontes de carbono, oriundos do ambiente de manguezal;
- Inferir sobre a caracterização dos mesmos utilizando-se de softwares de bioinformática e comparação das sequências obtidas com as disponíveis em banco de dados da internet;
- Clonagem dos genes codificadores em vetores de expressão gênica e otimização de sua produção;
- Extração e purificação das enzimas detectadas;
- Caracterização de condições ótimas para as atividades detectadas (pH, temperatura, salinidade e estabilidade enzimática).

2.2 Revisão da Literatura

2.2.1 O ambiente mangue

O ecossistema manguezal apresenta-se amplamente distribuído geograficamente, cobrindo cerca de 60 a 75 % da linha costeira mundial. O Brasil, Indonésia e Austrália são os países mais abundantes em ecossistemas de manguezais, sendo que só na América Latina, encontram-se cerca de 400.000 hectares (LOUWS et al., 1999). O Brasil tem uma das maiores extensões de manguezais do mundo, desde o Cabo Orange no Amapá, até o município de Laguna em Santa Catarina, abrangendo uma área de 25.000 Km² (SCHAEFFER-NOVELLI et al., 2000).

No Estado de São Paulo, na região da baixada santista, formada pelos municípios de Bertioga, Cubatão, Guarujá, Itanhaém, Mongaguá, Peruíbe, Praia Grande, Santos e São Vicente, encontram-se uma das maiores concentrações de manguezais do Estado, apresentando uma área de cobertura vegetal de 675 Km², sendo que 125 Km² desta área correspondem a áreas típicas deste ecossistema.

Em relação a cobertura vegetal por espécies nativas nos manguezais no Estado de São Paulo, podem ser citadas: *Rhizophora mangle* (mangue vermelho), *Avicennia schaueriana* (mangue preto) e *Laguncularia racemosa* (mangue branco). Correlacionando estas espécies com as características visuais encontradas em diferentes regiões do Estado, é nitidamente expressa a configuração na estrutura do tronco das árvores, folhas e raízes, com a situação de alagamento, decorrentes das ações das marés. Contudo, no âmbito de aprofundamento na pesquisa sob a ação em respostas das atividades microbianas presentes em tal ambiente, é sabido que o efeito rizosférico presente nas espécies citadas, proporciona a pressão de seleção de grupos microbianos específicos, capazes de auxiliar no desenvolvimento dessas espécies vegetais no ambiente correlacionado (DIAS et al., 2009).

A importância deste ecossistema reside na grande produtividade biológica com alta diversidade de peixes, crustáceos, moluscos, aves, répteis e mamíferos, sendo um dos ambientes mais produtivos do mundo. Toda esta diversidade exige uma alta disponibilidade de nutrientes no início da cadeia trófica (SÁ; MELO, 2008). Neste ponto surge a importância da atividade microbiana, que é a principal via de ciclagem de nutrientes dos manguezais, atuando pelos processos de decomposição

da matéria orgânica e de fixação de nutrientes (ZAHARAN, 1997). Neste ecossistema, as bactérias e os fungos constituem 91 % da biomassa microbiana total, enquanto as algas e protozoários representam apenas 7 e 2 %, respectivamente (ALONGII, 1998; ZHANG et al., 2005). Devido a esta grande abundância, é possível formular a hipótese de que na ausência ou redução da microbiota, poderá acarretar prejuízo nas atividades ecológicas, possivelmente resultando na destruição dos manguezais.

Pode-se dizer que as comunidades microbianas formam a base da cadeia alimentar da flora e fauna deste ecossistema, o que torna o ambiente altamente dependente dos microrganismos. Dessa forma, a atividade microbiana é responsável pelas grandes transformações nutricionais nos mangues, como exemplo, as bactérias heterotróficas que desempenham importantes funções neste sistema, principalmente devido as suas características pectinolíticas, celulolíticas, amilolíticas, lipolíticas e proteolíticas (LERESCHE; MEYER, 2006). De maneira geral, esta microbiota possui a capacidade de degradar compostos lignocelulósicos, que nos manguezais são encontrados em folhas e cascas de árvores (HOLGUIN, 2001). Além disso, a microbiota do mangue, recebe fontes de carbono, fixado a partir da atmosfera, e oferecido pela vegetação, principalmente através da matéria orgânica disposta sobre o sedimento (PARALES; HADDOCK, 2004). Nesse contexto, as bactérias envolvidas em processos de transformação de compostos essenciais são também responsáveis pela maior parte do fluxo de carbono em sedimentos de manguezais, através da decomposição e mineralização de nutrientes (HOLGHIN et al., 2001).

O metabolismo das diferentes fontes de carbono pela atividade microbiana em manguezais, tem desta forma duas moléculas finais, que são o gás carbônico e o metano (HANSON; HANSON, 1996). A emissão de CO₂ no sedimento é realizada por bactérias redutoras de sulfato, enquanto que o metano é gerado por microrganismos metanogênicos (THAUER; SHIMA, 2006). Considerando estes fatores como entre os principais vivenciados no ambiente de manguezal, temos que esse ambiente apresenta condições ambientais únicas, uma combinação de sedimentos anaeróbios, redutores e com salinidade variando de 4 a 30 % (ZAHARAN, 1997), onde possivelmente se desenvolve uma microbiota única, capaz de realizar diferentes funções, mesmo em contraste com condições inóspitas ou extremas de sobrevivência.

Sob um enfoque biotecnológico, os microrganismos que vivem neste ambiente podem ser fontes de novas enzimas com potencial biocatalítico, devido às condições climáticas em que sobrevivem, produzindo enzimas que são ativas em alta salinidade e condições flutuantes de disponibilidade de oxigênio (BOMMARIUS; RIEBEL, 2004; VU et al., 2004). Mais especificamente, a capacidade de microrganismos de manguezais em produzir esterase, lipases e outras enzimas foi avaliada por Dias e colaboradores (2009), evidenciando também as diferenças entre as atividades enzimáticas em manguezais contaminados em comparação com manguezais em estado natural. Outros estudos demonstraram, através de ensaios de degradação de celulose, que a atividade bacteriana celulolítica em manguezais pode variar de acordo com a concentração da salinidade local (REJMANKOVA; HOUDKOVA, 2006). O trabalho desenvolvido por Sá e Melo (2008), salientou ainda a maior presença de biofilme e a menor atividade endoglifolítica em isolado da rizosfera de *Rhizophora mangle*. Desta maneira, este ambiente ainda apresenta uma importante fonte de novas pesquisas enzimáticas a serem caracterizadas e utilizadas em processos industriais.

2.2.2 Enzimas microbianas

As enzimas são biomoléculas protéicas que atuam como catalisadores biológicos, intervindo em numerosos processos celulares, sendo geralmente produzidas em pequenas quantidades e possuindo assim funções específicas (RAJASEKARAN et al., 2008). Segundo Perez e Carreño (2007) uma das principais funções das enzimas é a viabilização das atividades celulares, clivando moléculas ou proporcionando a sua junção, para formação de novos compostos, onde as singularidades apresentadas nos compostos originados a partir de reações enzimáticas decorrem de um elevado grau de similaridade e reações catalíticas de especificidades aos substratos. Schmidt e Pennacchiotti (2001) descrevem como uma das vantagens de enzimas que atuam como catalisadores, a propriedade de se manterem nas mesmas concentrações não alterando o seu equilíbrio químico após o término da reação.

As atividades catalítica enzimática depende da conformação proteica originária, envolvendo fatores como resíduos de aminoácidos ou componentes químicos chamados de cofatores. Os cofatores podem ser divididos em íons inorgânicos, tais como Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} ou Zn^{2+} , ou moléculas orgânicas conhecidas por coenzimas descritas como aceptores ou doadores de átomos, ou até mesmo, grupos funcionais absorvidos do substrato em uma determinada reação enzimática (YU et al., 2011).

Pelo fato de serem consideradas proteínas estruturais com diferentes conformações, as enzimas são dotadas de dobramentos tridimensionais em suas cadeias polipeptídicas, o que proporcionam formas e características exclusivas (SCHMIDT; PENNACCHIOTTI, 2001). Devido a esta complexa estrutura molecular, as enzimas possuem uma inerente labilidade que às vezes é um impedimento para o seu uso. Por isso, para conseguir a estabilidade e atividade requerida de uma enzima é preciso levar em conta fatores ambientais como a temperatura, o pH e a presença de compostos químicos os quais podem ativar ou inibir suas funções (SHANMUGAM et al., 2008).

A tecnologia de desenvolvimento de novas enzimas é baseada em processos que necessitam de praticidade, rapidez e baixo custo, onde esta produção recebe uma grande importância no mercado mundial, auxiliando na economia e gerando um capital aproximado de 1,5 bilhões de dólares por ano (RAJASEKARAN et al., 2008). A maioria das enzimas que são utilizadas comercialmente são pertencentes aos grupos das proteases (59 %), carboidrases (28 %) e lipases (3 %), sendo que as restantes enzimas comerciais (10 %) são utilizadas em análises posteriores que não dependam de uma ação rápida (MALAJOVICH, 2009). Todos estes complexos enzimáticos apresentam-se amplamente distribuídos entre os microrganismos dos mais distintos ambientes, principalmente por terem grande importância no funcionamento dos ecossistemas aquáticos e terrestres, sendo essenciais em diversos processos, como a ciclagem de matéria orgânica (WILSON, 2009). Estima-se que existam na natureza mais de 25.000 enzimas, porém estudos revelam que somente 2.800 delas tornam-se acessíveis através dos microrganismos cultiváveis, sendo uma pequena fração de 400 destas, utilizadas comercialmente (SERAFINI et al., 2002). No entanto, uma grande fração de complexos enzimáticos presentes em comunidades microbianas em diferentes ambientes ainda é pouco conhecida e estudada.

Entre as enzimas de origem microbiana, destacam-se aquelas produzidas por bactérias e fungos, sendo estas as mais utilizadas por possuírem condições ideais de síntese, grandes estabilidades e ampla especificidade aos substratos, oferecendo assim maiores facilidades no seu uso e na modificação dos processos para otimização da produção industrial (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

As enzimas produzidas por microrganismos podem ser do tipo intracelular quando atuam dentro das células que as produziram, ou extracelular quando produzidas em maiores concentrações e quando secretadas ao meio, as quais são utilizadas em processos industriais devido a sua capacidade de digerir diversos materiais poliméricos, como exemplo, a celulose, amidos e proteínas cujos monômeros são utilizados como nutrientes de absorção pelos microrganismos (CARRERA, 2003; CARVALHO et al., 2009). Vale ressaltar, que a síntese de enzimas em pequenas quantidades ocorre durante a fase de crescimento do microrganismo, pois durante a fase de latência são acumulados muitos compostos secundários, pouco significantes a uma determinada atividade (RAJASEKARAN et al., 2008).

Dentre as atividades enzimáticas desempenhadas pelos microrganismos em relação a sua defesa, pode ser citada a resistência a diferentes tipos de antibióticos que se encontram no meio, como exemplo, um grupo de bactérias produz a enzima β -lactamase, a qual hidrolisa o anel beta-lactâmico presente na estrutura da penicilina, criando resistência a um determinado antibiótico (ESSACK, 2001). Fungos colonizadores de tecidos de plantas, conhecidos por fungos endofíticos produzem enzimas hidrolíticas extracelulares, como mecanismos de resistência para superar as defesas do hospedeiro contra a invasão microbiana ou até mesmo para obtenção de nutrientes disponíveis no solo (TAN; ZOU, 2001). Sendo assim, o aprofundamento do conhecimento sobre as enzimas produzidas por fungos e bactérias, é de extrema importância para uma melhor compreensão do funcionamento e dos mecanismos de ação destas enzimas em relação aos diferentes substratos e ambientes onde podem atuar. Neste contexto surgem novas técnicas de pesquisas em ecologia microbiana, as quais visam à investigação da microbiota total, mais precisamente fungos e bactérias de um determinado ambiente aplicando-se estudos moleculares, como exemplo, a metagenômica (ZAEHNER; FIELDER, 1995).

2.2.3 Avanços nas pesquisas enzimáticas

Os processos biotecnológicos dependem essencialmente de matéria-prima biológica e de recursos naturais, como os microrganismos que são amplamente utilizados devido às suas moléculas e atividades funcionais (LIMA et al., 2001). Os recentes avanços na tecnologia de diferentes reações biológicas têm gerado notáveis melhorias na indústria biotecnológica, especialmente aos processos de caracterização de novas biomoléculas e à otimização de sua produção (PÉREZ; CARREÑO, 2007). Atualmente, a produção de enzimas a partir de microrganismos é bastante significativa devido às vantagens que oferece no processo de fermentação, estando relacionadas ao baixo custo e a obtenção de produtos derivados destas reações em pequeno espaço de tempo (SCHMIDT; PENNACCHIOTTI, 2001).

O desenvolvimento de novas fontes, métodos de isolamento, purificação e melhorias nos desenhos de reatores enzimáticos deram origem a chamada “engenharia enzimática”, uma nova área da biotecnologia (LI et al., 2012). Além disso, pode-se melhorar o rendimento de uma enzima modificando-se as condições ambientais, ou obtendo cepas mutantes mais eficientes na produção que as linhagens originais (SENTHILKUMAR; SELVAKUMAR, 2008). A ciência avançou gradativamente, em decorrência destas descobertas, de forma que técnicas como a metagenômica têm sido aplicadas na busca de novos biocatalizadores a partir de amostras ambientais. De maneira sucinta, esta técnica consiste na fragmentação de DNA total de uma amostra ambiental em tamanhos variados e a inserção destes genes em vetores apropriados para a sua multiplicação em laboratório, podendo ser acessado uma grande diversidade de genes funcionais, da microbiota não cultivável de um determinado ambiente (LORENZ; ECK, 2005).

Existem muitos modelos de estudo para biocatalizadores, porém no contexto enzimático, pesquisadores tomam por base as descrições das extremozimas, próprias de ambientes extremos. Um exemplo comumente utilizado em laboratórios que dispõe de técnicas moleculares, é a utilização da *Taq*-polimerase, descoberta a partir do microrganismo *Thermus aquaticus*, o qual foi isolado de um ambiente extremo com características inóspitas caracterizado pelo elevado pH, temperatura e pressão (CHIEN et al., 1976). Como reflexo destas descobertas, diversas linhas de pesquisa avançaram, contribuindo para uma melhor compreensão do funcionamento dos ecossistemas e seres vivos, como o isolamento de microrganismos presentes no

sistema digestivo de ruminantes e compostagem de resíduos agrícolas, onde estas enzimas previamente isoladas e testadas apresentam ótimos resultados na degradação de materiais lignocelulolíticos, constituídos por moléculas de alto peso molecular e de difícil digestibilidade (DUAN et al., 2009). Macedo e Pio (2005) demonstraram em seus estudos, que a partir de microrganismos patogênicos hospedeiros de plantas como *Fusarium oxysporium*, são obtidas enzimas como a quitinase, de grande utilidade na indústria farmacêutica e na produção de compostos químicos para agricultura. Dessa forma, acredita-se que com a aplicação de análises polifásicas (metodologias dependentes e independentes de cultivo) possam descrever novas genes, o que servirá como base para a seleção de novas enzimas e catalisadores a serem otimizados na degradação de diferentes compostos.

2.2.4 Microbiologia molecular: acesso a biodiversidade microbiana não cultivável

Metodologias moleculares desenvolvidas nas últimas décadas (extração de ácidos nucleicos, amplificação por PCR, clonagem e sequenciamento de DNA) têm sido otimizadas e adaptadas para superar as limitações impostas pela abordagem clássica de estudos de populações microbianas, de maneira a aperfeiçoar o clássico isolamento e cultivo dos microrganismos. A utilização destas metodologias vem permitindo uma mudança drástica no estudo da diversidade microbiana no ambiente e a descoberta de novos grupos de organismos, nunca antes cultivados (HUGENHOLTZ et al., 1998; RAPPÉ; GIOVANNONI, 2003). A aplicação de técnicas baseadas na detecção e análise da diversidade de ácidos nucleicos (DNA ou RNA) presentes em amostras ambientais é fundamental nos estudos de diversidade microbiana, principalmente por permitir a análise de maneira independente do cultivo microbiano, o que exclui todos os problemas e limitações devido à baixa culturabilidade das comunidades bacterianas em meios seletivos. Em bactérias, o gene 16S ribossomal (16S DNAr) é amplamente utilizado, sendo considerado uma importante ferramenta para o estudo de filogenia e ecologia microbiana (LOUWS et al., 1999).

O uso do gene 16S DNAr no acesso as comunidades microbianas de diferentes ambientes, revela a grande diversidade de microrganismos que deixa de ser explorada quando apenas os métodos baseados em cultivo são aplicados (HEAD et al., 1998; PROSSER et al., 2007). No entanto, o estudo focado em genes conservados como, por exemplo, o 16S DNAr, não fornece dados suficientes sobre a funcionalidade do grupo ou espécie microbiana no ambiente avaliado, mas apenas infere sobre características filogenéticas dos componentes das comunidades microbianas.

Em contrapartida o estudo do genoma da microbiota total encontrada em uma comunidade, chamados coletivamente de metagenoma (HANDELSMAN et al., 1998), pode fornecer um pacote de informações genéticas e funcionais mais robusto dos componentes de um ambiente. Dessa forma, dada a grande importância dos microrganismos em todos os sistemas biológicos, assim como seu inestimável potencial biotecnológico (KING et al., 2001; OSORIO et al., 2001), torna-se urgente a necessidade de métodos que permitam acessar a riqueza de informações contida no metagenoma dos diferentes biomas.

Em busca de informações mais relevantes e significativas, pesquisadores passaram a trabalhar com bibliotecas metagenômicas (clones, seqüenciamento e inserção de genes em vetores partindo-se de uma amostra composta de um determinado ambiente), sendo esta uma ferramenta muito eficaz dentro microbiologia molecular (BULL et al., 2000; HUGENHOLTZ et al., 1998; KIM et al., 2006). O uso da estratégia metagenômica permite ainda combinar o escrutínio de genes funcionais com a análise de seqüências relacionadas à filogenia, o que pode representar um mecanismo para se estabelecer relações entre filogenia e função microbiana, auxiliando na elucidação do papel ecológico dos componentes da microbiota no ambiente, possibilitando assim uma ampla descrição de compostos com importantes atividades biológicas (BALBAS; BOLIVAR, 1990; BUNTERGSSOK et al., 2010).

A técnica de construção e sequenciamento de bibliotecas de clones (bibliotecas metagenômicas) é uma ferramenta de alta sensibilidade no estudo de comunidades microbianas, tornando-se uma excelente estratégia para o acesso a biodiversidade ainda pouco explorada (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005; SIK et al., 2007). Por exemplo, utilizando desta técnica para estudos de comunidades bacterianas foi possível determinar a diversidade de bactérias que colonizam a

superfície de folhas de árvores na floresta Atlântica (LAMBALIS et al., 2006), de maneira similar pôde ser descrito o genoma da biomassa degradante no rúmen de vacas (HESS et al., 2011). Rubin (2008) salienta em sua revisão, sobre os avanços nas pesquisas e importância do estudo de genomas bacterianos para a obtenção de bicompostíveis. Outros autores também descrevem uma rara e inexplorada diversidade de espécies microbianas compondo estas comunidades, sendo possível a partir da técnica de metagenômica, identificar celulases bacterianas que são estáveis em líquidos iônicos (POTTKAMPER et al., 2009). Dessa forma, diversos grupos microbianos funcionais têm sido estudados por meio da clonagem e sequenciamento de *amplicons* provenientes de DNA de amostras ambientais.

Utilizando esta metodologia, o cenário para a descrição de novas enzimas atravessa uma fase de reformulação, onde se destacam duas frentes de pesquisa paralelas: uma frente que busca a descrição de novas enzimas em ambientes ainda pouco explorados, e outra frente que se baseia em modificar enzimas existentes através de métodos biotecnológicos, métodos conhecido por evolução dirigida (REETZ et al., 2001). Entretanto, ambas as abordagens dependem da inovação na estrutura de enzimas para as quais alguns genes codificadores já foram descritos. Assim, se considerarmos que se conhece apenas cerca de 1% dos microrganismos existentes na natureza, há ainda muita variabilidade disponível nos ambientes pouco explorados (BULL et al., 2000). Dessa maneira, a construção de bibliotecas metagenômicas a partir de amostras ambientais de locais pouco explorados constitui a mais promissora alternativa para acessar esta biodiversidade e potencial biotecnológico desconhecido, uma vez que pode englobar os genomas de microrganismos ainda pouco conhecidos e muito provavelmente não cultivados.

2.2.5 Descrição de enzimas utilizando-se bibliotecas metagenômicas

Têm-se publicado trabalhos cada vez mais aprofundados com base em bibliotecas metagenômicas, focando os estudos em atividades enzimáticas em ecossistemas distintos, como exemplo: solos desérticos, rúmen de bovinos, lodos ativados, mar Báltico e sedimentos de manguezais (BUNTERNGSOOK et al., 2010; HANDERMAN; SJOLING, 2007; LEE et al., 2004; SIK et al., 2007). Acredita-se portanto que as enzimas, como as celulases presentes em diferentes ambientes

possam conter características específicas que mantenham sua atividade e eficiência catalítica em condições de baixa disponibilidade de oxigênio, altos níveis de salinidade, variações de pH, baixas e altas temperaturas e baixos valores de potencial redox.

Existem na literatura diversos relatos de detecção e caracterização de genes codificadores de celulasas em bibliotecas metagenômicas de distintos ambientes (COUTO et al., 2010; HEALY et al., 1995; KIM et al., 2006; REES et al., 2003; VOGET et al., 2003). Sabe-se a partir de tais estudos, que ambientes distintos selecionam genes específicos que codificam para diferentes celulasas. Recentemente, novos genes codificadores para celulasas foram obtidos por meio de caracterização de clones metagenômicos de rúmen bovino (DUAN et al., 2009), tendo como característica marcante a funcionalidade em pH reduzido (3.5 a 4.5), que é uma condição habitual em tal ambiente. Assim, temos que as condições ambientais podem determinar alterações estruturais nos genes e conseqüentemente na codificação de enzimas, com diferentes características de funcionamento quando comparada com as demais enzimas de igual função já descritas.

2.2.6 Celulose

A celulose é um polímero linear formado por unidades de D-glicose que unidas por meio de ligações glicosídicas, formam cadeias longas e paralelas, insolúveis em água e com massa molecular que varia entre 50 mil e 2,5 milhões de Daltons. A unidade básica da celulose é a celobiose, a qual é formada pela junção de duas moléculas de glicose, que quando fusionadas causam a eliminação de água através das hidroxilas ligadas aos carbonos 1 e 4 (FENGEL; WENGER, 1989). Segundo Leschine (1995), a celulose é considerada o biopolímero mais abundante do ambiente terrestre, sendo fixada a quantidade de 10^{11} toneladas de CO_2 por ano na forma de celulose, principalmente via processo fotossintético. Esta abundância de celulose a torna importante em vários aspectos industriais, podendo servir como matéria-prima para a produção de vários outros compostos assim como para a produção de bioenergia.

No ano de 1981, Bisaria e Ghose propuseram a celulose como única fonte de energia renovável capaz de suprir a demanda da sociedade moderna em um longo período de tempo e de maneira sustentável. No entanto, por ser uma fonte complexa de carbono orgânico, e na maioria das vezes de alto peso molecular, a utilização da celulose requer ação de enzimas que auxiliam na sua degradação (TENGERDY; SZAKACS, 2003). Dessa forma, a viabilização de processos que degradam a celulose em condições variáveis de temperatura e pressão torna-se um desejo das indústrias para a geração de outras formas de açúcares a partir deste composto (ANGELO, 2004; LIANG et al., 2009).

Dentro deste contexto, as celulasas têm grande importância, pois tais enzimas constituem o grupo catalítico capaz de degradar a estrutura da celulose, sendo o segundo maior grupo de carboidrases exploradas comercialmente, principalmente devido à grande especificidade e eficiência de degradação encontrada neste grupo de enzimas (ANGELO, 2004). De modo geral, descartando-se enzimas com atividades intermediárias, as quais compõem também inúmeras famílias de enzimas, incluindo as Glicosil-Hidrolases, a degradação da celulose ocorre pela indução de três principais tipos de enzimas: endo-1,4- β -D-glucanase (endocelulase), exo-1,4- β -D-glucanase (exocelulase) e β -glucosidase (celobiase) (HAMADA et al., 1999) (Figura 1).

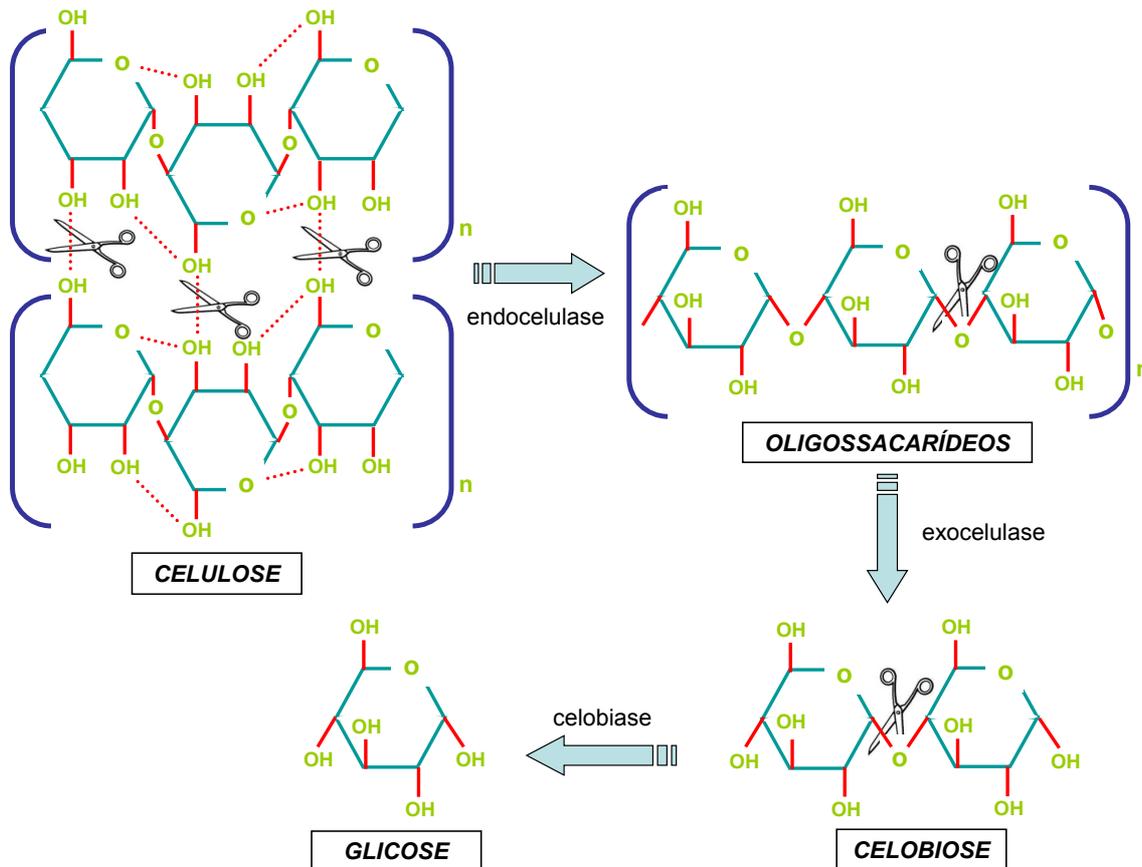


Figura 1 - Modelo ilustrativo da estrutura da molécula de celulose e sua degradação até glicose devido a atividade de endocelulases, exocelulases e celobiasas

As enzimas chamadas de endoglucanases ou endocelulases representam um grupo de celulasas ativas na clivagem de regiões internas e aleatórias da celulose, gerando oligossacarídeos de tamanhos variados. As exocelulases ou exoglucanases são também conhecidas como celodextrinases, e atuam nos terminais das cadeias de oligossacarídeos gerados pelas endocelulases, liberando glicose ou celobiose (NG et al., 2009). Desta maneira, as celulasas com o rompimento de ligações glicosídicas da celulose, e liberação de oligossacarídeos, esta forma são utilizadas para melhoria na digestão da celulose (CRUZ et al., 2010; DILLON, 2004).

Os microrganismos celulolíticos conhecidos estão alocados filogeneticamente dentro dos domínios Bacteria e Eukarya. As bactérias celulolíticas descritas estão alocadas principalmente dentro dos filós *Actinomycetales*, *Clostridiales* e *Firmicutes* (LYND et al., 2002). Em relação aos fungos, os principais eucariotos celulolíticos,

estes estão compreendidos nos filos *Basidiomycota*, *Ascomycota*, *Zygomycota* e *Chytridiomycota* (DUNCAN et al., 2008). No entanto estas listas não são permanentes, sendo a descrição de novos grupos de microrganismos celulolíticos bastante freqüente na literatura.

O complexo enzimático responsável pela degradação deste composto apresenta-se amplamente distribuído entre os organismos dos mais distintos ambientes, principalmente por ter grande importância no funcionamento dos mais diversos ecossistemas. Dessa forma, a busca de genes relacionados a enzimas com atividade celulolítica em diferentes ambientes, e que contribuam em algum momento para essa degradação é de grande interesse, visando ampliar a base genética sobre a qual se baseiam os processos biotecnológicos que utilizam a celulose como matéria-prima (WILSON; BRIMBLE, 2009).

2.2.7 Glicosil Hidrolases (GH3): β -N-acetil-hexosaminidase (EC 3.2.1.52)

β -glucosidade (EC 3.2.1.21), xylan 1,4- β -xylosidase (EC 3.2.1.37), β -glucosilceramidase (EC 3.2.1.45), β -N-acetylhexosaminidase (EC 3.2.1.52), α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), glucan 1,3- β -glucosidase (EC 3.2.1.58), glucan 1,4- β -glucosidase (EC 3.2.1.74), isoprimeverose-produzindo oligoxyloglucan hidrolase (EC 3.2.1.120), coniferin β -glucosidase (EC 3.2.1.126), exo-1,3-1,4-glucanase (EC 3.2.1.-) e β -N-acetylglucosaminide phosphorylases (EC 2.1.1.-), são responsáveis pela composição atual do complexo enzimático que constitui a Família 3 das Glicosil Hidrolase (CAZY_ <http://www.cazy.org/GH3.html>).

As chamadas Glicosil Hidrolases ou Glicosidases (EC 3.2.1.-) são conhecidas devido a sua importância na capacidade de assimilar substratos de cadeias ramificadas de alto peso molecular, demonstrando atividades através de suas reações glicosídicas, nas quebras das ligações covalentes entre carbonos oriundos de monossacarídeos, como exemplo a glicose (BOJAROVÁ; KREN, 2009). Decorrente de sua importância no âmbito da hidrólise e síntese de açúcares, as Glicosil Hidrolases (GHs), são juntamente com as Glicosil Transferases (GTs), as duas principais classes de catalisadores responsáveis pela modificação de hidratos de carbono na natureza (TRINCONE; GIORDANO, 2006).

A classe das GHs é composta por diferentes famílias, as quais são subdivididas por numeração, compreendida de 1 a 133. Esta subdivisão entre famílias foi imposta após a realização de estudos enzimáticos de especificidades frente a diferentes substratos, levando-se também em consideração o fato de não possuírem uma determinada semelhança entre os aminoácidos presentes em suas cadeias. Estas implicações levaram ao aprofundamento nos estudos sobre as atividades desta importante classe enzimática, onde pode ser demonstrado qual o tipo de atuação das GHs nas ramificações de cadeias glicosídicas, as quais são atuantes nas extremidades (exo) ou na porção mediana (endo) das cadeias ramificadas (PERUGINO et al., 2004). Desta maneira, as glicosil hidrolases podem ser nomeadas como enzimas multifuncionais com diferentes domínios catalíticos.

Glicosil Hidrolases de família 3 (GH3), são conhecidas por constituírem um grupo de enzimas pertencentes a classe das β -glicosidases (BGLs), grupo este considerado heterogêneo em suas atividades, por se tratar de um grupo de função variada responsável por catalisar regiões não redutoras presentes em sacarídeos (SEEBERGER, 2008). Muitas BGLs, foram descritas a partir de comunidades microbianas, atuantes em processos biológicos com respostas sinérgicas (endo e exo-atividades) a diferentes substratos de difíceis reduções presentes na natureza, como exemplo na conversão da celulose, até chegarem em formas mais simples de monossacarídeos como a glicose (LIU et al., 2012).

A celulose juntamente com a quitina, são considerados os compostos orgânicos mais abundantes na natureza, formados por polissacarídeos estruturais de difícil degradação. Em ecossistemas marinhos, como exemplo o manguezal, estes compostos se apresentam disponíveis, em deposição misturada ao sedimento, através de fontes como, casca e folha de árvores, carapaça/exoesqueleto de crustáceos, entre outros. A atenção a degradação destes compostos, é dada a importância da ciclagem destes nutrientes, garantindo a vitalidade da fauna e flora do ecossistema manguezal. Para tanto, microrganismos como bactérias e fungos são responsáveis por disponibilizarem seus mecanismos enzimáticos de degradação, para facilitar este processo.

No âmbito das descobertas de reações, que auxiliam nesta etapa da ciclagem de diferentes nutrientes, estudos avançam gradativamente na descrição de novas enzimas microbianas, capazes de assimilar compostos de cadeias ramificadas e alto pelo molecular como exemplo a celulose. Nesta linha de raciocínio um pequeno

grupo de enzimas nomeada como β -N-acetil-hexosaminidase (EC 3.2.1.52), pertencentes a família GH3 das β -glicosidases, é constituinte de importantes características de degradação de compostos como a celulose. Recentemente Mayer e colaboradores (2006), relataram uma β -N-acetil-hexosaminidase a partir de *Cellulomonas fimi*, uma importante bactéria possuidora de uma ampla especificidade a substratos celulolíticos, capaz de clivar ligações β -glicosídicas, atacando o centro do grupo carboxil do substrato anomérico, através da catálise ácida.

β -N-acetil-hexosaminidase, foi relatada a alguns anos atrás, mesmo de desconhecendo suas propriedades. Contudo com o passar dos anos foram recebendo sua importância por atuarem em outras funções biológicas no ambiente como, potentes mecanismos de defesa de plantas em respostas a atividades fúngicas, degradação lisossomal de glicoproteínas e glicolípídeos (SCHLUMBAUM et al., 1986; ARONSON; KURANDA, 1989) além de auxiliar no crescimento bacteriano, utilizando-se de sacarídeos derivados desta degradação. Todas essas pesquisas se fundamentam pela necessidade de crença em que possamos descobrir muitos outros mecanismos de ação desta importante enzima. Mesmo sendo ainda pouco compreendida entre as β -glicosidases, β -N-acetil-hexosaminidase recebe uma posição privilegiada em pesquisas ao longo dos anos, por processar substratos tanto gluco- como galacto-, e não se fixando estritamente a clivagem de hexoses como o seu nome demonstra (BALCEWICH et al., 2009; YUZWA et al., 2008; TEWS et al., 1996).

2.3 Material e Métodos

A parte experimental do trabalho contou com o apoio dos Laboratórios e Departamentos: Genética de Microrganismos - ESALQ/USP, Ciências do Solo - ESALQ/USP, Laboratório de Microbiologia Ambiental - EMBRAPA Meio Ambiente - CNPMA e Department of Life Sciences - UTA/USA (período sanduíche).

2.3.1 Amostragem do manguezal

No presente trabalho foram avaliadas amostras de sedimentos do manguezal do Estado de São Paulo, localizado no município de Bertioga (23°53'49"S, 46°12'28"W).

Realizamos a coleta das amostras que originaram as bibliotecas metagenômicas, contando com o apoio da equipe técnica da Embrapa Meio Ambiente - CNPMA, no âmbito do Projeto "Biodiversidade e atividades funcionais de microrganismos de manguezais do Estado de São Paulo" (Processo FAPESP nº 04/13910-6). Sedimentos foram coletados no manguezal amostrado (Figura 3), a uma profundidade considerada de 30cm, em três pontos amostrais, usando tubos de polipropileno esterilizados, os quais contribuem a evitar o mínimo de entrada de ar nas amostras. A coleta foi realizada no decorrer de um transecto, previamente delineado, considerando-se a posição intermediária entre o Mar/Rio e o continente. Ao longo dos três pontos onde ocorreram as coletas, as amostras foram coletadas em triplicata, originando um total de 9 amostras. Os pontos de coleta se diferenciam da seguinte maneira: 1º - próximo ao Rio Iriri, Rio este que é banhado diretamente pelo mar, recebendo ativamente a água salgada e realizando a sua troca nos períodos de marés (cheia e vazante); 2º – região central, ou mediana do transecto; 3º – localizada nas proximidades do continente (Figura 2). Após a coleta, as amostras foram refrigeradas e posteriormente, levadas ao laboratório onde cada ponto, foi homogeneizado originando uma amostra composta de cada localidade, para iniciar o processo de extração de DNA total.

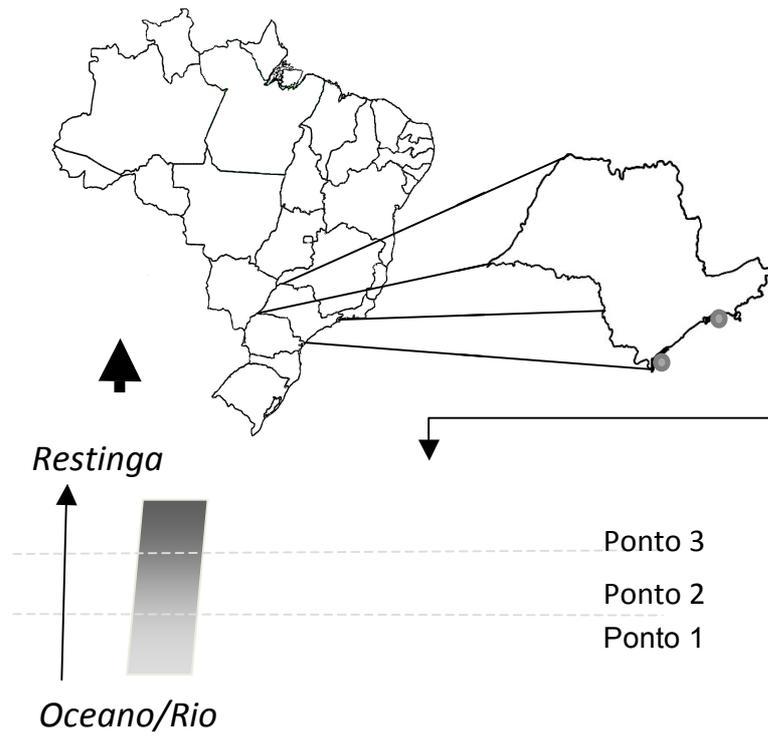


Figura 2 - Localização do manguezal e pontos amostrados



Figura 3 - Imagem de área de manguezal estudado. Foto: Fábio L. Soares Jr., premiada no concurso MO BIO 2013 Photo Winner!

2.3.2 Obtenção da biblioteca metagenômica

Esta etapa do trabalho foi desenvolvida pela equipe de pesquisa da Profa. Dra. Valéria Maia de Oliveira (CPQBA/Unicamp – SP). Este trabalho, originou uma biblioteca metagenômica com um total de 12,960 clones fosmidiais, com tamanho médio de inserto de 20 a 40 Kb.

De maneira sucinta, a metodologia utilizada foi a mesma descrita anteriormente por Vasconcellos et al. (2010) para a construção de bibliotecas metagenômicas a partir de microbiota recuperada de reservatórios de petróleo, podendo contar também com o auxílio das orientações do fabricante do kit “Cloning-Ready Copy Control pCC2FOS” (Epicentre®) (Figura 4).

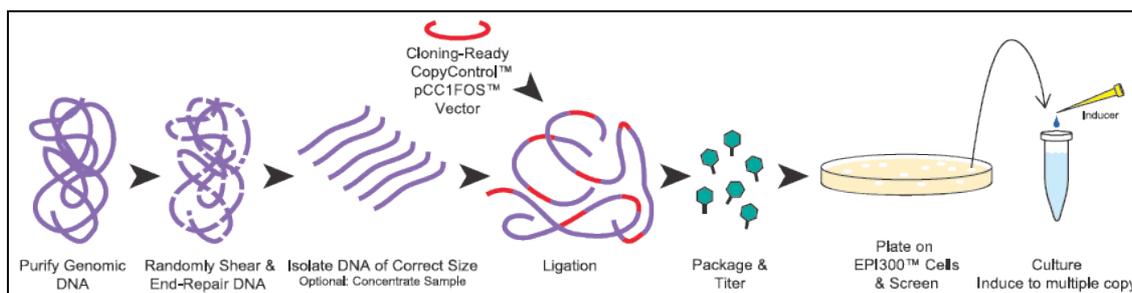


Figura 4 - Etapas envolvidas na construção da biblioteca metagenômica, segundo o fabricante: “CopyControl™ Fosmid Library Production” (Epicentre)

Com o intuito, de prevenir possíveis contaminações da biblioteca metagenômica original construída, foi realizado uma cópia para preservação, para posterior utilização na etapa de triagem das atividades enzimáticas de interesse. Para a etapa de preservação, os clones foram replicados em placas de 96 poços (TPP®), preenchidas com 150 µL de meio LB, adicionados de 12,5 µL/mL de cloranfenicol, onde posteriormente um total de 135 placas, foram armazenadas em freezer sob temperatura controlada de -80 °C.

2.3.3 Triagem da atividade celulolítica

A partir da biblioteca metagenômica previamente construída, a avaliação da atividade enzimática correlacionada à degradação de celulose pode ser realizada. É sabido que a degradação da celulose ocorre de maneira peculiar e conta com um conjunto de enzimas, de diferentes famílias e grupos, contudo, a etapa inicial de rompimento das cadeias de polissacarídeos ocorre, pela ação direta de três principais enzimas, sendo elas: endoglucanase, exoglucanase e celobiase. Sendo assim, o triagem das atividades endoglicolítica e exoglicolítica foi verificada, de acordo com a metodologia descrita a seguir:

Atividade endoglicolítica: os clones foram cultivados em meio mínimo de sais (1 litro de água destilada - 0,5 g de NaNO₃; 1,0 g de K₂HPO₄; 0,5 g de MgSO₄.7 H₂O; 0,01 g de FeSO₄; 1,0 g de extrato de levedura) sólido suplementado com CMC - Carboximetilcelulose 1 % (p/v) e incubados a 37 °C por 48 horas. Após o crescimento bacteriano, foi adicionada as placas solução de iodo (2,0 g de KI e 1,0 g de iodo em 300 ml de água destilada), as quais foram incubadas por um período de 5min. a temperatura ambiente. Após a lavagem das placas com NaCl 5 M (KASANA et al., 2008), halos incolores ao redor da colônia puderam ser observados, indicando produção e secreção de endoglucanases.

Atividade exoglicolítica: os clones foram cultivados em meio mínimo de sais (1 litro de água destilada - 0,5 g de NaNO₃; 1,0 g de K₂HPO₄; 0,5 g de MgSO₄.7 H₂O; 0,01 g de FeSO₄; 1,0 g de extrato de levedura) suplementado com Avicel 1% (p/v) e incubados a 37 °C por 48 horas. A produção de exoglucanases, que degradam seus substratos, gerando formas assimiláveis de carbono, foi confirmada pelo crescimento das colônias após o repique.

Os clones que apresentaram as características de atividade endoglicolítica e exoglicolítica foram reavaliados posteriormente, onde as etapas descritas anteriormente foram repetidas por duas vezes consecutivas, com o intuito de confirmação ou ausência da atividade testada.

2.3.4 Extração do DNA fosmidial dos clones positivos

Uma vez identificados os clones codificadores de celulases, iniciou-se o trabalho de identificação dos mesmos, sendo o primeiro passo a extração do DNA fosmidial, realizada de maneira minuciosa com relação ao crescimento/purificação ideal e volume final necessário para extração. Sendo assim, primeiramente, foi realizada a reativação dos clones estriando por esgotamento/purificação os mesmos em placas de Petri, contendo meio de cultura Luria Bertani (LB) sólido, com acréscimo de 12,5 µg/ml de cloranfenicol e incubados em B.O.D. a temperatura média de 37 °C. Após 12 h de crescimento, foi retirada uma única colônia isolada para inoculação em tubos contendo 5ml de meio LB líquido com 12,5 µg/ml de cloranfenicol (cultura “starter”) e incubados em shaker a temperatura média de 37 °C. Decorridos 12 h de crescimento, foi inoculado 1 ml da cultura “starter” em erlemeyers contendo 500 ml de meio LB líquido com 12,5 µg/ml de cloranfenicol, sob agitação em shaker a 37 °C, durante o período de 8 h. A partir deste crescimento final, as células/pellets foram recolhidas por centrifugação a 6.000 *ref.* por 15 min. à 4 °C, sendo este material usado para a extração do DNA fosmidial, realizada com o Kit Qiagen Large-Construct, seguindo recomendações do fabricante. Após obtenção do DNA fosmidial, as amostras foram quantificadas via Qubit™, utilizando-se o Kit Quant-iT™ dsDNA BR assay (Fluorometric Quantitation - Invitrogen).

2.3.5 Preparo das amostras para o sequenciamento via Ion Torrent

O sequenciamento de DNA via Ion Torrent (Life Technologies, EUA), caracteriza-se como sequenciamento de nova geração, que possui um custo de corrida relativamente baixo, onde é possível a obtenção milhares de sequências a um custo baixo e em apenas 3 h. O preparo das amostras consiste em 2 etapas iniciais: construção da biblioteca e enriquecimento da amostra, sendo desenvolvidas de acordo com os protocolos disponíveis na “Ion Community”. A quantidade de cada amostra de DNA fosmidial foi de 1 µg eluído em 10 µl de H₂O deionizada esterilizada (100 ng/µl). Para a construção da biblioteca foi utilizado o *Kit ION Xpress DNA Fragment Library*, que é constituído das seguintes etapas: *i) Fragmentação;*

ii) *Purificação*; iii) *Ligação dos Barcodes/Adaptadores*; iiiii) *Amplificação*. Após a construção da biblioteca, foi utilizado o *Kit ION Xpress™ Template v2.0*, para realização do enriquecimento das amostras utilizando o “mini robô” ION Touch, o qual faz a ligação dos beads metálicos (semicondutores) com os fragmentos marcados com barcodes específicos. Somente após a construção e enriquecimento, foi realizado o sequenciamento, utilizando um *chip 316*, com capacidade para gerar até 100 Mb de sequências (reads), com tamanho médio variando entre 50 à 200 pb.

2.3.6 Montagem e anotação dos contigs

O processo de montagem e anotação dos reads obtidos após o sequenciamento via plataforma Ion Torrent, foi realizado pela análise separada dos conjuntos de dados através do software CLC Genomics Workbench-Qiagen products (<http://www.clcbio.com/products/clc-genomics-workbench/>) e RAST Server – Rapid Annotation Using Subsystem Technology (<http://rast.nmpdr.org>). A montagem dos contigs, consiste na organização computacional de regiões fragmentadas do DNA, que origina os chamados reads.

A montagem foi realizada de maneira minuciosa, levando em consideração todas as possíveis alterações nos parâmetros de análise de dados, na busca por sequências de melhor qualidade. Neste caso, na primeira etapa de montagem, os reads obtidos foram importados para o software CLC, seguido do comando de leitura da qualidade das sequências, através da ferramenta FASTQC. Vale ressaltar, que esta ferramenta foi utilizada em todas as fases de curadoria das sequências, incluindo a remoção inicial de sequências menores que 100 pb. A segunda parte, foi conduzida pela remoção dos adaptadores e barcodes utilizados na separação e ligação das beads metálicas no *chip 316* utilizado, através da trimagem das sequências, juntamente com o mapeamento dos reads por referência com respectiva remoção de sequências vinculadas a pCC2FOS (seq. fosmidial) e EPI-300 (seq. E.coli). Após as etapas de curadoria e mapeamentos realizados, a montagem do contig final foi continuada através da ferramenta “*denovo assembly*”, utilizando os seguintes parâmetros de leitura: i) Cost Mismatch: 2; ii) Interaction Cost: 3; iii) Deletion Cost: 3; iiiii) Fraction Length: 0.3; iiiiii) Similarity Fraction: 0.6 (Figura 5).

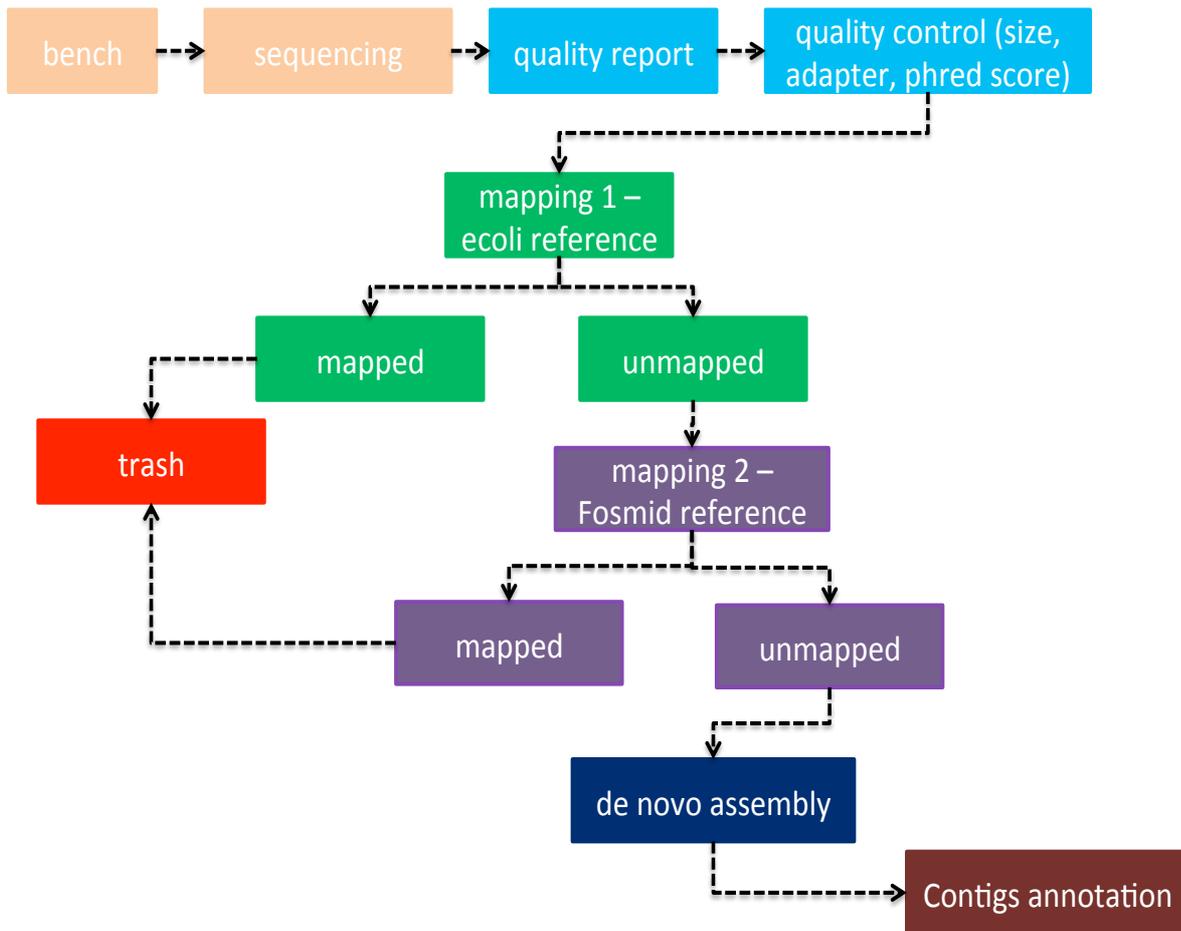


Figura 5 - Workflow/Pipeline construído para realização das análises de curadoria das sequências e montagem dos contigs. O trabalho inicia na extração do DNA do clone positivo (bench) e finaliza com a etapa de anotação da sequência (Contigs annotation)

A anotação dos genes presentes no contig construído, tomou por base contigs com tamanho não inferior a 10 kb, o que aumenta a confiabilidade na identidade dos genes alvo deste estudo, contribuindo de maneira positiva na confirmação e estudo das atividades e relações filogenéticas dos genes anotados. O entendimento sobre a relação da enzima anotada com sua respectiva função, foi realizado com o auxílio comparativo de cada ORF (*Open Reading Frame*) anotada por blastx, contra os bancos de dados com enfoque proteico: NCBI, PDB (Protein Data Bank) e SwissProt database (ALTSCHUL et al., 1990), revelando assim a ocorrência de diferentes ORF'S em um mesmo contig.

2.3.7 Análise da enzima identificada

Na intenção de avaliar a constituição e potencial de novidade da β -N-acetil-hexosaminidase – Nag_Mgrv-Met, a sua sequência primária foi comparada via blastx (ALTCHUL et al., 2005) na base de dados GenBank de proteínas não redundantes (NCBI – National Center for Biotechnology Information). Análises paralelas incluíram a recuperação de possíveis 30 sequências enzimáticas com maiores semelhanças para avaliação de sua filogenia, usando o algoritmo distância de Grishin para estimativa da divergência (GRISHIN, 1997), podendo ser avaliado através da construção de árvores filogenéticas rápidas com mínimos evolutivos (PRICE et al., 2009). Adicionalmente, os domínios funcionais da família GH3 foram reconhecidos através do CD-Search no NCBI (MARCHLER-BAUER et al., 2015) e CDART – arquitetura de domínios (GEER et al., 2002). Além disso, a presença de sinal da secreção, pode ser avaliada por SignalP 4.1 (PETERSEN et al., 2011).

Com o objetivo de determinar a estrutura da proteína e potenciais sítios ativos, modelos tridimensionais foram preditos usando Swiss-Model (BIASINI et al., 2014) e Phyre (KELLEY; STERNBERG, 2009). A qualidade do modelo obtido, foi avaliado utilizando-se o GMQE – Global Model Quality Estimation (BIASINI et al., 2014), Ramachandran plot (RAMACHANDRAN et al., 1963; LOVELL et al., 2003) e o método de modelo único ProQ2 (RAY et al., 2012). Por fim, o reconhecimento dos sítios catalíticos com possíveis diferenciações foram implementados via Phyre2 (FURNHAM et al., 2014).

2.3.8 Amplificação, clonagem e transformação

A fim de se obter a correta amplificação da enzima anotada (β -N-acetil-hexosaminidase), tomamos por base a sequência de nucleotídeos disponível através dos resultados anteriores, e o estudo do genoma que compõem o vetor que seria utilizado para clonagem, valendo-se da importância do posicionamento das sequências, com relação as enzimas de restrição a serem utilizadas. Para tanto foi desenhado o conjunto de primers, que corrobora com os resultados obtidos:

- **BeHexo_F_express:** 5'TATAAAAAAGCTTGGATGACCTTGCCCCGAAGG3' HindIII

- **BeHexo_R_express:** 5'ATAATACTCGAGTCAGGATTGGGGCGGATTC3' XhoI.

Após o desenho e síntese dos primers, a reação de PCR foi determinada pelos parâmetros: 94 °C por 3 min., 35 ciclos de 94 °C por 1 min., 60 °C por 30 s, 72 °C por 30 s e 4 °C end-forever. O produto da PCR foi purificado com o kit QiAquick PCR Purification (250) (Qiagen Sciences, Maryland, MD). Para confirmação do tamanho da banda/amplicon gerado, o produto da PCR foi carregado em gel de agarose 1 % com 1XTris-Acetate EDTA (TAE), com uma corrida contínua e controlada de 80 V por 40 min., usando o equipamento PowerPac™ Basic (Biorad, Hercules, CA). Após o tempo determinado os resultados da banda desejada foi visualizada sob luz UV com auxílio do equipamento GelLogic 212 PRO Carestream (Carestream Health, New Haven, CT).

Após confirmação da amplificação, o produto da PCR e o vetor a ser utilizado (pET28a), foram clivados na mesma região, pela reação controlada de 37 °C por 2 h e reação de inativação de 65 °C por 15 min, utilizando-se das mesmas enzimas de restrição escolhidas por estudo inicialmente (HindIII e XhoI) (New England Biolabs, Ipswich, MA BioLabs). Com as sequências linearizadas clivadas, iniciou-se a ligação, a qual foi realizada em um volume total de 10 µl por reação usando: 1 µl de 10 X T4 DNA ligase buffer, 1 µl (400 U/µl) de T4 DNA ligase (New England Biolabs, Ipswich, MA), 5 µl do plasmídeo pET-28a linearizado e 3 µl do produto da PCR. A reação foi incubada a 16 °C overnight com auxílio do termociclador C1000 (Bio-Rad, Hercules, CA).

Na reação de transformação, 2 µl de Be_HEX e do plasmídeo da reação da ligação foram transformados em 50 µl de células E.coli competente (BL21 DE3), mantendo-se a reação em gelo por 1 min. Em seguida, o volume total foi transferido, aproximadamente 52 µl de células, para uma cuveta, onde esta foi submetida à eletroporação de 1.8 KV. Imediatamente, foi adicionado 1 ml de meio SOC (20 g de tripton; 5 g de extrato de levedura; 0,5 g de NaCl; 2,5 mM de KCl; pH 7.0; após autoclavar, foi acrescentado 10 mM de MgCl₂ e 20 mM de glicose) a cuveta e homogeneizada gentilmente. O volume total foi transferido para um tubo de 1.5 ml e incubado a 37 °C durante 1 h. Após este tempo, 100 µl da transformação foram plaqueados/estriados em meio de cultura sólido Luria-Bertani (LB) (HIMEDIA), contendo 50 µg/ml de kanamicina, seguido da incubação a 37 °C, overnight. As colônias de coloração branca de plasmídeos transformados, foram submetidas à extração do DNA usando o kit QiAprep spin miniprep (Qiagen Sciences, Maryland,

MD.), com o intuito de se realizar a triagem da atividade positiva de presença do inserto, utilizando-se os primers inicialmente sintetizados. Como confirmação dos resultados esperados, o Be_Hex extraído foi sequenciado como etapa final do triagem e confirmação real do trabalho desenvolvido, através do método de Sanger no laboratório Genomics Core Facility da University of Texas at Arlington - UTA.

2.3.9 Purificação por 6xHis-tagged

Despondo-se das condições de cultura do material preparado para purificação, uma única colônia (estriamento por esgotamento) da etapa de transformação foi isolada, e inoculada overnight a 37 °C, 240 rpm em 50 ml de meio de cultura LB suplementado com 50 µg/ml kanamicina. Após o crescimento delineado, a cultura de célula foi diluída para uma densidade ótica de 600 nm, utilizando o mesmo meio de cultura citado, porém implementado com 50 µl de IPTG indutor, e armazenado para crescimento sob as mesmas condições citadas, por um período de 2:45 h. Percorrido o tempo determinado para incubação, o volume total da reação foi centrifugado em tubos falcon sob as condições de 4 °C, 4,500 rpm, em 30 min. O sobrenadante foi separado do pellet e ambos armazenados em freezer -20 °C. O pellet foi eluído em 10 ml de tampão de lise (100 mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris-HCl; 8 mM Urea; pH 8.0 ajustado com NaOH), suplementado com 1 mg/ml de lisozima e incubado overnight a 4 °C. Após este tempo, o volume total foi separado em tubos de 1,5 ml para sonicação e centrifugação, nas condições controladas de 10.000 xg, 30 min, 4 °C, para concentrar e separar o sobrenadante (parte lisada clara, usando apenas um tubo falcon) e o pellet. A parte lisada clara foi filtrada através de uma membrana de celulose de 0.45 µl, então adicionado 1ml de suspensão ácida Ni-nitrilotriacetic (NI-NTA, Qiagen Sciences, Maryland, MD.). Esta mistura foi incubada em sala climatizada a 4 °C por 30 min usando um rotor end-to-end.

Com auxílio de uma coluna de 15 ml e coletando o que chamamos de flow-through, a enzima alvo (β -N-acetil-hexosaminidase) foi purificada por meio do fluxo gravitacional, seguindo especificações do fabricante (Polypropylene Columns, Qiagen Sciences, Maryland, MD.). O experimento foi conduzido pelo recolhimento de frações em tubos separados por fluxo de gravidade em diferentes pH's;

exemplificando: primeiro, tampão de lise (pH 8.0); duas vezes, tampão de lavagem (pH 6.3); quatro vezes, tampão de eluição (pH 5.9); quatro vezes, tampão de eluição (pH 4.5), usando o mesmo tampão de condições desnaturante (100 mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris-HCl; 8 mM Urea) porém com variações no pH. A proteína eluída foi sujeitas a trocas de tampão para condições nativas de suas propriedades (50mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 250 mM Imidazol; pH 8.0) e concentrada por centrifugação em filtro Amicon ultra-0.5 com 30 K cut-off (Millipore, Billerica, Massachusetts).

Todas as frações foram analisadas por SDS-PAGE. Para tanto, as amostras desejadas foram mixadas com tampão de amostra 5 X (em 10 ml buffer; 250 mM Tris-HCl pH 6.8, 500 mM DTT, 10 % SDS, 0.1 % bromophenol azul, 50 % glicerol), aquecidas a 95 °C por 10 min, corridas através do gel de 8-12 % SDS-PAGE (Nusep, Bogart, GA) em 1 X Tris-glicina tampão de corrida eletroforese (3.02 g Tris base, 14.4 g glicina, 1 g SDS em 1 L dH₂O) a 120 V por 1 hora, com auxílio do aparelho VWR Power source 300 V (VWR International, Radnor, PA). Após a corrida, o gel foi retirado cuidadosamente e corado overnight em 15 ml de coomassie azul brilhante - NuBlu Express stain (Nusep). O marcador molecular de proteína usado foi PageRuler broad 10-200 kDa (Thermo scientific, Waltham, MA). O gel foi visualizado sob luz branca fluorescente no aparelho GelLogic 212 PRO Carestream (Carestream Health, New Haven, CT). A concentração da proteína foi determinada pelo kit de quantificação de proteínas Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific, Pierce, Rockford, IL), o qual dispõe de albumina de soro bovino como padrão.

2.3.10 Ensaio enzimáticos

As atividades da enzima purificada β -N-acetil-hexosaminidase foram determinadas pela medição das variações aceitáveis nas faixas de temperaturas (10-60 °C), pH's (2-9), concentrações de molaridades salinas (0.5-2 M) e estabilidade/tempo de inativação, utilizando como padrão o p-nitrophenol com leitura de absorbância de 405 nm a partir da hidrólise de *pNP*-GlcNac (4-Nitrophenil- β -D-Glucopiranoside), *pNP*-GalNac (4-Nitrophenil- β -D-Galactopiranoside) e *pNP*-Glc (4-Nitrophenil- β -D-Glucoside) (Alfa Aesar, England) (BOJAROVA et al., 2008). Todos os testes foram conduzidos em 100 μ l de uma mistura de reação

contendo 0.5mM l^{-1} *pNP*-GlcNac ou *pNp*-GalNac, respectivamente, onde as reações foram interrompidas com a adição de $900\ \mu\text{l}$ de tampão borato de sódio $0.2\ \text{M l}^{-1}$, pH 10.5 (PARK et al., 2010). Uma unidade (U) de atividade da β -N-acetil-hexosaminidase foi definida como a quantidade de enzima produzida por $1\ \mu\text{mol l}^{-1}$ *pNP*, liberado por minuto.

Utilizando as condições padrões, primeiramente para detecção da temperatura ideal, os testes foram conduzidos usando tampão Tris-HCl, pH 6.8 por 30 min, sob temperaturas que variam de 10 a 60 °C. As amostras também foram submetidas, ao mesmo tratamento, porém para descrição das variações de pH suportáveis pela estabilidade da proteína nas faixas de pH 2.0 a 9.0 onde diferentes tampões foram utilizados: $50\ \text{mM l}^{-1}$ de tampão glicina-HCl (pH 2-4), $50\ \text{mM l}^{-1}$ de tampão sódio acetato (pH 4-6), $50\ \text{mM l}^{-1}$ de tampão sódio fosfato (pH 6-8) e $50\ \text{mM l}^{-1}$ de tampão Tris-HCl (pH 8-9), todas testes com tempo total de reação de 1 h, variando o pH a 0.5. Utilizando-se das condições ideais dos testes acima referidos, mensuramos também a variação suportada pela concentração de sal (NaCl) em contato com a proteína. Para tanto, os testes foram conduzidos nas faixas de molaridades que abrangem 0.5 a 2 M de NaCl, a 30 °C e média de pH 5.0. Por fim, finalizamos os testes enzimáticos através da medição da estabilidade por tempo de atividade da molécula, levando-se em consideração as três características citadas anteriormente e suas faixas ideais (30 °C; pH 5.0; 0.5 M), a proteína foi submetida ao período de tempo de 0 a 24 h.

3 RESULTADOS

A diversidade de microrganismos localizada em ecossistemas costeiros, como o manguezal, possui uma imensa variabilidade genética, responsável pela execução de funções características únicas. Dentre estas, os microrganismos destacam-se pela produção de enzimas extracelulares, as quais auxiliam na mineralização da matéria orgânica, resultando na modulação da ciclagem de nutrientes nos solos. Industrialmente, estas enzimas são exploradas em relação as suas características, atuando como importante matéria-prima e como catalisadores de reações químicas biológicas em grande escala e a baixo custo.

3.1 Prospecção do clone positivo para a atividade celulolítica

A partir dos 12.960 clones gerados pela construção da biblioteca metagenômica oriundos de solo de manguezal contaminado pelo derramamento de óleo, dois clones (114-F10 e 131-H9) apresentaram atividade positiva quando cultivados em meio seletivo enriquecido com carboxymethylcellulose (atividade endoglicolítica). A detecção para esta atividade foi confirmada por meio do surgimento de um halo de degradação ao entorno do clone cultivado na placa (Figura 6A). De maneira semelhante a atividade exoglicolítica do clone positivos (120-A4) foi detectada em meio de cultura seletivo, suplementado de celulose microcristalina (avicel). Em contrapartida a observação da atividade anterior, a confirmação da atividade exoglicolítica foi observada através do crescimento do clone replicado no meio seletivo, uma vez que esta não gera halo de degradação (Figura 6B). Vale ressaltar, que ambas as atividades tiveram suas confirmações realizadas, com repiques consecutivos após a observação positivas de atividade inicial.

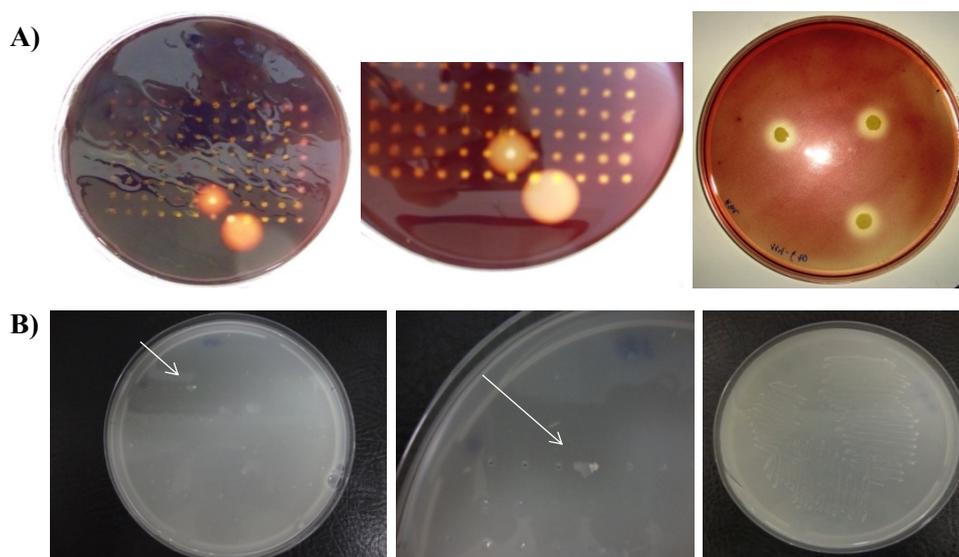


Figura 6 - Clones positivos para as atividades: **A.** Halos de degradação dos dois clones positivos para a atividade endoglicolítica. Os halos no entorno das colônias, indicam a atividade de degradação no meio seletivo carboxymethylcellulose. **B.** Crescimento detectado do clone para a atividade exoglicolítica. A seta branca indica o clone em meio seletivo Avicel

3.2 Sequenciamento via Ion Torrent e análises dos fosmídeos positivos

Com base nos resultados anteriormente descritos, os três clones positivos foram sequenciados num chip 316 do equipamento Ion Torrent, dando origem a uma cobertura de 86 % da capacidade total do chip, totalizando 3.486.208 sequencias com tamanhos médios de 198 pb, aproximadamente (Figura 7).

Run Summary

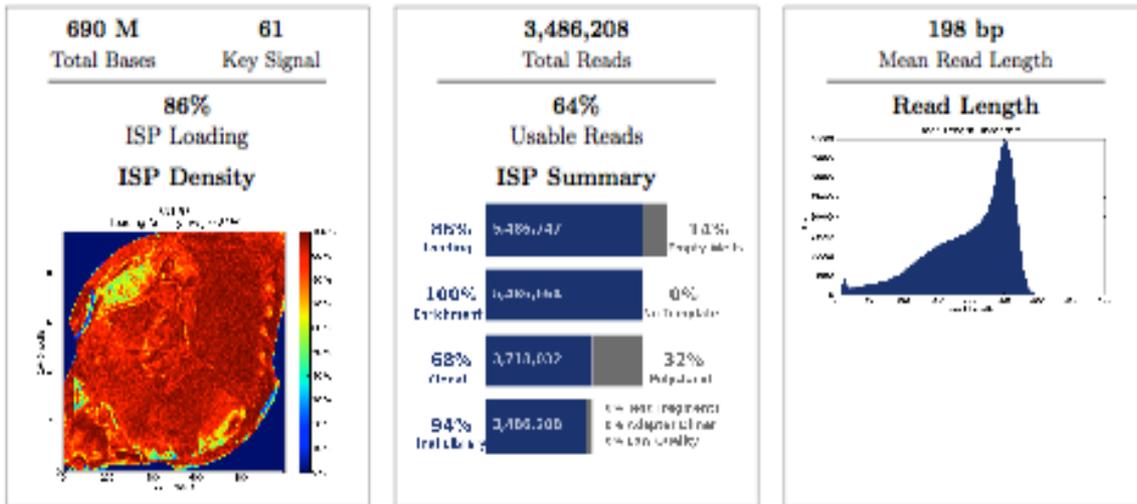


Figura 7 - No primeiro quadrante a esquerda é demonstrado a porcentagem de cobertura do chip 316 utilizado (86%), informação também observada pela coloração avermelhada. O quadro ao centro, indica o número total de sequencias geradas, considerando os três clones no mesmo chip. No quadrante da direita, salienta a informação a respeito do tamanho médio das sequencias geradas por meio do sequenciamento na plataforma Ion Torrent

Após a curadoria das sequencias oriundas dos clones ativos, foi obtido grupos de sequencias compostas contendo apenas sequencias validadas e não afiliadas a sequencias do vetor ou da bactéria hospedeira. Destas, apenas sequencias provenientes do clone 131-H9 (1.175.586 reads) deram origem a uma montagem com a qualidade desejada, após a curadoria e o “denovo assembly”, gerando um fragmento de tamanho aproximado de 39.586Kb. Vale ressaltar que o *scaffold* final é composto de 22 sequencias contiguas de tamanho médio entre 1.799 pb, sendo o maior contig de 22.143 kb (N50) e o menor 216 pb.

Com o resultado obtido do clone 131-H9, as sequencias componentes dos 22 contigs foram submetidas ao processo de anotação, que deu origem as chamadas ORFs (Open Reading Frames), anotadas por similaridade com as bases de dados PDB (Protein Data Bank) e SwissProt na plataforma RAST (Figura 8). No total, foram identificadas 18 ORF's. Entre as ORFs, ganhou destaque uma sequencia afiliada a um gene Nag_Mgrv-Met codificador de uma β -N-acetil-hexosaminidase (EC 3.2.1.52). Esta sequencia é composta de 1.065 nucleotídeos (com 58,5 % de GC), correspondentes a 355 aminoácidos:

(MetTLPQKAAQVLLLTVDGTTVIPSTEELLAEGPPGILLGHNVEGAEQARALTQGLQATASSSGSKLALFIAVDQEGGLVQRVHDGVPPEIPRARQLGQTSSPEEAAHLATETAKGLLALGVNMLAPVADVVTDPDSFLYPRTFGGDPEVVSFAFVSAVTEAYVRGGLISVVKHFPGHGSALGNTHGEAVVSEATEAEFDTVHLPFFRAAIAAGAQQGVMMAHIVAAYDDTRPASQSDIVIENLLRQELGFAGLVMSSDLEMAAATGLASANAGDNSDAAQVKAVGDAAVASINAGCDLLVCTGTLTRNLQVRNAIVTAVENGSSIPARLDEAVSAVLELKLEQQIARPPNPPQSStop).

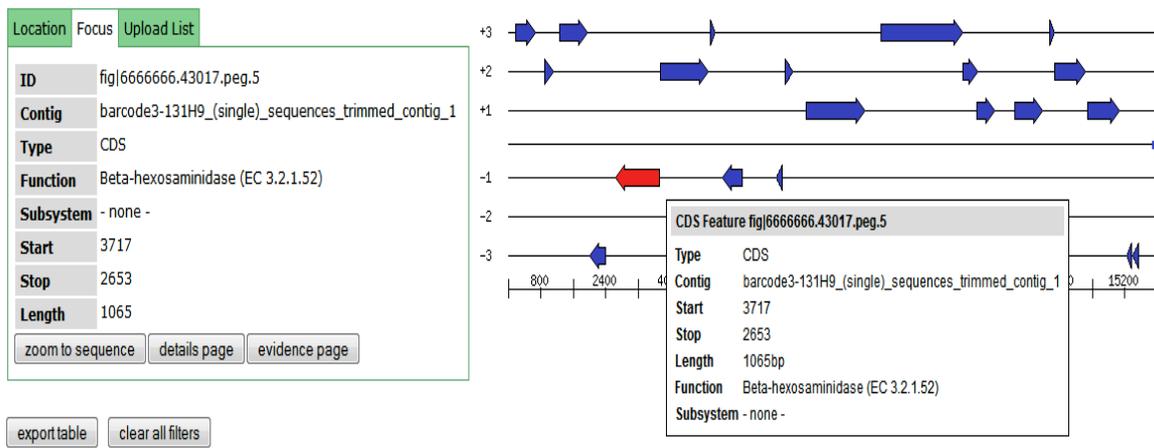


Figura 8 - Detecção positiva para CDS (Coding DNA Sequence) com atividade β -N-acetil-hexosaminidase (EC 3.2.1.52) (seta em vermelho), confirmação do frame completo da leitura e o tamanho da sequência (1.065pb)

Após detectada esta sequência, a confirmação de sua afiliação ao gene descrito foi feita por meio de comparação das sequências de aminoácidos com diferentes bases de dados proteicas. Primeiramente, foi realizada a confirmação de que a sequência do gene anotado estava completa, encontrando a localização do start códon no nt3717 e stop códon no nt2653 da sequência do contig. Esta confirmação foi feita tanto via base de dados SwissProt, como utilizando o algoritmo blastx na base de dados do GenBank, ou comparando a sequência com as depositadas na base de dados Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk>). Em todos os casos, a comparação da sequência de aminoácidos nas bases de dados destes resultados confirma a elevada cobertura (98 %), porém com baixa identidade (32 %), com uma enzima nomeada por β -N-acetil-hexosaminidase (EC 3.2.1.52), pertencente ao grupo das glicosil hidrolases (BglX), de domínio multifuncional de transporte e metabolismo de carbono, com homologia com a superfamília das

enzimas GH3 (CAZY_ <http://www.cazy.org/GH3.html>) (Figura 9). Outra variável explorada a partir da sequência obtida é a proximidade da sequência com as sequências depositadas nos mesmos bancos de dados. Estas análises indicaram a baixa identidade (38 %) da sequência obtida com as demais afiliadas a β -N-acetil-hexosaminidase. Estes resultados sugerem que a enzima codificada pelo gene descrito pode ser indicada como uma nova β -N-acetil-hexosaminidase.

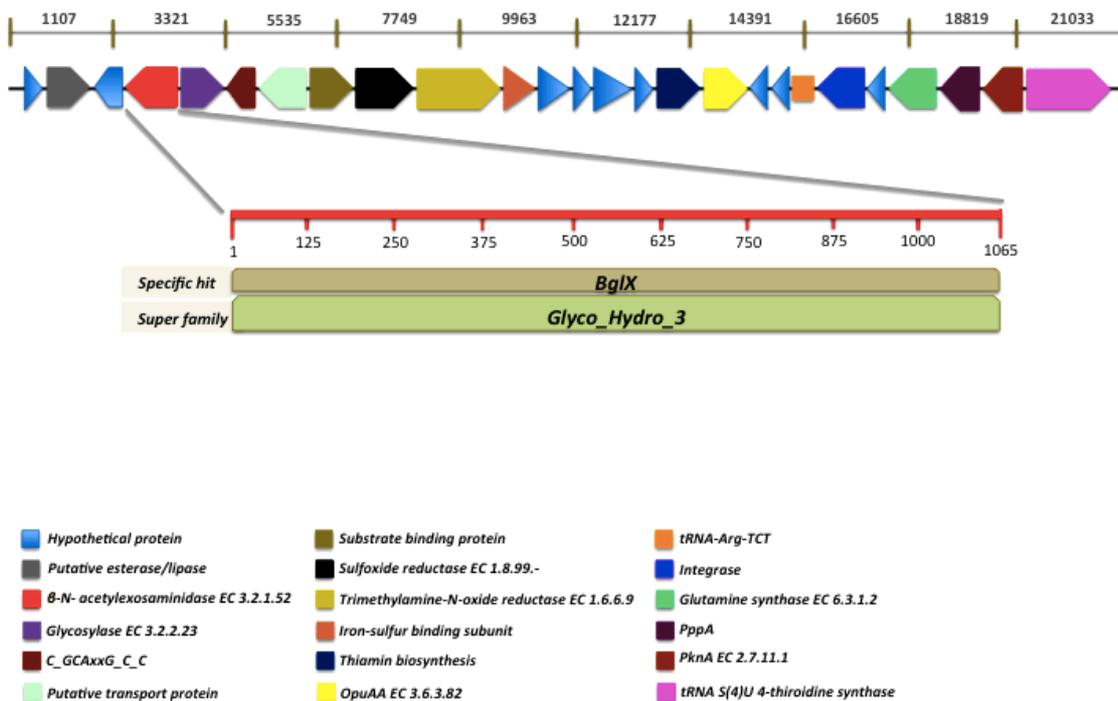


Figura 9 - Anotação das ORFs pertencentes ao maior contig mapeado (22.143 pb). As setas em colorido mostram a orientação (direita e/ou esquerda) indicando a posição de leitura de cada gene. Abaixo, a legenda indicativa para cada atividade detectada e em vermelho destacado, a enzima β -N-acetil-hexosaminidase elucida sua composição de 1.065pb, com hit específico para BglX (β -glicosidases) e afiliação a família 3 das glicosil hidrolases (GH3)

A análise das demais ORFs pode dar uma ideia de afiliação taxonômica do organismo que codifica esta enzima no ambiente natural, contudo dentre os genes com homologia com as ORFs anotadas, nenhum possui grande potencial de afiliação taxonômica, como nos casos de genes codificadores de RNAs ribossomais ou transportadores. Este fato dificultou uma afiliação taxonômica para o fragmento clonado e analisado.

3.3 Análise da modelagem proteica

A análise da sequência primária por meio do blastx, revelou que Nag_Mgrv-Met tem baixa identidade com proteínas depositadas no banco de dados não-redundantes – GenBank/NCBI. Por exemplo, o mais alto nível de pontuação em relação à similaridade, foi atribuído a uma glicosil hidrolase de *Veillonella* sp. CAG: 933 (GI: 546.348.821), com apenas 38 % de identidade entre os 97% de resíduos comparados. A baixa identidade determinada, permitiu o reconhecimento de Nag_Mgrv-Met como uma nova proteína.

Nag_Mgrv-Met, também se distinguiu com relação a sua composição de aminoácidos a nível filogenético (Figura 10A), onde foi alocado como um grupo externo em caráter comparativo com sequências mais similares, onde três grupos foram reconhecidos, cada um com sua glicosidase, como compartilhadores de um mesmo domínio de arquitetura. No total, quatro domínios foram detectados, os quais são apresentados na Figura 10B de 1 a 4. Nag_Mgrv-Met pertence ao Tipo 1 cujo qual contém a família 3 de domínio N das glicosil hidrolases (GH3_N). O Tipo 2, representado pela *Veillonella* sp. (Figura 10B), difere do Tipo 1 pela presença de um adicional de 50 a 75 resíduos no terminal N, que incluem uma sequência de sinal secretora (SigSeq). Adicionalmente ao GH3_N, o Tipo 3, possui um domínio de função ainda desconhecido (DUF4309) no terminal N, tal como 50 a 75 resíduos extras em seu terminal, porém sem SigSeq. Tipo 4 em adição ao tipo 2 incluem uma família de Glicosil hidrolase 3 terminal C, que está envolvido na catálise e pode ser ativa em substratos com ligações de beta-glucanos (VARGHESE et al., 1999).

A maioria das GH3 com atividades β -N-acetil-hexosaminidase oriundas de bactérias gram negativas, são enzimas de um domínio único, como verificado para Nag_Mgrv-Met. É sabido que as proteínas pertencentes ao domínio das GH3_N, como Nag_Mgrv-Met, são as segundas mais abundantes (12.228 sequências não redundantes), no entanto em relação aos resultados obtidos neste trabalho, observamos que a nossa sequência primária é bastante rara, perante as descritas anteriormente.

No instante comparativo de sequências disponíveis no banco de dados, com o intuito de arrecadação de informações concisas a respeito da comparação de sequências proteicas, observamos que BsNagZ trata-se de uma proteína de múltiplos domínios (Figura 10B), portando apenas a parte de domínio onde se

encaixa as GH3_N, foi considerado para modelagem, o que corresponde a apenas 30 a 32 % (dependendo do algoritmo aplicado) de atividade residual idêntica. Mesmo com a baixa qualidade comparativa mencionada, o domínio mostrou-se adequado para análises posteriores. Além disso, através das análises comparativas propostas por Ramachandran plot (RAMACHANDRAN et al., 1963; LOVELL et al., 2003), com utilização do Phyre 3D para modelagem, pode ser indicado que 92,3 % dos resíduos estão alocados na região favorecida, sendo apenas 2,4 % da região suplementar (Figura 10C). Através dos resultados obtidos pela análise de ProQ2, pode ser percebido que os resultados foram semelhantes aos GMQE, predizendo a qualidade de Nag_Mgrv-Met 3D de moderada a boa (Figura 10D).

Finalmente, frente a estudos prévios realizados por Litzinger e colaboradores (2010) e Bacik e colaboradores (2012), bem como utilizando-se do programa Phyre2 (FURNHAM et al., 2014), foram identificados sítios catalíticos na predição dos modelo (Figuras 10E e 10F). Desta maneira, pode ser realizado as observações a respeito da região consenso [KH(F/I)PG(H/L)GXXXXD(S/T)H], contendo um díade de Asparato/Histidina (sublinhado em destaque), as quais são regiões conservadas localizadas em para a enzima Nag_Mgrv-Met, que podem ser encontradas em β -N-acetil-hexosaminidase e β -N-acetil-glucosaminidases em famílias GH3, embora a modificação na sequencia predita [172-KHFPGHGSALGNTH-185] (Asparigina/Histidina díade sublinhada em destaque), apresente uma substituição do resíduo carregado negativamente Asparato por um resíduo nao polar Aparigina de cadeia lateral, determinando uma modificação enzimática nova.

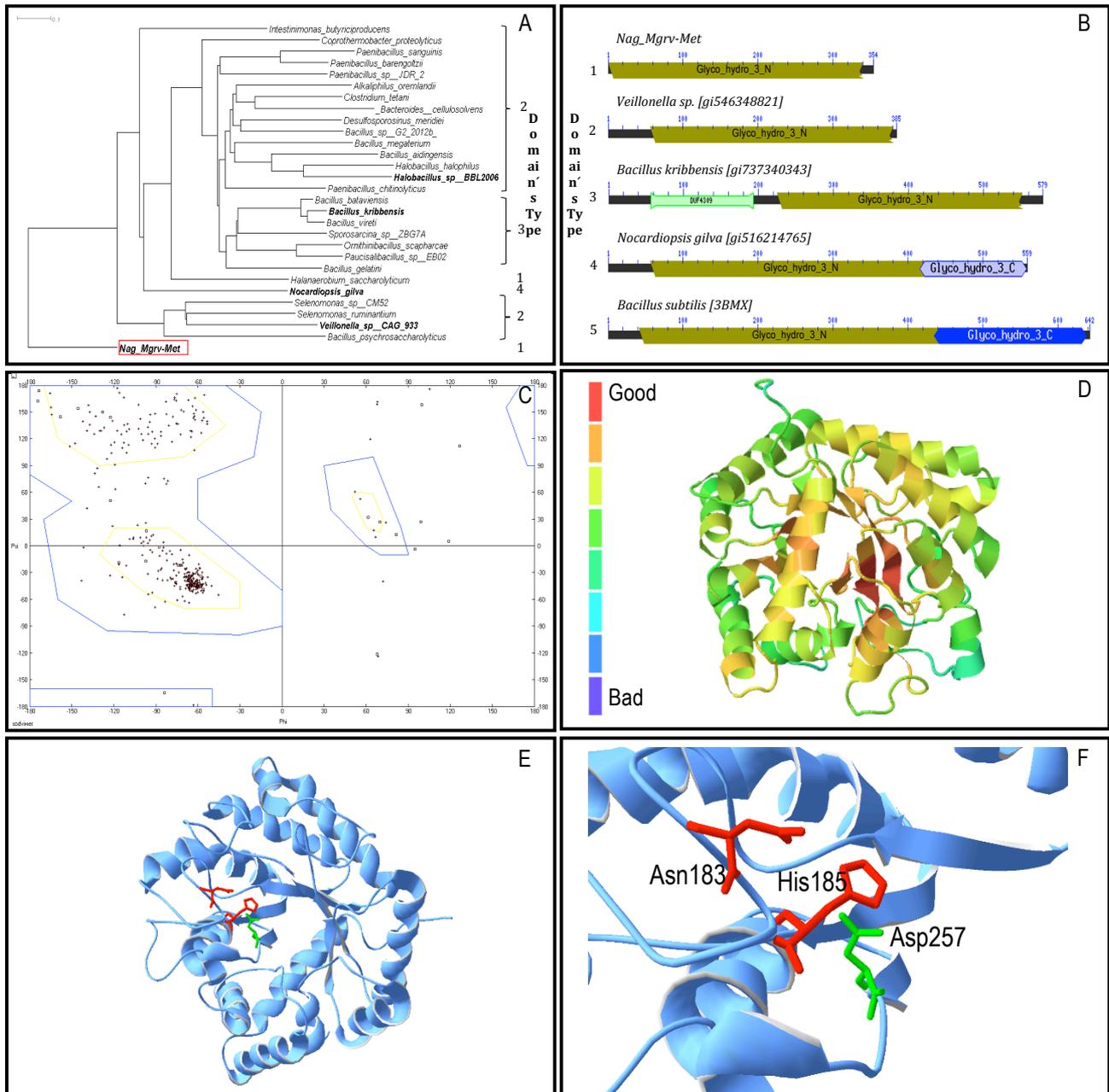


Figura 10 - Caracterização molecular da proteína *Nag_Mgrv-Met*. **A**. Árvore filogenética de *Nag_Mgrv-Met* e seus homólogos construída usando distancia de Grishin (Grishin, 1997) e *Fast Tree Minimum Evolution* (Price et al., 2009). A barra de escala representa o número de mudanças por posição do aminoácido. **B**. Domínio de arquitetura – organização do domínio modular previsto por CDART (Geer et al., 2002). Os números indicam as proteínas; barras verde escuro: posição relativa e do tamanho da GH3_N; azuis claras/escuras: para GH3; verde claro: terminal C e função desconhecida (DUF4309). **C**. Ramachandran plot – cadeia de ângulos diedros Phi e Psi determinados para *Nag_Mgrv-Met*, previsto pelos modelos Phyre's que considerou *Bacillus subtilis* N-acetilglucosaminidase-BsNagZ (Litzinger et al., 2010) como modelo (c3bmxB). **D**. ProQ2 (Ray et al., 2012): avaliação da qualidade do modelo *Nag_Mgrv-Met* predito por Phyre's. **E**. e **F**. *Nag_Mgrv-Met* – Phyre's modelos visualizados no Swiss-Model e PDB viewer v4.1.0 (Guex e Peitsch, 1997), com destaques em vermelho os resíduos Asparagina 183 (Asn) e Histidina 185 (His), em verde o Aspartato 257 (Asp)

3.4 Clonagem e purificação da β -N-acetil-hexosaminidase (EC 3.2.1.52)

O primeiro passo para purificação foi conduzido com a confirmação do inserto clonado codificador da β -N-acetil-hexosaminidase (1,065 bp) dentro do vetor plasmidial pET28a (5,369 bp), inserido em células de *E. coli* BL21. Uma amostra contendo o DNA fusionado com plasmídeos foi enviado para o sequenciamento para confirmação da identidade da sequência, bem como para confirmar a inserção do marcador de histidina (6xHis-tag) ao final da sequência codificante. O marcador proteico his-tag foi utilizado para facilitar a purificação da proteína por ligação na coluna de níquel (Ni-resins), auxiliando também na remoção de proteínas não desejadas.

Dessa forma, e seguindo a metodologia descrita, a β -N-acetil-hexosaminidase foi purificada por diferentes passos gravitacionais utilizando-se uma coluna de polipropileno. As frações coletadas foram submetidas à determinação de sua massa molecular e visualização do fragmento proteico purificado, por meio da técnica de SDS-PAGE (Figura 11).

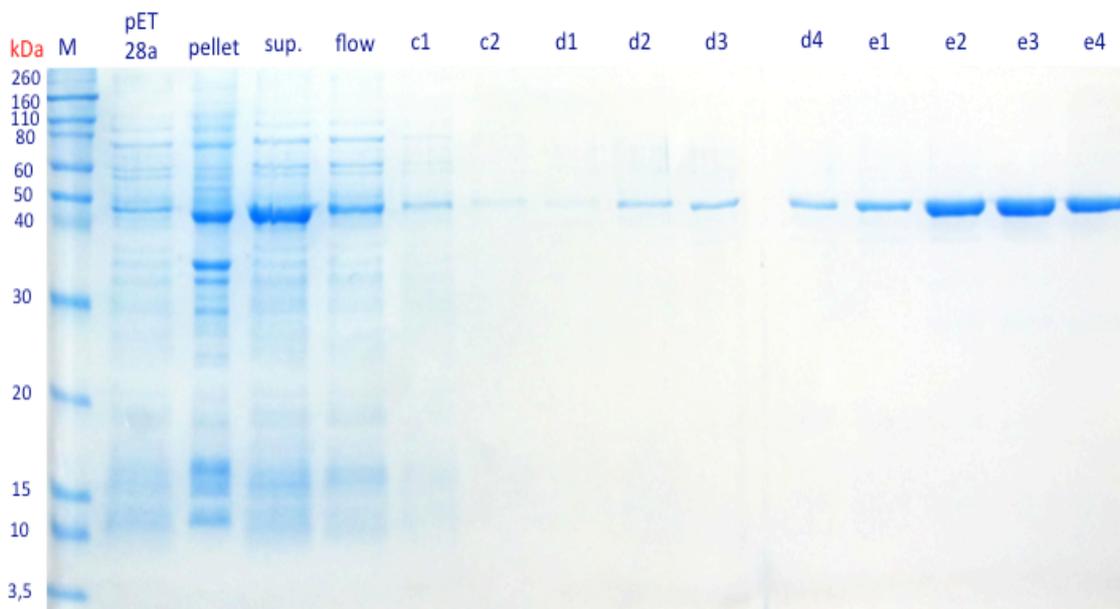


Figura 11 - Gel de SDS-PAGE, após eluições de purificação da proteína. **kDa-M.** Marcador molecular; **pET28a.** Vetor plasmidial; **pellet.** Pellet com separação de fases; **sup.** Sobrenadante após centrifugação (separação de fases); **flow.** Tampão de lise (pH 8.0); **c1 e c2.** Tampão de lavagem (pH 6.3); **d1 a d4.** Tampão de eluição 1 (pH 5.9); **e1 a e4.** Tampão de eluição 2 (pH 4.5)

Como resultado da purificação, uma única banda individual foi obtida nos passos finais de purificação, onde a massa molecular do fragmento foi estimada em aproximadamente 43 kDa (Figura 12). Este valor corresponde ao cálculo realizado a partir dos resíduos de aminoácidos da proteína a ser gerada pela sequência de DNA encontrada no inserto e usada na clonagem. Com utilização do Kit *Pierce Protein Assay*, foi realizada a quantificação da proteína purificada, determinando 2.1 µg/µl.

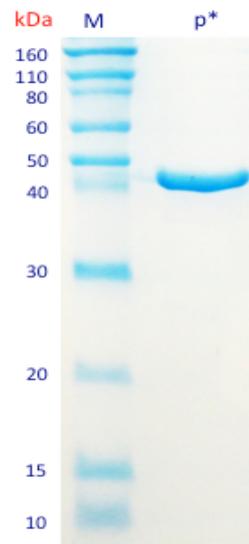


Figura 12 - Gel de SDS-PAGE, demonstrando a proteína isolada purificada. **kDa-M.** Marcador molecular; **p***. Banda da proteína de interesse isolada e purificada

3.5 Caracterização enzimática

A enzima purificada foi avaliada pela variação de sua atividade enzimática frente a variações na temperatura, pH, salinidade e estabilidade por tempo de inativação. Todos os testes foram realizados em triplicatas, por meio da medição da absorbância (405 nm), com uso do indicador p-nitrophenil ligado a diferentes substratos, como 4-nitrophenil N-acetil-B-D-glucosaminide (pNP-GlcNac), 4-nitrophenil N-acetil-B-D-galactosaminide (pNP-GalNac) e 4-Nitrophenil-β-D-Glucoside (pNP-Glc). Foi obtida, uma media entre os maiores picos encontrados entre as faixas de leituras da absorbância comparadas aos substratos testados, indicando maiores e menores atividades:

4-nitrophenil N-acetil-B-D-glucosaminide (pNP-GlcNac) (0,567), 4-nitrophenil N-acetil-B-D-galactosaminide (pNP-GalNac) (0,458) e 4-Nitrophenil- β -D-Glucoside (pNP-Glc) (0,137) (Figura 13).

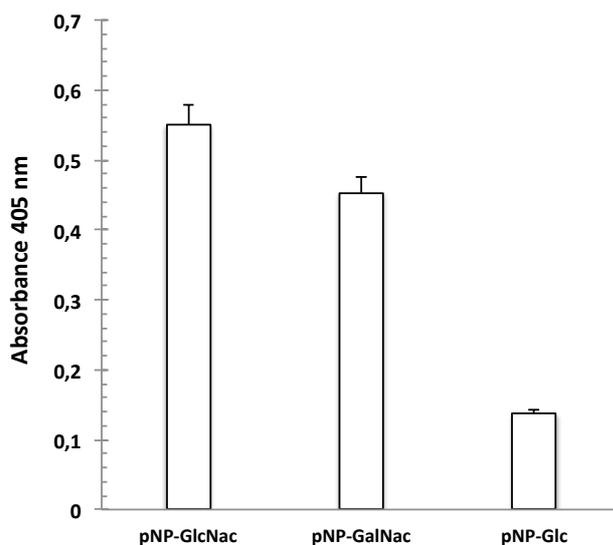


Figura 13 - Valores de leituras de absorvância para os diferentes substratos testados. As barras indicam a absorvância máxima alcançada para cada substrato testado: pNP-GlcNac (0,567), pNP-GalNac (0,458) e pNP-Glc (0,137)

Dentre as atividades enzimáticas positivas, a maior atividade foi observada para o substrato pNP-GlcNac (74 mmol/min./ml), seguida de pNP-GalNac (60 mmol/min.ml) e uma atividade positiva, porém de menor intensidade para pNP-Glc (15 mmol/min./ml). Estas observações foram também demonstradas, expressando a porcentagem da atividade relativa, correlacionando com o respectivo substrato testado (Tabela 1).

Tabela 1 - Variação na atividade da enzima frente aos distintos substratos testados. A concentração foi gerada em mmol/min./ml com relação de porcentagem final

Carbon source	Concentration (mmol/min./ml)	Relative activity (%)
pNP-GlcNac	74	100
pNP-GalNac	60	81
pNP-Glc	15	20

No intuito de descrever o ótimo de temperatura para atividade, a enzima foi incubada com os substratos citados na metodologia, onde alíquotas foram coletadas periodicamente a cada intervalo de 30 min., nas variações de temperatura compreendidas entre 10 a 60 °C. β -N-acetil-hexosaminidase, iniciou sua atividade metabólica a exatos 10 °C, com 50,2 % de atividade residual para GalNac, caracterizada pela maior atividade inicial obtida, seguida de 24,2 % para GlcNac e 7,6 % para Glc.

No decorrer do aumento na temperatura, a enzima se comportou em de maneira crescente em ambos os substratos, mantendo sua variação de porcentagem a 20 °C (89,3 % GalNac; 75,9 % GlcNac; 17,4 % Glc), até se encontrarem em um pico ideal de atividade na faixa dos 30°C, correspondentes ao 100 % de suas atividades. Decorrido esta pico energético, observou-se um decréscimo instantâneo de atividade na faixa dos 40 °C, com considerável queda para o substrato pNP-Glc (13,8 %), seguido dos substratos pNP-GlcNac (46,3 %) e pNP-GalNac (50,8 %). A temperatura de 50 °C e 60 °C as atividades continuaram diminuindo, porém com ligeira estabilidade, quando analisado o substrato de maneira separada (Figura 14).

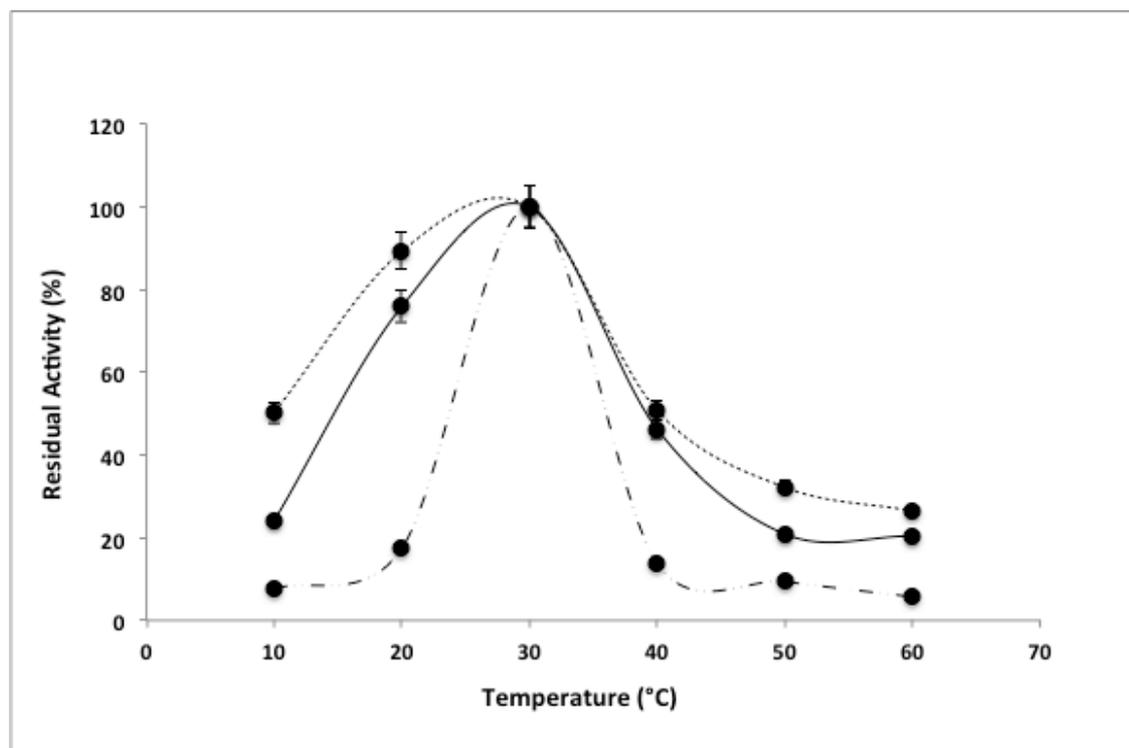


Figura 14 - Caracterização da temperatura ideal de atividade da enzima, realizada através da medição por porcentagem da atividade residual, com relação a temperatura testada que variou de 10 a 60 °C. **Linha Contínua.** representação da atividade com relação ao substrato pNP-GINac; **Linha Pontilhada.** representação da atividade pNP-GalNac; **Linha Tracejada.** representação da atividade pNP-Glc

Após revelar que na temperatura de 30 °C, nossa enzima atinge o 100 % de sua atividade frente aos três substratos testados, utilizamos esta informação para acessar o pH ótimo da β -N-acetil-hexosaminidase purificada. Desta maneira, as faixas de variações no pH's foram testadas entre pH 2.0 a 9.0, por meio da modificação com testes de diferentes tampões caminhando a uma variação de 0.5, medindo-se a absorbância a cada intervalo de 1 hora, como citado no item 2.3.

Pode ser observado um fato curioso no comparativo entre os substratos, onde diferentemente dos testes realizados anteriormente, na descrição do pH ótimo, o substrato GlcNac, demonstrou as maiores atividades residuais percentuais no início dos testes (pH 2.0 - 34,1 %). Logo, os substratos GalNac (4,6 %) e Glc (4,5 %), seguiram não estritamente, mas um limiar de congruência bem próximos entre seus percentuais, onde as curvas caminharam de maneira crescente e quase que totalmente sobrepostas.

Dessa maneira, o primeiro pico de atividade 100 % atingida, pode ser observado na concentração de pH 4.5 para o substrato GalNac, seguido das concentrações pH 5.0 para Glc e pH 5.5 para GlcNac (Figura 15). As variações nas atividades residuais seguiram ocorrendo de acordo com as modificações dos tampões/concentrações de pH. Vale ressaltar, que estas alterações foram mantidas após o pico ideal de cada substrato até a concentração aproximada de pH 6.0, onde na faixa de pH 6.5 a 9.0 é possível retornarmos a observação realizada no início para os substratos GalNac e Glc, no qual estes seguiram com suas similaridades de ocasião encontrada.

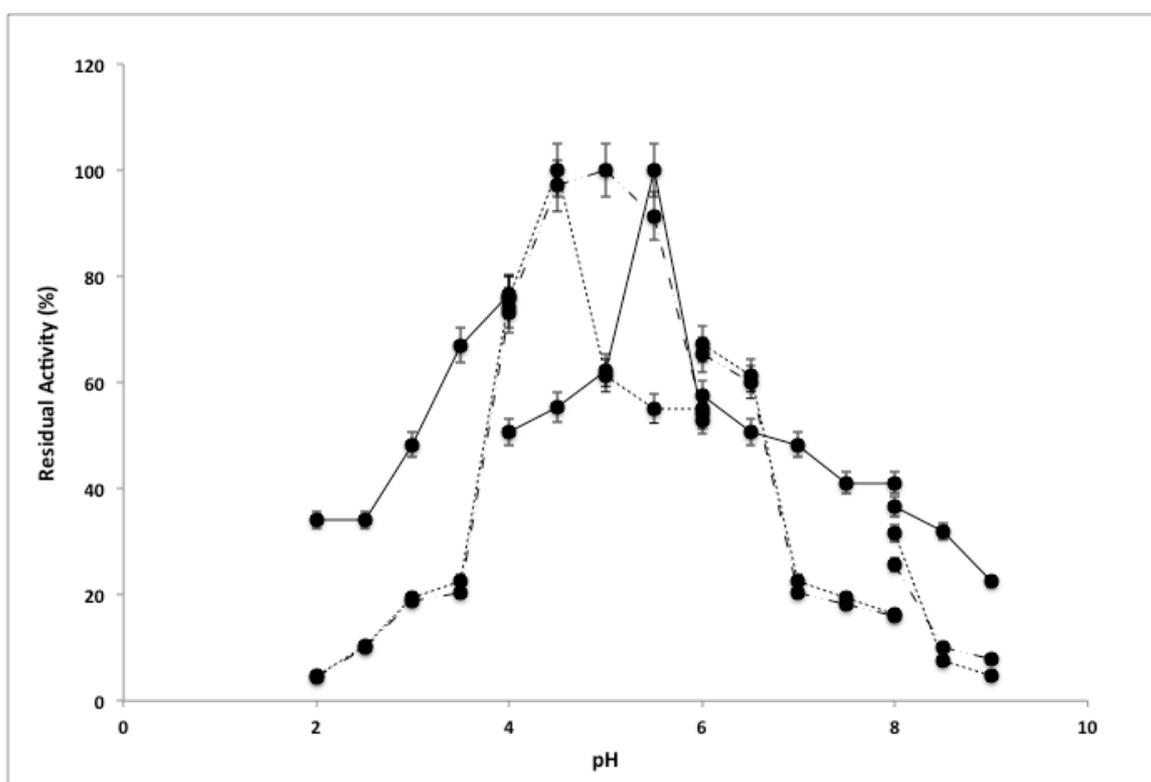


Figura 15 - Caracterização do pH ideal de atividade da enzima, realizada por meio da medição por porcentagem da atividade residual, com relação ao pH testado que variou de 2.0 a 10.0. **Linha Contínua.** representação da atividade com relação ao substrato pNP-Glucosamina; **Linha Pontilhada.** representação da atividade pNP-Galactosamina; **Linha Tracejada.** representação da atividade pNP-Glicose

Foi realizado também, testes que abordaram qual a tolerância de NaCl (0.5 a 2 M) a enzima manteria sua atividade, sempre somando as informações dos testes anteriores realizados (30 °C e média de pH 5.0), com medições realizadas a

cada 1 hora de intervalo. Até a concentração de 0.5 M todos os substratos demonstraram total afinidade com atividade residual variando de 100 a 97,5 % (GlcNac), 97 % (GalNac) e 93,1 % (Glc) (Figura 16). A molaridade descrita coincide com os índices encontrados no solo de manguezal. Contudo, com o aumento gradativo de 1 a 2 M as curvas decresceram, demonstrando cada vez menos um percentual considerável de atividade, atingindo índices médios de 50 % (1 M), 25 % (1.5 M) até se aproximarem da concentração de 2 M.

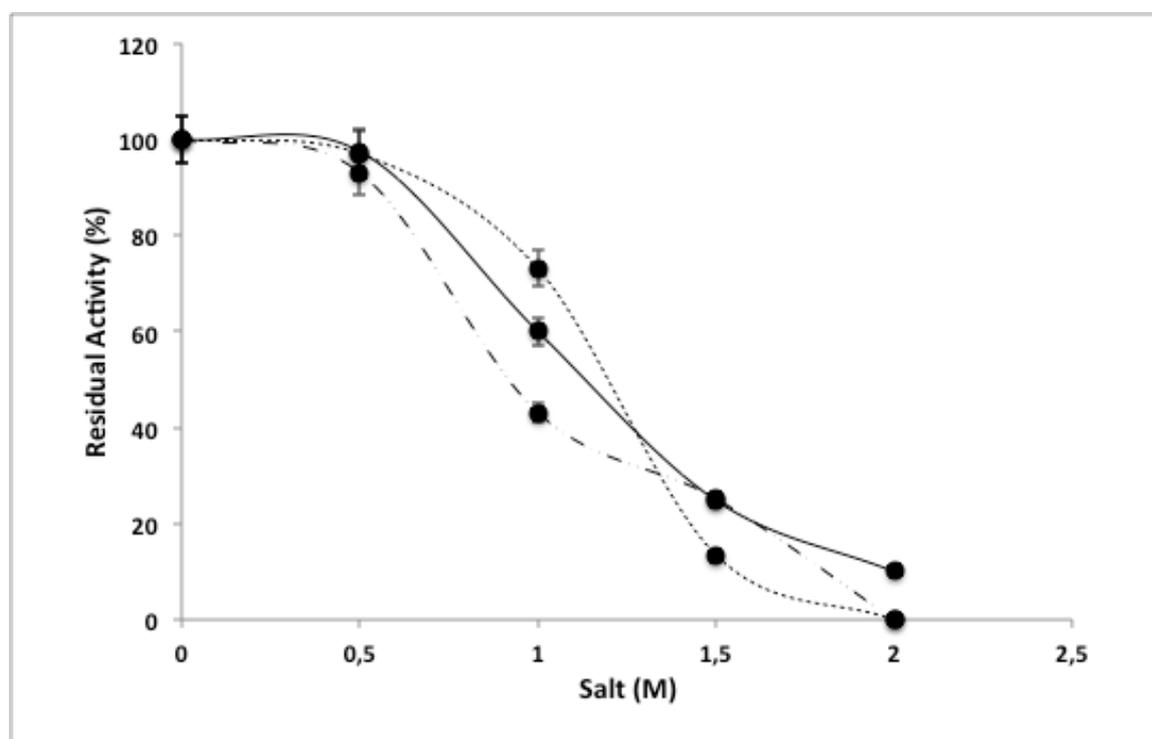


Figura 16 - Caracterização da molaridade salina ideal de atividade da enzima, realizada através da medição por porcentagem da atividade residual, com relação a concentração de NaCl testado que variou de 0 a 2M. **Linha Contínua.** representação da atividade com relação ao substrato pNP-GINac; **Linha Pontilhada.** representação da atividade pNP-GalNac; **Linha Tracejada.** representação da atividade pNP-Glc

Partindo-se dos ideais característicos de temperatura (30 °C), pH (5.0) e salinidade (0.5 M), fez-se necessário a descoberta da relação de tempo de estabilidade/tempo desta enzima, frente as condições encontradas. Para tanto, a estabilidade da enzima foi analisada no decorrer do período de 24 h, em intervalos parciais de 1, 3, 6, 12 e 24 horas. No teste, β -N-acetil-hexosaminidase demonstrou ser estável sob as condições impostas, no decorrer de um período de até 3 horas,

mostrando um decréscimo de atividade após 3 h de incubação (Figura 17). Os valores percentuais de atividade encontrados no período de 6 h de incubação, mostraram-se alternados com referencia aos substratos testados, GlcNac (71,6%), GalNac (49,2 %) e Glc (11,5 %). De maneira continuada, a 12 h de incubação as curvas sofreram mais uma queda acentuada chegando a valores próximos ou menores que 25 % de suas atividades, até inativarem totalmente a 24 h de incubação.

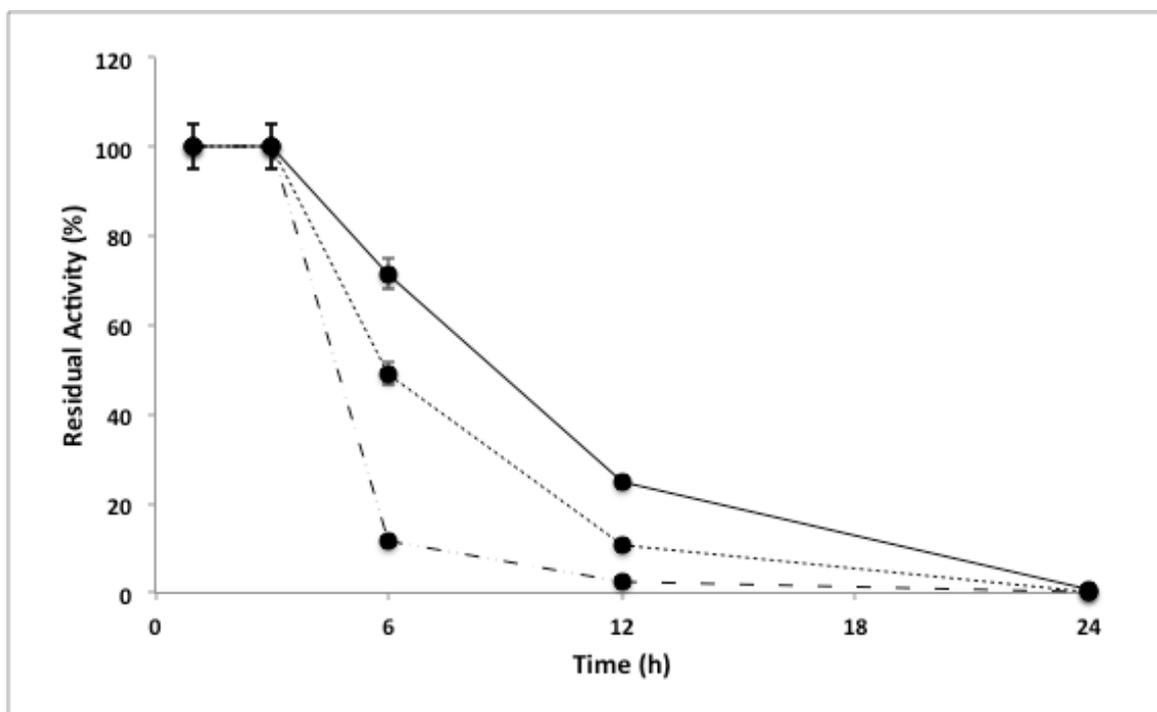


Figura 17 - Caracterização do estabilidade ideal de atividade da enzima, realizada por meio da medição por porcentagem da atividade residual, com relação ao tempo em horas testado que variou de 1 a 24 h. **Linha Contínua.** representação da atividade com relação ao substrato pNP-GINac; **Linha Pontilhada.** representação da atividade pNP-GalNac; **Linha Tracejada.** representação da atividade pNP-Glc

4 DISCUSSÃO

O manguezal amostrado apresenta características peculiares e distintas em relação aos demais manguezais dispostos ao longo do litoral do Estado de São Paulo. O manguezal localizado no município de Bertioga é altamente contaminado com petróleo, devido a um derramamento de 35 milhões de litros de óleo cru, ocorrido no ano de 1983, onde a mata nativa apresenta-se ainda em processo de regeneração (ANDREOTE et al., 2012). Um fato curioso, que pode ser observado ao longo da coleta, é que as espécies vegetais se diferenciam ao longo dos pontos amostrados, em abundância com relação à concentração de óleo encontrada no sedimento ao longo destes anos (DIAS et al., 2011).

Taketani e colaboradores (2010) descrevem que além dos fatores ambientais ou antrópicos considerados distintos entre os manguezais do Estado de São Paulo, pode ser salientada também a disponibilidade de oxigênio, a quantidade de nutrientes e de matéria orgânica, que são distintas e de relevante importância no âmbito da pesquisa científica, por revelarem a ocorrência de comunidades microbianas com importantes funções na ciclagem de nutrientes a partir da matéria orgânica deposta sobre o solo ou sedimento. Como exemplo desta importância, estudos científicos revelam a aplicabilidade de bactérias de ambientes com características hostis, como exemplo os manguezais com importantes atividades enzimáticas, atuando em biocatalizadores a diferentes condições de pressão e temperatura (NIEHAUS et al., 1999; MARGESIN; FELLER, 2010).

Dias e colaboradores (2012) salientam sobre algumas importantes variáveis que ocorrem nos manguezais, com relação à salinidade e a condutividade elétrica que estão vinculadas a inundação do manguezal decorrente da ação das marés, podendo selecionar comunidades microbianas com diferentes atividades funcionais. Com relação a descrição de estudos funcionais em ambientes salinos. A seleção de comunidades microbianas também foi estudo por Fasanella e colaboradores (2012) demonstrando pressão de seleção de comunidades de fungos, exercida por meio da contaminação de óleo no manguezal estudado. Estudos funcionais mais aprofundados, realizados por Radjasa e colaboradores (2001), demonstram a identificação do gênero *Halomonas*, em águas oceânicas, sendo este gênero

também vinculado a características enzimáticas que envolvem a degradação de materiais celulósicos. De maneira similar, Marcon e colaboradores (2014) revelam em sua publicação o genoma de uma bactéria do gênero *Bacillus thurigiensis* BrMgv02-JM63, com características a atividades quitinolíticas, a qual foi isolada de amostras de sedimentos do mesmo manguezal, contaminado com óleo, estudado neste trabalho de pesquisa.

Ciente das descobertas em pesquisas direcionadas a ambientes com características únicas, estudos mais aprofundados com relação à funcionalidade microbiana nestes locais tornam-se cada vez mais necessários e de relevante importância a ciência. Both e colaboradores (2002) salientam para as diferenciadas características físico-químicas que ocorrem em ambientes hostis, as quais tornam-se inóspitas a diferentes espécies. As adaptações a ambientes hostis como o manguezal, são de extrema importância para o estudo funcional de enzimas capazes de atuar sob condições adversas. O enfoque a genomas bacterianos possuintes de características genéticas diferenciadas, podem ser compreendidas pelo estudo de seu genoma, o qual carrega uma modificada cinética de expressão de genes, quando comparado a genes homólogos encontrados em grupos colonizadores de ambientes amenos (TORSVIK; OVREAS, 2002; SOARES JUNIOR et al., 2012).

A cinética de expressão modificada é composta de genes que codificam para diferentes enzimas que atuam em conjunto quando ativas em um determinado ambiente, distribuídas entre a grande diversidade de microrganismos, principalmente devido a sua importância no funcionamento dos ecossistemas aquáticos e terrestres, sendo assim, essencial em processos como a ciclagem de matéria orgânica. Como descrito por Said e colaboradores (2004), as enzimas são consideradas catalisadores biológicos, constituindo moléculas de proteínas, as quais são produzidas por células vivas.

As enzimas conhecidas por celulases, como exemplo as β -glicosidases (BGLs), possuem a capacidade de quebra das ligações glicosídicas de micro-fibrilas da celulose, resultando na liberação de oligossacarídeos, auxiliando assim na melhoria da degradação da celulose. A celulose é um polímero de glicose com grande ocorrência nos biomas naturais, podendo ser encontrada em abundância nos solos e plantas em diferentes ambientes. Segundo Barnard e colaboradores (2010),

este polímero torna-se importante alvo de estudos biotecnológicos pelas suas diversas aplicações, com destaque para o setor industrial de bicombustíveis. Mesbah e Wiegel (2008) realizaram estudos em lagos salinos dispersos pelo mundo, utilizando-se de técnicas independentes de cultivo, e identificando grupos celulolíticos com base no DNA ambiental. Duan e Feng (2010) descrevem a utilização da técnica de metagenômica, na detecção e descrição de novas enzimas envolvidas na degradação de celulose a partir de uma amostra de solo, plantas e rúmem bovino.

A detecção através da triagem realizado em meio seletivo, partindo de uma biblioteca metagenômica de clones com a utilização de fosmídeos, capazes de clonar um inserto de até 40Kb, fundamentou-se no conceito de que o gene necessita estar completo no inserto para poder ser expresso. Esta consideração corrobora com os estudos realizados por Gabor e colaboradores (2004), onde descrevem que 40% dos experimentos de clonagem de DNA metagenômico, com foco na expressão de genes, são realizados em *E.coli*, e que o tamanho médio de um determinado gene é de 1 Kb, o que possibilita a clonagem de genes inteiros e as regiões flaqueadoras das sequencias codificantes.

A proporção aliada com a combinação de compostos carbônicos presentes no meio seletivo, tendem a auxiliar o suprimento basal do metabolismo celular, que utiliza este recurso na produção de enzimas com atividades celulolíticas com catálise seletiva ao substrato utilizado (BHAT, 2000). β -N-acetil-hexosaminidase, compreendida como uma β -glicosidase pertencente a família 3 das glicosil hidrolase (GH3), foi detectada através de testes em meio seletivo para endoglucanase, um grupo de enzimas que pode atuar de forma sinérgica com as chamadas exoglucanases por clivarem regiões aleatórias do polímero de celulose, gerando oligossacarídeos de tamanhos variados. Considerações similares, são descritas com os estudos publicados por Morais e colaboradores (2010), salientando que a combinação das enzimas endo.- e exoglucanases, conduzem a ascensão da atividades de degradação da celulose, devido ao sinérgismo atuantes na clivagem interna e externa desta molécula. A família GH3 está amplamente distribuída entre bactérias, fungos e plantas, tendo uma vasta gama de funções celulares, tais como remodelação da parede celular de bactéria e plantas, metabolismo energético, defesas contra patógenos e degradação de biomassa (HARVEY et al., 2000).

Algumas das enzimas pertencentes a família GH3 são caracterizadas como bifuncionais, como exemplo o gene Nag3 descrito em *Cellulomonas fimi* possui as atividades enzimáticas β -N-acetil-hexosaminidase e N-acetil- β -D-glucosaminidase (MAYER et al., 2006).

Em relação ao clone positivo detectado por triagem em meio seletivo, e sequenciado na plataforma *Ion Torrent* (Life Technologies, USA), trata-se de um sequenciamento de última geração que se utiliza de chips, sendo ideal para sequenciar genomas pequenos, combinando baixos custos, velocidade, versatilidade e possível mistura de diferentes amostras de DNA em único chip (GLENN et al., 2011; ROTHBERG et al., 2011). Desta maneira, a qualidade destas sequências, bem como a limpeza dos terminais de leituras, barcodes, vetores e *E. coli*, foram determinados pelo programa CLCbio Genomics Workbench (Qiagen, Alemanha), por meio de um tratamento sistemático (PHRED ≥ 30), o que auxiliou na anotação das ORF's dos 22 contigs via blastx (ALTSCHUL et al., 1990), onde a enzima β -N-acetil-hexosaminidase (EC 3.2.1.52), responsável pela degradação da fonte de carbono disponível no meio seletivo foi identificada.

Nag_Mgrv-Met, foi descrito como o gene que codifica para a enzima β -N-acetil-hexosaminidase anotada, caracterizando esta pelos testes proteicos como uma nova enzima, decorrente da sua baixa identidade com as proteínas depositadas no banco de dados GenBank. Esta característica é um dos critérios considerados plausíveis para atribuir a enzima como nova "hidrolase metagenômica", pois corroboram com as atribuições publicadas por uma β -glicosidase de amostras de solo (LI et al., 2012), um glicosil a partir de rumem (PATEL et al., 2015), uma esterase marinha (FANG et al., 2014) e uma xilanase/celulase derivada de fazenda de compostagem (SAE-LEE; BOONMEE, 2014), com 74, 68, 27 e 25 % de identidade respectivamente. Vale ressaltar que atualmente, mais de 74.000 proteínas depositadas no GenBank/NCBI contém estruturas características a família GH3_N, sendo estas 85 % de origem bacteriana, organizadas em 145 domínios distintos de arquiteturas (GEER et al., 2002).

A estrutura das GH3_N (β/α) contém um asparato nucleófilo conservado e uma díade de histidina/asparato catalítico flexível (BACIK et al., 2012), que podem ser identificados por meio dos motivos consensus ([KH(F/I)PG(H/L)GXXXXD(S/T)H], (díade histidina/asparato em destaque sublinhado) (VOCADLO et al., 2000).

Esta consideração com relação à identificação do resíduo nucleófilo, bem como a díade catalítica a Nag_Mgrv-Met, auxiliou no rastreamento da sequência primária para o motivo consenso, demonstrado por meio da estrutura 3D prevista anteriormente. Litzinger e colaboradores (2010) propõem a modelagem pelo algoritmo Phyre (KELLEY; STEMBERG, 2009), enquanto que Bacik e colaboradores (2012) utilizam o SwissProt como modelos proteicos para N-acetilglucosaminidase – BsNagZ, uma enzima de características funcionais bem semelhantes a N-acetil-hexosaminidase – Nag_Mgrv-Met. No geral o comparativo de algoritmos e programas, demonstraram estruturas modeladas bastante idênticas com apenas 1.78Å de distância espacial, distância esta considerada de total eficiência na demonstração de dados obtidos (GUEX; PEITSCH, 1997). Resultados semelhantes aos obtidos foram descritos por Litzinger e colaboradores (2010), onde por meio do sistema de modelagem e análises aplicados, demonstrou que o sítio catalítico Asparato (Asp257) foi também encontrado na mesma posição junto a díade Asn/His.

Os resultados de caracterização da enzima com relação ao ótimo de temperatura, pH, salinidade e tempo de atividade/estabilidade, descreveram que β -N-acetil-hexosaminidase foi capaz de hidrolisar os substratos, CMC, pNP-GlcNac, pNP-GalNac e pNP-Glc, substratos estes com importantes aplicações de ensaios enzimáticos na degradação em solos tropicais (VERCHOT; BORELLI, 2005), demonstrando assim uma correlação com as atividades encontradas nas enzimas β -1,4-endoglucanase, β -N-acetil-glucosaminidase e β -glucosidase, pertencentes a família GH3, podendo haver uma razão para a substituição do resíduo de díade encontrado. Apoiando esta hipótese, por meio da análise da enzima N-acetil- β -D-glucosaminidase a partir da bactéria *Bacillus subtilis* (BACIK et al., 2012), da bactéria gram negativa *Vibrio furnissii* (VOCADLO et al., 2000; VOCADLO; WITHERS, 2005) e *Salmonella typhimurium* (BACIK et al., 2012), estes estudos indicaram que embora o nucleófilo das enzimas pertencentes a glicosil hidrolase família 3 são bem conservados, a identidade e localização dos resíduos ácido/base geral não correspondem da mesma maneira. Além disso, o mecanismo detalhado de ligação das enzimas aos diferentes substratos testados indica que com a presença de histidina, suas moléculas podem sofrer alterações estruturais significativas durante a catálise, agindo como um resíduo auxiliar catalítico ácido/base, dentro dos genes Nag e seus ortólogos (BACIK et al., 2012).

Corroborando com os resultados obtidos dos testes realizados para o ótimo de atividade da enzima (30 °C; pH 5.0; 0.5 M; 3 h/estabilidade), Ogawa e colaboradores (2006) descrevem em sua publicação resultados similares aos encontrados, com relação a temperatura (37 °C) e pH (5.5). Contudo autores também descrevem que é característico encontrar a atividade da enzima β -N-acetil-hexosaminidase nos intervalos de valores entre pH 4.0 a 6.0 frente aos substratos testados, como observado em nossos testes (CHEN et al., 2011; CHANG et al., 2010; CAI et al., 1998). A temperatura de atividade das enzimas é modulada de acordo com o local de origem, correspondendo na proximidade a temperaturas conhecidas (TABATABAI; BREMMER, 1969; CARREIRO et al., 2000). Ou seja, ciente das correlações entre as variáveis ambientais decorrentes do ambiente de mangue, temos que a temperatura média de atividade, corresponde à faixa de temperatura do ambiente amostrado 25 a 30 °C (SOARES JUNIOR et al., 2013).

Dando continuidade aos estudos sobre as considerações das variações ambientais do ambiente amostrado, salientamos o teste do teor de salinidade assimilável pela enzima, por meio da variação na concentração molar de NaCl, permitindo demonstrar que a enzima descrita mantém sua atividade até a concentração máxima de 0.5 M/NaCl. Estudos publicados por Soares Júnior e colaboradores (2013) demonstram que a variação no teor de salinidade, considerando-se maiores e menores concentrações de NaCl, podem selecionar grupos funcionais diferentes em um mesmo ambiente, neste caso, também correlacionado ao manguezal e atuantes na degradação de materiais celulósicos.

É sabido que com o aumento da temperatura, unida a condições ótimas da enzima, que neste caso foram expressas pelo pH e molaridade salina, a hidrólise da reação enzimática tende a aumentar sua energia cinética das moléculas, que contribuem na catálise completa da reação (TCHIGVINTSEV et al., 2014). Os resultados da reação de estabilidade por tempo de inativação da reação enzimática somaram todas as informações anteriormente discutidas, evidenciando uma resposta qualitativa para a caracterização final. Resultados semelhantes foram obtidos por Hreggvidsson e colaboradores (1996) salientando que enzimas relacionadas à degradação em ambientes marinhos, penam de uma redução em sua atividade devido às condições ambientais sofrerem variações temporais rápidas, além da abundância de matéria orgânica disponível a degradação.

Os investimentos em pesquisas na produção de enzimas, juntamente com a utilização de indutores menos onerosos e mais facilmente disponíveis, tornou-se um procedimento habitual de grandes empresas. Esta crescente busca e avanço da tecnologia, facilita as produções enzimáticas e explora de forma positiva a utilização de microrganismos, como principal fonte de matéria prima biológica, devido ao fato dos microrganismos possuírem a capacidade para realizar grandes transformações químicas. Sendo assim, este trabalho exemplifica a importância de novos avanços moleculares na produção de enzimas microbianas, suas principais características, a otimização de novas técnicas de produção e suas acessibilidades.

5 CONCLUSÕES

Este trabalho detectou e caracterizou uma enzima com capacidade celulolítica, por meio de uma biblioteca metagenômica, construída a partir de amostras de solo de manguezal com alto nível de perturbação, decorrente de derramamento de óleo, gerando importantes informações que nos permite concluir que:

- A utilização da biblioteca metagenômica no estudo funcional do manguezal do município de Bertioga (SP) mostrou grande eficiência para novas perspectivas e conhecimentos sobre a funcionalidade dos mais diversos ecossistemas;
- O trabalho demonstrou de maneira positiva a aplicabilidade de técnicas polifásicas em um mesmo estudo, como exemplo, por meio do triagem/cultivo em meio seletivo dos clones metagenômicos (independente de cultivo);
- A inferência da anotação do contig, bem como a caracterização da enzima, pode evidenciar a variabilidade genética contida em um mesmo ambiente, demonstrada por meio das ORF's com diferentes características funcionais;
- O acesso ao gene codificador da enzima, pode identificar a similaridade com a família GH3, revelando também a sua baixa identidade com outras enzimas de mesma configuração já descritas nos bancos de dados explorados, sendo avaliada como uma enzima com conformação única de caráter inovador;
- O estudo sobre as características de atividade desta enzima, pode revelar similaridade ao ambiente explorado, o qual se difere de ecossistemas com características amenas, valorizando assim as descobertas realizadas neste trabalho de pesquisa.

Com base em tais conclusões, tem-se como principal mensagem deste trabalho a importância sobre o estudo funcional de microrganismos de ambientes hostis, os quais possuem ampla uma diversidade metabólica ainda pouco explorada, podendo ser acessada, com intuito de preservação do ambiente, utilizando-se de ferramentas como a metagenômica.

REFERÊNCIAS

- ANDREOTE, F. D.; JIMÉNEZ, D. J.; CHAVES, D.; DIAS, A. C. F.; LUVIZOTTO, D. M.; DINI-ANDREOTE, F.; FASANELLA, C. C.; LOPEZ, M. V.; BAENA, S.; TAKETANI, R. G.; MELO, I. S. The microbiome of Brazilian mangroves sediments as revealed by metagenomics. **PloS One**, San Francisco, v. 7, e.38600, 2012.
- ALONGI, D. M. **Coastal ecosystem processes**. Boca Raton: CRC Press, 1998. 419 p.
- ANGELO, R. S. Enzimas hidrolíticas. In: ESPÓSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs, 2004. p. 263-265.
- ALTSCHUL, S.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.; LIPMAN, D. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 3, p. 403-410, 1990.
- ALTSCHUL, S. F.; WOOTTON, J. C.; GERTZ, E. M.; AGARWALA, R.; MORGULIS, A.; SCHAFFER, A. A.; YU, Y.-K. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. **FEBS Journal**, Oxford, v. 272, p. 5101-5109, 2005.
- ARONSON, N. N.; KURANDA, M. J. Lysosomal degradation of asparagine- linked glycoproteins. **FASEB Journal**, Bethesada, v. 3, p. 2615–2622, 1989.
- BACIK, J. P.; WHITWORTH, G. E.; STUBBS, K. A.; VOCADLO, D. J.; MARK, B. L. Active site plasticity within the glycoside hydrolase NagZ underlies a dynamic mechanism of substrate distortion. **Chemical Biology**, Washington, DC, v. 19, p. 1471-1482, 2012.
- BALBAS, P.; BOLIVAS, F. Design and construction of expression plasmid vectors in *Escherichia coli*. **Methods in Enzymology**, New York, v. 185, p. 3-40, 1990.
- BALCEWICH, M. D.; STUBBS, K. A.; HE, Y.; JAMES, T. W.; DAVIES, G. J.; VOCADLO, D. J.; MARK, B. L. Insight into a strategy for attenuating AmpC- mediated β -lactam resistance: structural basis for selective inhibition of the glycoside hydrolase NagZ. **Protein Science**, New York, v. 18, p. 1541-1551, 2009.
- BARNARD, D.; CASANUEVA, A.; TUFFIN, M.; COWAN, D. Extremophiles in biofuel synthesis. **Environmental Technology**, London, v. 31, p. 871-888, 2010.
- BASHAN, Y.; HOLGHIN, G. Plant growth-promoting bacteria: a potential tool for arid mangrove reforestation. **Trees: Structure and Function**, Heidelberg, v. 16, p. 159-166, 2002.
- BHAT, M. K. Cellulase and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, Boston, v. 18, p. 355-383, 2000.

BIASINI, M.; BIENERT, S.; WATERHOUSE, A.; ARNOLD, K.; STUDER, G.; SCHMIDT, T.; KIEFER, F.; CASSARINO, T. G.; BERTONI, M.; BORDOLI, L.; SCHWEDE, T. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. **Nucleic Acids Research**, London, v. 42, p. w252-w258. 2014.

BISARIA, V. S.; GHOSE, T. K. Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 3, p. 90-104, 1981.

BOMMARIUS, A. S.; RIEBEL-BOMMARIUS, B. R. **Biocatalysis: fundamentals and applications**. New York: Wiley-Blackwell, 2004. 634 p.

BOJAROVA, P.; Krenek, K.; KUSMA, M.; PETRASKOVA, L.; NAMDJOU, D-J.; ELLING, L.; KREN, V. *N*-Acetylhexosamine triad in one molecule: Chemoenzymatic introduction of 2-acetamido-2-deoxy- β -D-galactopyranosyluronic acid residue into a complex oligosaccharide. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 50, p. 69–73, 2008.

BOJAROVA, P.; KREN, V. Glycosidases: a key to tailored carbohydrates. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 27, p. 199-209, 2009.

BOOTH, I. R.; CASH, P.; O'BRYNE, C. Sensing and adapting to acid stress. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 81, p. 33-42, 2002.

BULL, A. T.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbial Molecular Biology**, Washington, DC, v. 64, p. 573-606, 2000.

BUNTERNGSOOK, B.; KANOKRATANA, P.; THONGARAM, T.; TANAPONGPIPAT, S.; UENGWETWANIT, T.; RACHDAWIONG, S.; VICHITSOONTHONKLUT, T.; EURWILAICHITR, L. Identification and characterization of lipolytic enzymes from a Peat-swamp forest soil metagenome. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 74, p. 1848-1854, 2010.

CAI, Y. J.; BUSWELL, J. A.; CHANG S. T. β -Glucosidase components of the cellulolytic system of the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 22, p.122-129, 1998.

CARRERA, J. E. **Producción y aplicación de enzimas industriales**. Córdoba: Facultad de Ciencias Agropecuarias, 2003. v. 1.

CARREIRO, M. M.; SINSABAUGH, R. L.; REPERT, D. A.; PANKHURST, D. F. Microbial enzyme shifts explain litter decay responses to simulated nitrogen deposition. **Ecology**, Brooklyn, v. 81, p. 2359–2365, 2000.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, p. 2191-2195, 2009.

CHANG, Y.-M.; CHUNG, Y.-C.; HSU, C.-C.; CHEN, L.-C.; CHIANG, C.-L.; CHANG, C.-T.; SUNG, H.-Y. Biochemical characterization of a b-N- acetylhexosaminidase from fig latex. **Biochemistry**, London, v. 52, p. 23-34, 2011.

CHEN CHUN, L.; CHUNG, Y.-C.; CHANG, Y.-M.; CHANG, C.-T. Characterization of β -N-acetylhexosaminidase from a comercial papaya látex preparation. **Food Chemistry**, Barking, v. 124, p. 1404-1410, 2011.

CHIEN, A.; EDGAR, D. B.; TRELA, J. M. Desoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 127, p. 1550-1557, 1976.

COUTO, G.; GLOGAUER, A.; FAORO, H.; CHUBATSU, L.; SOUZA, E.; PEDROSA, F. Isolation of a novel lipase from a metagenomic library derived from mangrove sediment from the south Brazilian coast. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, p. 514-523, 2010.

CRUZ, G. F.; ANGOLINI, C. F. F.; SANTOS NETO, E. V. D.; LOH, W.; MARSAIOLI, A. J. Exopolymeric substances (EPS) produced by petroleum microbial consortia. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 21, p. 1517-1523, 2010.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lípases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, p. 623-630, 2004.

DIAS, A. C. F.; ANDREOTE, F. D.; DINI-ANDREOTE, F.; LACAVAL, P. T.; SÁ, A. L. B.; MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity and biotechnological potential of culturable bacteria from Brazilian mangrove sediment. **World Journal Microbiology Biotechnology**, Oxford, v. 25, p. 1305-1311, 2009.

DIAS, A. C. F.; DINI-ANDREOTE, F.; TAKETANI, R. G.; TSAI, S. M.; AZEVEDO, J. L.; MELO, I. S.; ANDREOTE, F. D. Archaeal communities in three contrasting mangrove sediments. **Journal of Soils and Sediments**. Heidelberg, v. 11, p. 1466–1476, 2011.

DIAS, A. C. F.; PEREIRA E SILVA, M. C.; COTTA, S. R.; DINI-ANDREOTE, F.; SOARES JR., F. L.; SALLES, J. F.; AZEVEDO, J. L.; VAN ELSAS, J. D.; ANDREOTE, F. Abundance and genetic diversity of *nifH* gene sequences in anthropogenically affected Brazilian mangrove sediments. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 78, p. 7960, 2012.

DILLON, A. Celulases. In: SAID, S.; PIETRO, R.C.L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. São Paulo: Editora Legis Summa, 2004. p. 243-270.

DUAN, C. J.; XIAN, L.; ZHAO, G. C.; FENG, Y.; PANG, H.; BAI, X. L.; TANG, J. L.; MA, Q. S.; FENG, J. X. Isolation and partial characterization of novel genes encoding acidic cellulases from metagenomes of buffalo rumens. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 107, p. 45–256, 2009.

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

DUNCAN, S. M.; MINASAKI, R.; FARRELL, R. L.; THAWAITES, J. M.; HELD, B. W.; ARENZ, B. E.; JURGENS, J. A.; BLANCHETTE, R. A. Screening fungi isolated from historic Discovery Hut on Ross Island Antarctic for cellulose degradation. **Antarctic Science**, Cambridge, v. 20, p. 463-470, 2008.

ESSACK, S.Y. The Development of β -Lactam Antibiotics in Response to the Evolution of β -Lactamases. **Pharmacy Research**, London, v. 18, p. 1391-1399, 2001.

FANG, Z.; LI, J.; WANG, Q.; FANG, W.; PENG, H.; ZHANG, X.; XIAO, Y. A novel esterase from a marine metagenomic library exhibiting salt tolerance ability. **Journal Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 28, p. 771-780, 2014.

FASANELLA, C. C.; DIAS, A. C. F.; RIGONATO, J.; FIORE, M. F.; SOARES JR., F. L.; MELO, I. S.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; ELSAS, J. D.; ANDREOTE, F. The selection exerted by oil contamination on mangrove fungal communities. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 223, p. 4233-4243, 2012.

FENGEL, D.; WEGNER, G. **Wood chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Ed. Walter de Gruyter, 1989.

FURNHAM, N.; HOLLIDAY, G. L.; DE BEER, T. A. P.; JACOBSEN, J. O. B.; PEARSON, W. R.; THORNTON, J. M. The Catalytic Site Atlas 2.0: cataloging catalytic sites and residues identified in enzymes. **Nucleic Acids Research**, London, v. 42, D485-D489, 2014.

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

GEER, L. Y.; DOMRACHEV, M.; LIPMAN, D. J.; BRYANT, S. H. CDART: Protein Homology by Domain Architecture. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 12, p. 1619-1623, 2002.

GLEN, T. C. Field guide to next-generation DNA sequencers. **Molecular Ecology Research**, Chicago, v. 11, p. 759-769, 2011.

GUEx, N.; PEITSCH, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, Weinheim v. 18, p. 2714-2723, 1997.

GRISHIN, N. Estimation of evolutionary distances from protein spatial structures. **Journal of Molecular Evolution**, Oxford, v.45, p.359–369, 1997.

HAMADA, N.; FUSE, N.; KODAIRA, R.; KANDA, J. Cloning and characterization of a new exo-cellulase gene, cel3, in *L. lactus*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam v. 172, p. 231-237, 1999.

HANDREMAN, F.; SJLING, S. Metagenomic approach for the isolation of a novel low-temperature active lipase from uncultured bacteria of marine sediment. **FEMS Microbial Ecology**, Amsterdam, v. 59, p. 524-534, 2007.

HANDELSMAN, J.; RONDON, M. R.; BRADY, S. F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R. M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemical Biology**, Washington, DC, v. 5, p. 245-249, 1998.

HANSON, R. S.; HANSON, T. E. Methanotrophic bacteria. **Microbiological Reviews**, Washington, DC, v. 60, p. 439-471, 1996.

HARVEY, A. J.; HRMOVA, M.; DE GORI, R.; VARGHESE, J. N.; FINCHER, G. B. Comparative modeling of the three-dimensional structures of family 3 glycoside hydrolases. **Proteins**, Hoboken, v. 41, p. 257-269, 2000.

HEAD, I. M.; SAUNDERS, J. R.; PICKUP, R. W. Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. **Microbial Ecology**, New York, v. 35, p. 1-21, 1998.

HEALY, F.; RAY, R.; ALDRICH, H.; WILKIE, A.; INGRAM, L.; SHANMUGAM, K. Direct isolation of functional genes encoding cellulases from the microbial consortia in a thermophilic, anaerobic digester maintained on lignocellulose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 43, p. 667-674, 1995.

HESS, M.; SCZYRBA, A.; EGAN, R.; KIM, T. W.; CHOKHAWALA, H.; SCHOROTH, G.; LUO, 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**, Washington, DC, v. 331, p. 463, 2011.

HOLGUIN, G.; VAZQUEZ, P.; BASHAN, Y. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 33, p. 265-278, 2001.

HREGGVIDSSON, G. O.; KAISTE, E.; HOLST, O.; EGGERTSSON, G.; PALSDOTTIR, A.; KRISTJANSSON, J. K. An extremely thermostable cellulase from the thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 62, p. 3047-3049, 1996.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B. M.; PACE, N. R. 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 180, p. 4765-4774, 1998.

KASANA, R. C.; SALWAN, R.; DHAR, H.; DUTT, S.; GULATI, A. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. **Current Microbiology**, London, v. 57, p. 503-507, 2008.

KELLEY, L. A.; STERNBERG, M. J. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. **Nature Protocols**, London, v. 4, p. 363-371, 2009.

KIM, Y.; CHOI, G.; KIM, S.; YOON, G.; KIM, Y.; RYU, Y. 2006. Screening and characterization of a novel esterase from a metagenomic library. **Protein Expression and Purification**, Orlando, v. 45, p. 315–323, 2006.

KING, J. W.; SNYDER, J. M.; FRYKMAN, H.; NEESE, A. 2001. Sterol ester production using lipase-catalyzed reactions in supercritical carbon dioxide. **European Food Research Technology**, Dresden, v. 212, p. 566-569, 2001.

LAMBAIS, M. R.; CROWLEY, D. E.; CURY, J. C.; BULL, R. C.; RODRIGUES, R. R. Bacterial diversity in tree canopies of the Atlantic forest. **Science**, Washington, DC, v. 312, p. 1917-1917, 2006.

LEE, S.; WON, K.; LIM, H.; KIM, J.; CHOI, G.; CHO, K. Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 65, p. 720–726, 2004.

LERESCHE, J.; MEYER, H. P. Chemocatalysis and biocatalysis (Biotransformation): some thoughts of chemist and of a biotechnologist. **Organic Process Research and Development**, Washington, DC, v. 10, p. 572-580, 2006.

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

LI, J. L.; CHENG, Y. Q.; WANG, P.; ZHAO, W. T.; YIN, L. J.; SAITO, M. A novel improvement in whey protein isolated emulsion stability: Generation of an enzymatically cross-linked pectin using horseradish peroxidase. **Food Hydrocolloids**, Wrexham, v. 26, p. 448-455, 2012.

LIANG, Y.; YESUF, J.; SCHMITT, S.; BENDER, K.; BOZZOLA, J. Study of cellulases from a newly isolated thermophilic and cellulolytic *Brevibacillus* sp. strain JXL. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 36, p. 961-970, 2009.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHNIDELLI, W. **Biotecnologia industrial**. Processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: Edgar Blücher, 2001. v. 3.

LITZINGER, S.; FISCHER, S.; POLZER, P.; DIEDERICHS, K.; WELTE, W.; MAYER, C. Structural and kinetic analysis of *Bacillus subtilis* N-acetylglucosaminidase reveals a unique Asp-His dyad mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 285, p. 35675-35684, 2010.

LIU, T.; YAN, J.; YANG, Q. Comparative biochemistry of GH3, GH20 and GH84 beta-N-acetyl-D-hexosaminidases and recent progress in selective inhibitor discovery. **Current Drug Targets**, Notre Dame, v. 13, p. 512–525, 2012.

LOVELL, S. C.; DAVIS, I. W.; ARENDALL, W. B.; DE BAKKER, P. I.; WORD, J. M.; PRISANT, M. G. RICHARDSON, J. S.; RICHARDSON, D. C. Structure validation by Alpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation. **Proteins**, Hoboken, v. 50, p. 437-450, 2003.

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

LOUWS, F. J.; RADEMAKER, J. L. W.; DE BRUIJN, F. J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: Diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 81-125, 1999.

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

MACEDO, G. A.; PIO, T. F. A rapid screening method for cutinase producing microorganisms. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 36, p. 388-394, 2005.

MALAJOVICH, M. A. Biotecnologia: fundamentos. 2. ed. Rio de Janeiro: Edições Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT do Rio de Janeiro, 2009. v. 1.

MARCHLER-BAUER, A.; DERBYSHIRE, M. K.; GONZALES, N. R.; LU, S.; CHITSAZ, F.; GEER, L. Y.; GEER, R. C.; HE, J.; GWADZ, M.; HURWITZ, D. I.; LANCZCKI, C. J.; LU, F.; MARCHLER, G. H.; SONG, J. S.; THANKI, N.; WANG, Z.; YAMASHITA, R. A.; ZHANG, D.; ZHENG, C.; BRYANT, S. H. CDD: NCBI's conserved domain database. **Nucleic Acids Research**, London, v. 43, p. D222–D226, 2015.

MARCON, J.; TAKETANI, R. G.; DINI-ANDREOTE, F.; MAZZERO, G. I.; SOARES JR., F. L.; MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L.; ANDREOTE, F. D. Draft genome sequence of *Bacillus thurigiensis* strain Brmgv02-JM63, a Chitinolytic bacterium isolated from oil-contaminated mangrove soil in Brazil. **Genome Announcements**, Washington, DC, v. 2, p. e01264-13, 2014.

MARGESIN, R.; FELLER, G. Biotechnological applications of psychrophiles. **Environmental Technology**, London, v. 31, n. 8-9, p. 835-844, 2010.

MARGOLIN, A. L.; NAVIA, M. A. Protein crystal as novel catalytic materials. **Angew. Chemical Introduction**, Washington, DC, v. 40, p. 2204-2222, 2001.

MAYER, C.; VOCADLO, D. J.; MAH, M.; RUPITZ, K.; STOLL, D.; WARREN, R. A.; WITHERS, S. G. Characterization of a beta-N-acetylhexosaminidase and a beta-N-acetylglucosaminidase/beta-glucosidase from *Cellulomonas fimi*. **FEBS Journal**, Oxford, v. 273, p. 2929-2941, 2006.

MESBAH, N. M.; WIEGEL, J. The anaerobic halophilic alkalithermophiles. **New York Academy of Sciences**, New York, v. 1125, p. 44-57, 2008.

MORAIS, S.; HEYMAN, A.; BARAK, Y.; CASPI, J.; WILSON, D.B.; LAMED, R.; SHOSEYOV, O.; BAYER, E.A. Enhanced cellulose degradation by nano-complexed enzymes: Synergism between a scaffold-linked exoglucanase and a free endoglucanase. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 147, p. 205-211, 2010.

NASCIMENTO, W. C. A.; SILVA, C. R.; CARVALHO, R. V.; MARTINS, M. L. L. Otimização de um meio de cultura para a produção de proteases por um *Bacillus* sp. termofílico. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 27, p. 417-421, 2007.

New oligosaccharide production using b-hexosaminidase: Application as growth accelerator for *Bifidobacterium* sp. **Japanese Patent No. J02028192**, 1990.

NG, I. S.; LI, C. W.; YEH, Y. F.; CHEN, P. T.; CHIR, J. L.; MA, C. H.; YU, S. M.; HO, T. H. D.; TONG, C. G. A novel endo-glucanase from the thermophilic bacterium *Geobacillus* sp. 70PC53 with high activity and stability over a broad range of temperatures. **Extremophiles**, Berlin, v. 13, p. 425-435, 2009.

NIEHAUS, F.; BETOLDO, C.; KAHLER, M.; ANTRANIKIAN, G. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. **Applied Microbial Biotechnology**, Berlin, v. 51, p. 711-729, 1999.

OGAWA, M.; KITAGAWA, M.; TANAKA, H.; UEDA, K.; WATSUJI, T-O.; BEPPU, T.; KONDO, A.; KAWACHI, R.; OKU, T.; NISHIO, T. A β -N-acetylhexosaminidase from *Symbiobacterium thermophilum*; gene, cloning, overexpression, purification and characterization. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 38, p. 457-464, 2006.

OSORIO, N. M.; FERREIRA-DIAS, S.; GUSMÃO, J. H.; FONSECA, M. M. R. Response surface modelling of the production of w3 polyunsaturated fatty acids-enriched fats by a commercial immobilized lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 11, p. 677-686, 2001.

PARALES, R. E.; HADDOCK, D. Biocatalytic degradation of pollutants. **Current Opinion Biotechnology**, London, v. 15, p. 374-379, 2004.

PARK, D. H.; BEIKO, R. G. Identifying biologically relevant differences between metagenomic communities. **Bioinformatics**, Oxford, v. 26, p. 715-721, 2010.

PATEL, A. B.; PATEL, A. K.; SHAH, M. P.; PARIKH, I. K.; JOSHI, C. G. Isolation and characterization of novel multifunctional recombinant family 26 glycoside hydrolase from mehsani buffalo rumen metagenome. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, San Diego, 2015. doi: 10.1002/bab.1358.

PÉREZ, C. R.; CARREÑO, F. G. Enzimas lipolíticas y su aplicación en la industria del aceite. **BioTecnología**, Concordia, v. 11, p. 37-45, 2007.

PERUGINO, G.; TRINCONE, A.; ROSSI, M.; MORACCI, M. Oligosaccharide synthesis by glycosynthases. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 22, p. 31-37, 2004.

PETERSEN, T. N.; BRUNAK, S.; VON HEJINE, G.; NIELSEN, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, London, v. 8, p. 785-786, 2011.

PRICE, M. N.; DEHAL, P. S.; ARKIN, A. P. FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 26, p. 1641-1650, 2009.

PROSSER, J. I.; BOHANNAN, B. J. M.; CURTIS, T. P.; ELLIS, R. J.; FIRESTONE, M. K.; FRECKLETON, R. P.; GREEN, J. L.; GREEN, L. E.; KILHAM, K.; LENNON, J. J.; OSBORN, A. M.; SOLAN, M.; VAN DER GAST, C. J.; YOUNG, J. P. W. Essay - The role of ecological theory in microbial ecology. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 5, p. 384-392, 2007.

RADJASA, O. K.; URAKAWA, H.; KITA-TSUKAMOTO, K.; OHWADA, K. Characterization of psychrotrophic bacteria in the surface and deep-sea waters from the Northwestern Pacific Ocean based on 16S ribosomal DNA analysis. **Marine Biotechnology**, New York, v. 3, p. 454-462, 2001.

RAMACHANDRAN, G. N.; RAMAKRISHMAN, C.; SASISEKHARAN, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 7, p. 95-99, 1963.

RAY, A.; LINDAHL, E.; WALLNER, B. Improved model quality assessment using ProQ2. **BMC Bioinformatics**, London, v. 13, p. 224-235, 2012.

POTTKAMPER, J.; BARTHEN, P.; ILBERGER, N.; SCHAWANEBERG, U.; SCHENK, A.; SCHULTE, M.; IGNATIEV, N.; STREIT, W. R. Applying metagenomics for the identification of bacterial cellulases that are stable in ionic liquids. **Green Chemistry**, London, v. 11, p. 897-1068, 2009.

RAPPÉ, M. S.; GIOVANNONI, S. J. The uncultured microbial majority. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 57, p. 369-394, 2003.

RAJASEKARAN, R.; CHANDRASEKARAN, R.; MUTHUSELVAM, M. Microbial biotechnology, rapid advances in an area of massive impact. **Advanced Biotechnology**, Boston, v. 7, p. 19-25, 2008.

REES, H.; GRANT, S.; JONES, B.; GRANT, W.; HEAPHY, S. Detecting cellulase and esterase enzyme activities encoded by novel genes present in environmental DNA libraries. **Extremophiles**, Berlin, v. 7, p. 415-421, 2003.

REETZ, M. T.; WILENSEK, S.; ZHA, D.; JAEGER, K. E. Directed evolution of an enantioselective enzyme through combinatorial multiple-cassette mutagenesis. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v. 40, p. 3589-3591, 2001.

REJMÁNKOVÁ, E.; HOUDKOVÁ, K. Wetland plant decomposition under different nutrient conditions: what is more important, litter quality or site quality? **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 80, p. 245-262, 2006.

ROTHERBERG, J. M.; HINZ, W.; REARICK, T. M.; SCHUTZ, J.; MILESKI, W.; DAVEY, M.; LEAMON, J. H.; JOHNSON, K.; MILGREW, M. J.; EDWARDS, M.; HOON, J.; SIMONS, J. F.; MARRAN, D.; MYERS, J. W.; DAVIDSON, J. F.; BRANTING, A.; NOBILE, J. R.; PUC, B. P.; LIGHT, D.; CLARK, T. A.; HUBER, M.; BRANCIFORTE, J. T.; STONNER, I. B.; CAWLEY, S. E.; LYONS, M.; FU, Y.; HOMER, N.; SEDOYA, M.; MIAO, X.; REED, B.; SABINA, J.; FEIERSTEIN, E.; SCHORN, M.; ALANJARTY, M.; DIMALANTA, E.; DRRESSMAN, D.; KASISNSKAS, R.; SOKOSKY, T.; FIDANZA, J. A.; NAMSARAEV, E.; MICKERNAN, K. J.; WILLIAMS, A.; ROTH, G. T.; BUSTILLO, J. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. **Nature**, London, v. 475, p. 348-352, 2011.

RUBIN, E. M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature Reviews**, London, v. 454, p. 841-845, 2008.

SÁ, A. L. B. **Diversidade de rizobactérias endoglucolíticas isoladas de mangue vermelho (*Rhizophora mangle*)**. 2008. 61 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SAE-LEE, R.; BOONMEE, A. Newly derived GH43 gene from compost metagenome showing dual xylanase and cellulase activities. **Folia Microbiology**, Praha, v. 59, p. 409-417, 2014.

SAID, S.; PIETRO, R. Generalidades sobre aplicação industrial de enzimas. In: _____. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. São Paulo: Editora Legis Summa, 2004. p. 1-7.

SCHLUMBAUM, A.; MANCH, F.; VOGELI, V.; BOLLER, T. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. **Nature**, London, v. 324, p. 365–367, 1986.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CINTRÓN-MOLERO, G.; SOARES, M. L. G.; DE-ROSA, T. Brazilian Mangroves. **Aquatic Ecosystem Health and Management**, New York, v. 3, p. 561-570, 2000.

SCHOLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 71, p. 1501-1506, 2005.

SEEBERGER, P. H. Automated carbohydrate synthesis as platform to address fundamental aspects of glycobiology - current status and future challenges. **Carbohydrates Research**, Amsterdam, v. 343, p. 1889-1896, 2008.

SCHIMIDT HEBBEL, H.; PENNACCHIOTTI MONTI, I. **Los enzimas en los alimentos, su importancia en la química y la tecnología de los alimentos**. Santiago: Universidad de Chile, 2001.

SENTHILKUMAR, R.; SELVAKUMAR, G. Isolation and characterization of an extracellular lipase producing *Bacillus* sp. SS-1 from slaughterhouse soil. **Advanced Biotechnology**, Boston, v. 6, p. 24-25, 2008.

SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (Org.). **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caixas do Sul: Educs, 2002.

SHANMUGAM, S.; RAJASEKARAN, P.; KUMAR, T. S. Optimization of thermostable laccase production from *Pleurotus eous* using rice bran. **Advanced Biotechnology**, Boston, v. 6, p. 12-15, 2008.

SIK, H.; LIM, H.; CHUNG, E.; PARK, E.; LEE, M.; KIM, J.; CHOI, G.; CHO, K.; LEE, S. Selection and characterization of forest soil metagenome genes encoding lipolytic enzymes. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 17, p. 1655-1660, 2007.

SILVA, F. M.; LACERDA, P. S. B.; JUNIOR, J. Desenvolvimento sustentável e química verde. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, p. 738-744, 2003.

SOARES JR., F. L.; MELO, I. S.; DIAS, A. C. F.; ANDREOTE, F. D. Cellulolytic bacteria from soils in harsh environments. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, Oxford v. 28, p. 2195-203, 2012.

SOARES JR., F. L.; DIAS, A. C. F.; FASANELLA, C. C.; TAKETANI, R.; LIMA, A. O. S.; MELO, I. S.; ANDREOTE, F. Endo- and exoglucanase activities in bacteria from mangrove sediment. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 44, p. 969-976, 2013.

TABATAI, M. A.; BREMNER, J. M. Use of p-Nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 1, p. 301-307, 1969.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Nature Product Reports**, London, v. 18, p. 448-459, 2001.

TAKETANI, R. G.; FRANCO, N. O.; ROSADO, A. S.; VAN ELSAS, J. D. Microbial community response to a simulated hydrocarbon spill in mangrove sediments. **Journal of Microbiology**. Seoul, v. 48, p. 7-15, 2010.

TCHIGVINTSEV, A.; TRAN, H.; POPOVIC, A.; KOVACIC, F.; BROWN, G.; FLICK, R.; HAJIGHASEMI, M. The environment shapes microbial enzymes: five cold-active and salt-resistant carboxyl-esterases from marine metagenomes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 99, p. 2165-2178, 2014.

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

TRINCONE, A.; GIRODANO, A. Glycosyl hydrolases and glycosyltransferases in the synthesis of oligosaccharides. **Current Organic Chemistry**, Hilversum, v. 10, p. 1163-1193, 2006.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 5, p. 240-245, 2002.

TEWS, I.; VINCENTELLI, R.; VORGIAS, C. E. N-acetylglucosaminidase (chitinase) from *Serratia marcescens*: gene sequence, and protein production and purification in *Escherichia coli*. **Gene**, Amsterdam, v. 170, p. 63–67, 1996.

VARGHESE, J. N.; HRMOVA, M.; FINCHER, G. B. Three-dimensional structure of a barley beta-D-glucan exohydrolase, a family 3 glycosyl hydrolase. **Structure**, Cambridge, v. 7, 179-190, 1999.

VASCONCELLOS, S. P.; ANGOLINI, C. F. F.; GARCÍA, I. N. S.; DALLAGNEZZE, B. M.; SILVA, C. C.; MARSAIOLI, A. J.; NETO, E. V. S.; OLIVEIRA, V. M. Screening for hydrocarbon biodegraders in a metagenomic clone library derived from Brazilian petroleum reservoirs. **Organic Geochemistry**, Washington, DC, v. 41, p. 675-681, 2010.

VERCHOT, L. V.; BORELLI, T. Application of para-nitrophenol (pNP) enzyme assays in degraded tropical soils. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 37, p. 625-633, 2005.

VOCADLO, D. J.; WITHERS, S. G. Detailed comparative analysis of the catalytic mechanisms of beta-N-acetylglucosaminidases from families 3 and 20 of glycoside hydrolases. **Biochemistry**, London, v. 44, p. 12809-12818, 2005.

VOCADLO, D. J.; MAYER, C.; HE, S.; WITHERS, S. G. Mechanism of action and identification of Asp242 as the catalytic nucleophile of *Vibrio furnisii* N-acetyl-beta-D-glucosaminidase using 2-acetamido-2-deoxy-5-fluoro-alpha-L-idopyranosyl fluoride. **Biochemistry**, London, v. 39, p.117-126, 2000.

THAUER, R.; SHIMA, S. Biogeochemistry – methane and microbes. **Nature**, London, v. 440, p. 878-879, 2006.

VOGET, S.; LEGGEWIE, C.; UESBECK, A.; RAASCH, C.; JAEGER, K.; STREIT, W. Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 69, p. 6235-6242, 2003.

VU, P. L.; SHIN, J. A.; LIM, C. H.; LEE, K. T. Lipase-catalysed production of phytosteryl esters and their crystallization behavior in corn oil. **Food Research International**, Amsterdam, v. 37, p. 175-180, 2004.

ZAEHNAR, H.; FILEDER, H. P. The need for new antibiotics: possible ways forward. In: RUSSELL, J. J. (Ed.). **Fifty years of antimicrobials: past perspectives and future trends**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. p. 67-84.

ZAHRAN, H. H. Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline environments. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 25, p. 211-223, 1997.

ZHANG, Q. R.; XU, W. H.; CHEN, F. S.; LI, S. Insect Biochemical. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 35, p. 153-164, 2005.

WILSON, D. B. Cellulases and biofuels. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 20, p. 295-299, 2009.

WILSON, Z. E.; BRIMBLE, M. A. Molecules derived from the extremes of life. **Nature Products Reports**, London, v. 26, p. 1-40, 2009.

YU, J. J.; CHEN, S. X.; ZHAO, Q.; WANG, T.; YANG, C. P.; DIAZ, C.; SUN, G. R.; DAI, S. J. Physiological and proteomic analysis of salinity tolerance in *Puccinellia tenuiflora*. **Journal of Proteome Research**, Boston, v. 10, p. 3852-3870, 2011.

YUZWA, S. A.; MACAULEY, M. S.; HEINONEN, J. E.; SHAN, X.; DENNIS, R. J.; HE, Y.; WHITWORTH, G. E.; STUBBS, K. A.; MCEACHERN, E. J.; DAVIES, G. J.; VOCADLO, D. J. A potent mechanism-inspired O-GlcNAcase inhibitor that blocks phosphorylation of tau *in vivo*. **Nature Chemical Biology**, London, v. 4, p. 483-490, 2008.