



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

BRUNA REGINA DOS SANTOS SILVA

**ABORDAGEM METAGENÔMICA PARA ISOLAMENTO DE UMA NOVA
CELULASE EM RESTOS CULTURAIS DE ARROZ VERMELHO**

CAMPINA GRANDE – PB

FEVEREIRO DE 2017

BRUNA REGINA DOS SANTOS SILVA

**ABORDAGEM METAGENÔMICA PARA ISOLAMENTO DE UMA NOVA
CELULASE EM RESTOS CULTURAIS DE ARROZ VERMELHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba/Embrapa Algodão, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre (M. Sc.) em Ciências Agrárias/Área de concentração: Biotecnologia e Melhoramento Vegetal.

Orientador: Prof. Dr Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses

CAMPINA GRANDE-PB

2017

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

S586a Silva, Bruna Regina dos Santos.

Abordagem metagenômica para isolamento de uma nova celulase em restos culturais de arroz vermelho [manuscrito] / Bruna Regina dos Santos Silva. - 2017.
61 p. : il. color.

Digitado.

Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias) - Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2017.

"Orientação: Prof. Dr. Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa".

1. Arroz vermelho. 2. Metagenômica funcional. 3. Restos culturais. 4. Endoglucanase. I. Título.

21. ed. CDD 633.18

BRUNA REGINA DOS SANTOS SILVA

**ABORDAGEM METAGENÔMICA PARA ISOLAMENTO DE UMA NOVA
CELULASE EM RESTOS CULTURAIS DE ARROZ VERMELHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba/Embrapa Algodão, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre (M. Sc.) em Ciências Agrárias/Área de concentração: Biotecnologia e Melhoramento Vegetal.

Aprovado em 03/02/2017

Banca Examinadora:



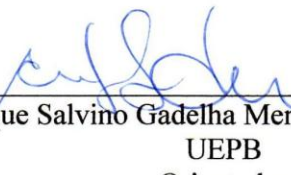
Prof. Dr. Franciscleudo Bezerra da Costa (D.Sc. Fisiologia Vegetal) - UFCG

Examinador Externo



Prof. Dr. Diogo Gonçalves Neder (D.Sc. Genética e Melhoramento de plantas) - UEPB

Examinador Interno



Prof. Dr. Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses (D.Sc. Biotecnologia Vegetal)-
UEPB

Orientador

*A minha mãe, minha fortaleza, meu maior
exemplo de honestidade e firmeza.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todo o discernimento, sabedoria e paz durante a minha jornada e a Maria por nunca ter me desamparado nos momentos difíceis;

A minha mãe, Maria Lucineide, pela educação e por ter me ensinado sempre a andar no caminho da honestidade;

A minha irmã, por ter me ensinado que na vida sempre podemos mudar;

A meu pai, que apesar dos embaraços da vida, me deixou boas lições;

A todos os meus familiares que torceram, estiveram ao meu lado, me incentivando;

A minha segunda mãe e amiga, Eliete Romão, por todas as orações e zelo;

Em especial agradeço a meu amigo, amor e companheiro, Ricardo Romão, por me ensinar que na vida tropeçamos para levantarmos mais fortes;

As minhas melhores e verdadeiras amigas: Luanna, Dayse, Gabi;

Ao meu educador, orientador e além de tudo amigo e parceiro de jornada, pela paciência, experiência compartilhada, confiança e por acreditar no meu trabalho;

A Universidade Estadual da Paraíba, Campus I, em especial o Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias;

A Danilo, secretário do mestrado, por ter auxiliado quando precisei;

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos que possibilitou a realização deste trabalho, e ao CNPQ pelo apoio financeiro da pesquisa;

A todos os professores do curso, Pedro Dantas, Carlos Henrique, Alberto Soares de Melo, Diogo Neder e Lisiane Maria de Lima, pela amizade e pelos preciosos ensinamentos transmitidos;

Aos colegas de turma, Jeneilson, Vanessa, Nadja, Silmara, Edilene, Erika, Magaly, Jonathan e Damião, por todos os momentos compartilhados durante as aulas e a amizade adquirida para toda a vida;

A todos que me ajudaram na execução dos trabalhos no laboratório de Biologia Molecular;

À Embrapa Algodão pela disponibilização das instalações para aulas;

Ao Departamento de Agroecologia e Agropecuária, do Campus II, da UEPB, por disponibilizar a realização do estágio na disciplina de Biologia Celular no curso de Agroecologia, em Lagoa Seca;

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para execução deste trabalho e mais uma etapa da minha vida acadêmica, muito obrigada.

“A persistência é o menor caminho do êxito”

Charles Chaplin

RESUMO

SILVA, BRUNA REGINA DOS SANTOS. M.Sc., Universidade Estadual da Paraíba/Embrapa Algodão, fevereiro de 2017. **Abordagem metagenômica para isolamento de uma nova celulase em restos culturais de arroz vermelho.** Campina Grande, PB, 2017.61p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias). Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Salvino Gadêlha Meneses.

O arroz vermelho é praticamente desconhecido pela maioria dos brasileiros, mas na Paraíba assim como em outros estados do Nordeste, é bastante cultivado por pequenos agricultores, apresentando uma grande importância socioeconômica. Na atividade agrícola, grandes quantidades de materiais celulolíticos são gerados. Esse material é degradado por microrganismos celulolíticos, que hidrolisam e metabolizam a celulose de forma eficiente. Existe um grande empenho para o desenvolvimento de alternativas renováveis aos combustíveis fósseis e uma dessas alternativas é a produção de etanol de segunda geração, utilizando a hidrólise enzimática em derivados de biomassa vegetal e sua posterior fermentação. Os microrganismos apresentam uma imensa diversidade genética e desempenham várias funções na manutenção de ecossistemas. Uma dessas funções é a produção de enzimas extracelulares, que ajudam na degradação da matéria orgânica. A celulase é uma enzima que hidrolisa a celulose por meio da quebra da ligação β -1,4. Na busca por novos microrganismos não-cultivados, a metagenômica surge como uma ferramenta que isola o DNA a partir de fontes ambientais para identificar enzimas com potencial biotecnológico. Neste trabalho, um gene que codifica uma endoglucanase foi clonado a partir de resíduos de cultura do arroz vermelho utilizando a estratégia metagenômica. A identidade de aminoácidos entre este gene e os seus congêneres mais próximos publicado é inferior a 70%. O gene encontrado possui potencial para uso na produção de etanol a partir de biomassa celulósica (segunda etanol geração).

Palavras-chave: metagenômica funcional; restos culturais; endoglucanase.

ABSTRACT

SILVA, BRUNA REGINA DOS SANTOS. M.Sc. Universidade Estadual da Paraíba/Embrapa Algodão, February 2017. **Metagenomic approach for isolation of a novel Cellulase from Red Rice Crop Residues**. Campina Grande, PB, 2017. 61p. Dissertation (Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias). Advisor: Prof. Dr. Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses.

Red rice is practically unknown by most Brazilians, but in Paraíba as in other Northeastern states, it is highly cultivated and has great socioeconomic importance, cultivated mainly by small farmers. In agricultural activity, large quantities of cellulolytic materials are generated. This material is degraded by cellulolytic microorganisms, which hydrolyze and metabolize cellulose efficiently. There is a great commitment to the development of renewable alternatives to fossil fuels and one of these alternatives is second generation ethanol production, using enzymatic hydrolysis in vegetable biomass derivatives and subsequent fermentation. Microorganisms exhibit immense genetic diversity and play a variety of roles in maintaining ecosystems. One of these functions is the production of extracellular enzymes, which help in the degradation of organic matter. Cellulase is an enzyme that hydrolyzes cellulose by breaking the β -1,4 linkage. In the search for new non-cultured microorganisms, metagenomics appears as a tool that isolates DNA from environmental sources to identify enzymes with biotechnological potential. In this work, a gene encoding an endoglucanase was cloned from red rice culture residues using the metagenomic strategy. The amino acid identity between this gene and its nearest published congeners is less than 70%. The gene found has potential for use in the production of ethanol from cellulosic biomass (second generation ethanol)..

Keywords: Functional Metagenomic; cultural remains; endoglucanase.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. FASES DA COMPOSTAGEM. FONTE: D'ALMEIDA e VILHENA, 2000).....	18
FIGURA 2. ESTRUTURA DA CELOBIOSE E DA LIGAÇÃO β -GLICOSÍDICA NA CELULOSE. FONTE: adaptado de SANDGREN, 2005).....	20
FIGURA 3. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CELULOSE E DA AÇÃO DAS CELULASES. FONTE: BANSAL, et al., 2009.....	21
FIGURA 4. ESQUEMA GERAL DAS ETAPAS QUE ENVOLVEM A CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECAS METAGENÔMICAS. FONTE: adaptado de DANIEL, R. 2004.....	25
FIGURA 5. ROTA TECNOLÓGICA DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA PARA OBTENÇÃO DE ETANOL. FONTE: adaptado SANTOS, F. et al., 2012.....	26
FIGURA 6. ESQUEMA ILUSTRATIVO APRESENTANDO CARACTERÍSTICAS DO VETOR COSMÍDEO WEB-TNC™ (Epicentre),2016.....	29
FIGURA 7. PERFIL ELETROFORÉTICO DE GEL DE AGAROSE MOSTRANDO A EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA AMOSTRA DE DNA METAGENÔMICO, CAMPINA GRANDE/PB , 2016.....	34
FIGURA 8. PERFIL ELETROFORÉTICO DE GEL DE AGAROSE DE DNA METAGENÔMICO CLIVADO, CAMPINA GRANDE/PB, 2016.....	35
FIGURA 9. PERFIL ELETROFORÉTICO DE GEL DE AGAROSE DO VETOR pWEB::TNS LINEARIZADO COM AUXILIO DA ENZIMA, CAMPINA GRANDE/PB, 2016.....	36
FIGURA 10. PERFIL ELETROFORÉTICO DE GEL DE AGAROSE DE DNA METAGENÔMICO CLICADO E EXCISADO, CAMPINA GRANDE/PB, 2016.....	37
FIGURA 11. PERFIL ELETROFORÉTICO DE GEL DE AGAROSE DE PLASMÍDEOS RECOMBINANTES GERADOS, CAMPINA GRANDE/PB, 2016.....	37
FIGURA 12. ENSAIO DE PLACAS DE CMC COM CORANTE VERMELHO DO CONGO, CAMPINA GRANDE/PB, 2016.....	38
FIGURA 13. CLASSIFICAÇÃO DE EglARR01 POR NUCLEOTÍDEOS E ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS, CAMPINA GRANDE/PB, 2016.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS

EnG-ExG - Endoglucanase/exoglucanase

ExG-ExG - Exoglucanases

CPB - Bioprocesso Consolidado

DAIP - Dias após o início do processo

rSAP - Shrimp Alkaline Phosphatase

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

B.O.D - Demanda bioquímica de Oxigênio

Endo-1.4- β -glucanase - Carboximetilcelulase

CMC - carboximetilcelulose

PCR - Reações de polimerização em cadeia

HMMs - Hidden Markov Models

CMCase - Carboximetilcelulose-degradantes

NCBI - National Center for Biotechnology Information

SUMÁRIO

1.0 OBJETIVOS.....	14
1.1 Objetivo Geral.....	14
1.2 Objetivos específicos.....	14
2.0 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Aspectos gerais da cultura do arroz vermelho.....	15
3.1.1 História.....	15
3.1.2 Origem, classificação botânica e morfologia.....	15
3.1.3 Aspectos nutricionais e socioeconômicos.....	16
3.2 Compostagem.....	17
3.3 Biomassa vegetal.....	19
3.4 Enzimas envolvidas na degradação da celulose.....	20
3.4.1 Fatores que afetam a hidrólise enzimática.....	22
3.5 Metagenômica.....	23
3.6 Obtenção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica.....	25
4.0 MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 Obtenção e avaliação de amostras a partir da compostagem de arroz vermelho.....	27
4.2.Extração e purificação do DNA metagenômico a partir da compostagem de arroz vermelho.....	27
4.3 Construção de biblioteca metagenômica.....	29
4.3.1 Reparo dos fragmentos para clonagem em vetor cosmídeo.....	29
4.3.2 Seleção do tamanho dos insertos.....	29
4.3.3 Reação de ligação dos insertos no vetor cosmídeo.....	30
4.3.4 Reação de empacotamento.....	31
4.4 Infecção de células <i>E. coli</i> EPI100.....	32
4.5 Seleção de clones com atividades celulolítica.....	32
4.6 Análise de seqüência dos insertos.....	32
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1 Extração e quantificação de DNA.....	34
5.2 Construção e Triagem de metagenômica Bibliotecas.....	36
5.3 Análises de seqüência de genes clonados celulase.....	39
6.0 CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

1.0 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é o alimento básico de mais da metade da população mundial e atualmente, no Brasil, ocupa o terceiro lugar em área cultivada com culturas anuais (CONAB, 2015). O arroz vermelho ainda é pouco conhecido no Brasil, porém é o mais cultivado principalmente no Semiárido nordestino, nos estados da Paraíba, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Ceará, Bahia e Alagoas (DINIZ FILHO, et al., 2011).

De acordo com MENEZES et al. (2012), o arroz (*Oryza sativa* L.) é uma cultura que apresenta ampla adaptabilidade às diferentes condições de solo e clima, além de ser a espécie com maior potencial de aumento de produção e, possivelmente, de combate à fome no mundo. Arroz, trigo, cana e algodão contabilizam 66% do total de resíduos gerados na produção industrial (PRASAD e SINGH, 2007).

Os materiais lignocelulósicos são amplamente disponíveis a baixo custo e renováveis, considerados ideais para a produção de etanol (JONSSON et al., 2007). A casca de arroz é um resíduo muito abundante e de baixo valor agregado para ração animal devido ao fato de ser de difícil digestibilidade (SAHA e COTTA, 2008).

Segundo Pereira et al. (2011) o aumento nas áreas de plantio afeta o meio ambiente devido à substituição de áreas de florestas nativas por plantações de culturas como cana-de-açúcar e soja. Além disso, grandes quantidades de resíduos lignocelulósicos são acumuladas no meio ambiente advindos da produção agrícola e do beneficiamento de cereais, por exemplo. O mesmo autor afirma ainda que esse acúmulo acarreta problemas de origem ambiental, como a degradação desses resíduos a céu aberto e a consequente perda de recursos energéticos, uma vez que, são recursos passíveis de biotransformação em etanol, evitando neste sentido, conflitos com a produção de alimentos devido ao uso de culturas alimentares na produção de bioetanol (SOCCOL et al., 2010).

A obtenção de etanol por biomassa envolve duas etapas, a primeira consiste na hidrólise dos polissacarídeos, gerando mono e dissacarídeos e a segunda envolve a fermentação dos monos e dissacarídeos em etanol. A hidrólise da celulose gera glicose e celobiose (um dímero de glicose) e a hidrólise de ligninas e hemicelulose geram açúcares e subprodutos (principalmente, difenóis, derivados de fenilpropano, cetonas, furfural e ácido acético), que muitas vezes inibem a fermentação microbiana (OLSSON, 2005).

Os processos biotecnológicos possibilitam a produção de um grande número de metabólitos de interesse industrial, incluindo enzimas, produzidas comercialmente, na maioria dos processos, a partir de microrganismos, devido em grande parte à diversidade dos mesmos, facilidade, controle operacional e maior rendimento em relação aos processos extrativos de tecidos animais e vegetais (CHANDRA et al., 2010). Um grupo de enzimas presentes nas mais diversas aplicações são as celulases, utilizadas como enzimas chave na bioconversão de materiais celulósicos.

Assim, para acessar o recurso genético da vasta maioria das espécies microbianas que há muito tempo têm escapado dos exames minuciosos científicos, uma nova abordagem denominada metagenômica começou a ser usada (HANDELSMAN et al., 1998). Muito se tem discutido sobre a importância da metagenômica como ferramenta importante em estudos biotecnológicos, em especial aqueles envolvendo a análise de enzimas com potencial econômico.

Essa abordagem permite ir além da estrutura de comunidade (apontando riqueza de espécies e distribuição) possibilitando também determinar o potencial funcional (metabólico) desses seres vivos (TYSON, 2004). Esta estratégia abrange a extração direta do DNA genômico de amostras do ambiente (RONDON et al., 2000).

Para a investigação do potencial da tecnologia metagenômica na recuperação de genes e/ou produtos gênicos de interesse biotecnológico, a construção de uma biblioteca metagenômica a partir de amostras da compostagem de restos culturais de arroz vermelho tornou-se etapa crucial para isolar e caracterizar celulases que sejam naturalmente capazes de converter resíduos de arroz vermelho em glicose.

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Isolar genes de interesse biotecnológico (celulases), em uma biblioteca metagenômica construída a partir de amostras de compostagem de restos culturais de arroz vermelho.

2.2 Objetivos específicos

Construir uma biblioteca metagenômica a partir de amostras da compostagem de restos culturais de arroz vermelho;

Realizar uma triagem funcional da biblioteca metagenômica visando à identificação de clones com atividades celulolítica;

Conhecer as sequências de DNA responsáveis pela atividade celulolítica dos clones identificados;

3.0 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Aspectos gerais da cultura do arroz vermelho

3.1.1 História

O arroz vermelho é a forma espontânea da espécie *Oryza sativa* L. Por dois séculos, esteve regularmente na mesa dos brasileiros, inicialmente na Bahia, ainda no século XVI. Nas várzeas do estado do Maranhão foi introduzido pelos açorianos por volta de 1620 onde prosperou pelo Nordeste, o maior produtor desse cereal no império português. No século XVIII, os portugueses importaram do sul dos Estados Unidos sementes de arroz branco, considerado mais produtivo e rentável (SLOW FOOD BRASIL, 2007). Ainda segundo o mesmo autor, no ano de 1722, a Coroa portuguesa baixou um decreto proibindo de plantar qualquer outra variedade que não fosse a de arroz branco. Em descumprimento, as penas eram bastante severas: um ano de cadeia e cem mil-réis de multa para os homens livres e, para os escravos, “dois anos de calceta com surras interpoladas nesse espaço de tempo”, de modo a levar o arroz vermelho quase a extinção.

Em meados de 1766, a Coroa Portuguesa autorizou a instalação da primeira descascadora de arroz no Brasil, na cidade do Rio de Janeiro. No Brasil, a orizicultura no Brasil aconteceu de forma organizada do século XVIII até a metade do século XIX, tornando-se um grande exportador de arroz (EMBRAPA, 2010; SLOW FOOD BRASIL, 2007). Atualmente é comum encontrar o arroz vermelho crescendo como plantas invasoras nos arrozais comerciais, onde acabam gerando competição intraespecífica por luz, água e nutrientes (PEREIRA, 2004).

3.1.2 Origem, classificação botânica e morfologia

Historiadores apontam que o arroz teve origem no sudeste da Ásia e tem como precursoras as formas silvestres da espécie *Oryza rufipogon*, procedente da Ásia, originando a *O. sativa*; e a *Oryza barthii* (*Oryza breviligulata*), derivada da África Ocidental, dando origem à *O. glaberrima* (EMBRAPA, 2010). O gênero *Oryza* engloba cerca de 23 espécies silvestres, dispersas espontaneamente nas regiões tropicais da Ásia, África e Américas.

É uma gramínea da família das poáceas, pertencente ao grupo das monocotiledôneas, com caule oco, flores reduzidas de cor verde e aquênios especializados cariopse ou fruto-semente (grão), onde se encontram os pigmentos responsáveis pela coloração vermelha dos genótipos de arroz vermelho. É uma espécie hidrófila, cujo processo evolutivo tem levado à sua adaptação as mais variadas condições ambientais, assim, cultivado em todas as regiões e nos cinco continentes

(VAUGHAN, 1994). Seu sistema radicular é formado por raízes adventícias (GUIMARÃES; FAGERIA; BARBOSA FILHO, 2002).

O arroz vermelho e o arroz branco pertencem à espécie *Oryza sativa* L., (BOÊNO; ASCHERI; BASSINELLO, 2011). O arroz vermelho possui características morfológicas que o distingue dos demais. Possui estatura maior, alta capacidade de perfilhamento, colmos mais finos, folhas de cor verde mais claro, ciclos mais longos e apresenta um baixo potencial genético de produção devido a degrana prematura das espiguetas e maior dormência das sementes (DIARRA; SMITH, TALBERT, 1985). A planta apresenta um colmo principal e vários colmos primários e secundários, denominados de perfilhos (CHANG e BARDENAS, 1965). Existem dois grandes ecossistemas para a cultura do arroz: o de várzeas e o de terras altas (sequeiro, cultivado em terrenos mais drenados, principalmente em solos de cerrado e depende exclusivamente das precipitações pluviométricas, fonte de umidade para o desenvolvimento da cultura) (PACHECO, 2008).

3.1.3 Aspectos nutricionais e socioeconômicos

A denominação “arroz vermelho” deve-se à coloração avermelhada do pericarpo dos grãos, devido ao acúmulo de tanino (OGAWA, 1992) ou de antocianina (PANTONE e BEKER, 1991). Essa substância é responsável pela ação antioxidante e a proantocianina é capaz de reduzir a formação de placas ateroscleróticas, condição relacionada a doenças cardiovasculares, e ainda atua como importante repelente a alguns patógenos e predadores da cultura do arroz (SWEENEY et al., 2006).

Um dos principais componentes na dieta alimentar da população do semiárido nordestino brasileiro, o arroz vermelho é cultivado também em áreas isoladas no centro-oeste, e no norte do país, recebe os nomes de arroz da terra, arroz de veneza, arroz maranhão entre outros. Nas casas das famílias ou em restaurantes do interior, é um alimento bastante especial e constitui pratos famosos como o arroz-de-leite e o rubação (EMBRAPA, 2010).

O arroz, além da utilização como ingrediente para a produção de panificados, cereais matinais, fórmulas infantis, alimentos com baixa caloria, fonte de amido e produtos hipoalergênicos, pode ser usado inclusive por pacientes celíacos, que apresentam intolerância às proteínas do trigo, aveia, centeio e cevada (NABESHIMA e EL-DASH, 2004).

Essa cultura apresenta uma ampla adaptabilidade às diferentes condições de solo e clima, além de ser uma espécie com um potencial de aumento na produção devido as demandas locais e

nacionais (MENEZES et al., 2012). Por ser considerado também alimento básico para cerca de 2,4 bilhões de pessoas, o arroz é o produto de maior importância econômica em muitos países em desenvolvimento, de modo que os setores produtivos buscam novas técnicas que possam aumentar a produção (FIDELIS et al., 2012).

O arroz vermelho é encontrado principalmente na Paraíba, e sua produção concentra-se nas regiões do Vale do Piancó e Vale do Rio do Peixe (PEREIRA, 2004). Dados levantados pela Conab para a safra 2014/2015 indicaram uma queda de mais de 90% na produção e na produtividade do arroz vermelho cultivado no Vale do Piancó da Paraíba (CONAB, 2014). Segundo Pereira (2004), é uma microrregião do semiárido nordestino de maior produção deste grão, com uma bacia hidrográfica de solo fértil, porém com um sistema de produção ainda rudimentar, de pouca tecnologia, e agricultores ainda artesanais.

Apesar de ser considerado patrimônio genético, cultural e alimentar para a maioria da população residente na mesorregião do sertão paraibano, ainda é uma variedade de arroz pouco conhecida e pouco explorada nacionalmente. Na Paraíba, representa 95% da totalidade do volume de arroz plantado em seu território. Em condições edafoclimáticas normais oferece trabalho para mais de dois mil agricultores familiares paraibanos, que exploram mais de 7000 hectares de terras e produzem mais de 1500 quilogramas de grãos por hectare (sistema de sequeiro) (CONAB, 2014).

Por outro lado, a produção agropecuária acaba gerando grandes quantidades de resíduos de origem animal, vegetal ou agroindustrial (COSTA et al., 2009) onde muitas vezes, são dispostos no ambiente de forma incorreta, gerando impactos negativos no sistema de equilíbrio ecológico (OLIVEIRA e JUCÁ, 2004). Estes materiais orgânicos constituem importantes fontes de nutrientes e aporte de matéria orgânica ao solo (HASSEN et al., 2001). Assim, esses resíduos representam um grande recurso energético, uma vez que são passíveis de biotransformação em compostos de elevado valor agregado como o etanol.

3.2 Compostagem

Segundo Haug (1993), a compostagem é um processo de decomposição biológica e estabilização de substratos orgânicos, em condições que permitam desenvolvimento de temperaturas termofílicas como resultado do calor produzido biologicamente e com um produto final estável para armazenamento e aplicação na terra, melhorando seus atributos químicos, físicos e biológicos. Vários são os efeitos benéficos da compostagem, como a correção da acidez do solo,

melhorando a absorção de nutrientes fornecendo macro e micro elementos essenciais ao desenvolvimento vegetal (MARACAJÁ et al., 2006).

Kiehl (1998) relata que durante o processo de compostagem é possível observar três fases: a primeira é uma fase rápida de fitotoxicidade ou de composto cru ou imaturo, seguida de uma segunda fase de semi-cura ou bioestabilização, para atingir finalmente a terceira fase, a humificação, acompanhada da mineralização de determinados componentes da matéria orgânica as fases da compostagem relacionando a temperatura do composto no tempo

(Figura 1).

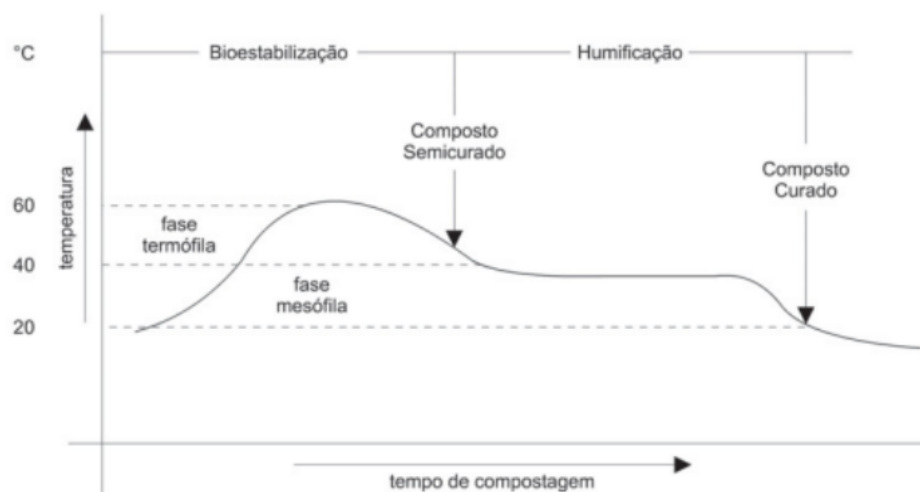


Figura 1. Fases da compostagem (D'ALMEIDA e VILHENA, 2000)

Os compostos orgânicos se usados adequadamente, podem atender plenamente parte da demanda da agricultura em termos de nutrientes essenciais (LEAL et al., 2007). A substituição dos recursos não renováveis e a redução da dependência do País em fertilizantes importados e, em particular para sistemas agrícolas de base familiar, proporcionam sustentabilidade econômica e ecológica (WHITE et al., 2013). Segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), em 2014, do total de fertilizantes consumidos no País, foram importados 70% do nitrogênio, 50% de fósforo e 90% de potássio. De modo que, a adição de agroquímicos pode resultar em degradação do ecossistema, do solo e do meio ambiente (JOHANNSEN e ARMITAGE, 2010), particularmente em ambientes com maior vulnerabilidade à contaminação de águas.

Outra importante utilização dos restos culturais pode ser transformação deste em etanol de segunda geração, que faz uso de materiais lignocelulósicos, como bagaços de culturas e outros resíduos agrícolas, utilizando tratamentos químicos, termoquímicos ou rotas bioquímicas, para

obter o produto-alvo, de forma a melhorar a eficiência do processo, bem como reduzir os impactos ambientais (MARTIN et al., 2006; SOCCOL et al., 2010; DIAS, 2010).

A produção de bioetanol a partir dessa biomassa lignocelulósica é uma forma de reduzir o consumo e o esgotamento dos combustíveis fósseis e a poluição ambiental. (GIL et al., 2010), pois os materiais lignocelulósicos estão disponíveis a baixo custo e são renováveis (JONNISON et al., 2007).

3.3 Biomassa vegetal

A biomassa vegetal é composta por duas classes, a primeira é formada por açúcares de reserva como o amido e a sacarose que é amplamente utilizada pelas indústrias alimentícias e de bioconversão a etanol. E, a segunda classe é composta pelas partes estruturais da planta, é o caso da lignocelulose, que é formada por açúcares mais complexos e de difícil acesso (OCTAVE e THOMAS, 2009).

Os maiores componentes da parede celular são a celulose, hemicelulose e lignina além de vários compostos inorgânicos. A quantidade de cada componente na planta irá depender da espécie da planta, idade, tempo de colheita e condição ou estágio de crescimento (JEFFRIES, 2000). Segundo Roberto, Mussatto e Rodrigues (2003) a palha do arroz é constituída de 43% celulose, 22% hemicelulose e 17 % lignina.

A celulose é um polímero linear composto de subunidades de D-glicose unidas por duas ligações β -1,4 resultado de uma rotação de 180° do plano de unidades alternadas de glicose, de modo a ser uma cadeia molecular balanceada, onde é possível que uma molécula de cadeia linear seja capaz de orientar-se em estruturas fibrosas e cristalinas de alta tensão. Além disso, a celulose possui uma extremidade redutora no carbono 1, e outra não redutora no carbono 4, (figura 2) (SANDGREN; SAHLBERG; MITCHINSON, 2005).

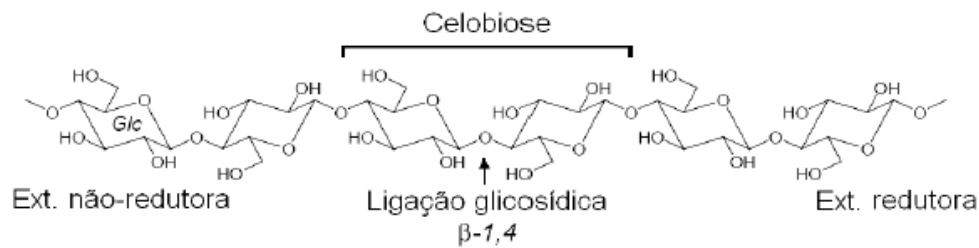


Figura 2. Estrutura da celobiose e da ligação β -glicosídica na celulose (adaptado de SANDGREN; SAHLBERG; MITCHINSON, 2005).

As ligações de hidrogênio inter e intramoleculares são responsáveis pela manutenção das regiões cristalinas e tornam a celulose altamente resistente à hidrólise ácida, alcalina ou enzimática (WOOD e SADDLER, 1998; CONVERSE e WARE, 1994). Para que ocorra quebra da celulose é necessário que haja um ataque conjunto sobre um composto complexo de celulose unida à lignina e hemicelulose, raramente ocorre por meio de um processo isolado, de modo que a ação combinada de enzimas extracelulares com especificidade complementar é essencial (BERGUIN e AUBERT, 1994).

Levando-se em consideração esses aspectos, as principais enzimas responsáveis para que ocorra a quebra das ligações β -1,4 da celulose são encontradas em fungos, são elas: as endoglucanases (1,4- β -D-glicanohidrolase), as exoglucanases (1,4- β -D glicanocelobiohidrolase) e as β -glicosídes (LESCHINE, 1995).

3.4 Enzimas envolvidas na degradação da celulose

Um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado, a tecnologia enzimática vem sendo um dos campos mais promissores por apresentar menor impacto ambiental e também menor consumo energético (ROCHA, 2010). Onde, estas enzimas servem como catalisadores biológicos potentes e eficazes devido a especificidade pelo substrato e a especificidade em promover somente uma reação bioquímica com seu substrato (SANTOS, 2007).

O complexo enzimático de celulases é composto principalmente por endoglucanases, exoglucanases e β -glucosídes e são divididos de acordo com o local de atuação (Figura 3) (CARVALHO, 2011; CASTRO, 2010).

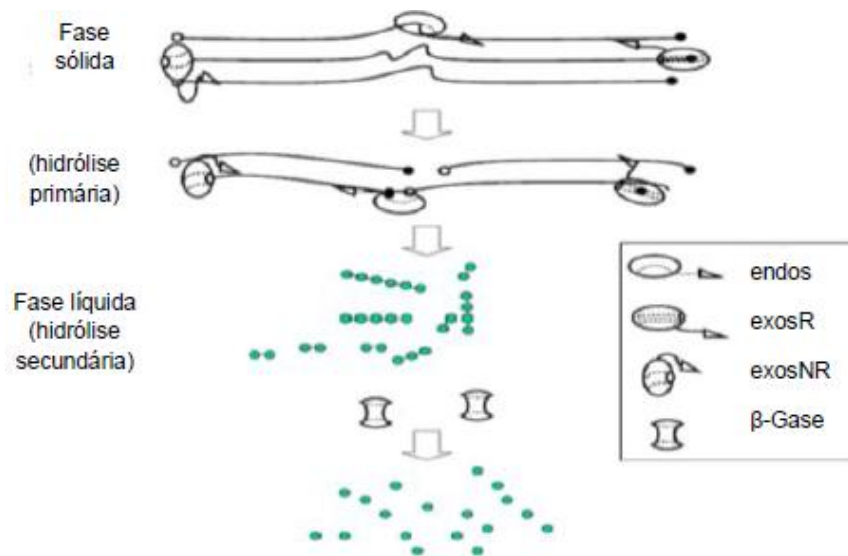


Figura 3. Representação esquemática da celulose e da ação das celulases: endoglucanases, (endos), exoglucanases de terminais redutores (exosR), exoglucanases de terminais não redutores (exosNR) E β -glucosidases (Fonte: BANSAL et al., 2009).

A hidrólise é inicializada com a atuação das endoglucanases e realização de uma clivagem randômica das ligações glicosídicas internas da fibra lignocelulolósica, tornando-as mais expostas. De modo que elas reduzem o grau de polimerização da fibra e geram regiões amorfas. Oligossacarídeos também são liberados com diferentes graus de polimerização e terminais redutores e não redutores. Essas regiões amorfas permitem uma melhor ação das enzimas por não possuírem ligações intermoleculares de hidrogênio tão fortes quanto às regiões cristalinas (MENDES, 2010). O sítio ativo das endoglucanases possui a forma de uma chave, possibilitando a ação da enzima ao longo da cadeia de celulose e reduzindo o grau de polimerização de maneira considerável.

As exoglucanases atuam na região externa da celulose e são divididas em celobiohidrolases tipo I e II (tipo I hidrolisa os terminais redutores e a tipo II hidrolisa os terminais não redutores da celulose), sendo responsáveis por romper fisicamente o substrato, promovendo uma desestratificação das fibras, aumentando consideravelmente as regiões amorfas e as glucano hidrolases. O produto liberado a partir da ação das celobiohidrolases é a celobiose, um dímero de glicose, sendo este também um inibidor da ação dessas enzimas. As glucano hidrolases também agem nas extremidades dos oligossacarídeos, porém são capazes de liberar glicose diretamente deste polímero (PIETROBON, 2008; MACHADO, 2009). O sítio ativo das celobiohidrolases

possui formato de túnel por onde a cadeia de celulose penetra e sofre hidrólise de suas ligações glicosídicas terminais, liberando principalmente celobiose.

A última celulase a atuar na hidrólise é a β -glucosidase. A liberação da glicose ocorre a partir da celobiose. Do mesmo modo que as celobiohidrolases, estas celulases também são inibidas por seu produto (CASTRO, 2010; MENDES, 2010). Os mesmos autores ainda afirmam que o complexo celulolítico atua em sinergia, ou seja, apresenta um melhor rendimento a partir da mistura de enzimas. Três formas de sinergia são conhecidas, sendo estas a sinergia EnG-ExG (endoglucanase/exoglucanase), sinergia ExG-ExG (exoglucanases) e sinergia ExG-BG e EnG-BG (exoglucanase/ β -glucosidase e endoglucanase/ β -glucosidase), o que torna o mecanismo altamente complexo e instável.

Os microrganismos utilizam suas enzimas para a hidrólise da biomassa e esse processo é uma das novas alternativas que podem ser aplicados na indústria para a liberação de açúcares da parede celular vegetal (RUBIN, 2008). A diversidade da composição da parede celular vegetal está relacionada com a diversidade de enzimas secretadas pelos microrganismos, para que a desconstrução da parede celular vegetal ocorra de forma eficiente (FARINAS, 2011). Por apresentar uma grande diversidade e desempenhar funções únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas, a produção de enzimas extracelulares, que ajudam na degradação da matéria orgânica é cada vez mais procurada e explorada pela indústria (MELO et al., 2014).

Assim, a identificação de microrganismos permite realizar pesquisas que acarretam em avanços consideráveis, a exemplo das buscas por enzimas envolvidas no processo de obtenção de biocombustíveis, (SINSABAUGH et al., 1991), utilizando como ferramenta a metagenômica. Os microrganismos são encontrados em todo nicho ecológico sobre a terra (WHITMAN; COLEMAN; WIEBE, 1998). Essa complexidade gera um desafio para a biotecnologia, já que estima-se que 99% dos organismos presentes no mundo não são cultiváveis usando técnicas tradicionais de cultivo e plaqueamento, de modo a limitar o conhecimento quanto a ecologia microbiana e suas possíveis potencialidades na biotecnologia (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER; 1995).

3.4.1 Fatores que afetam a hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática é frequentemente catalisada pela celulase e a fermentação é realizada por leveduras. A conversão inclui dois processos: hidrólise da celulose em materiais lignocelulósicos para fermentação de açúcares redutores e a fermentação do açúcar em etanol. Os fatores que afetam a hidrólise enzimática da celulose são três: substratos (características estruturais do substrato, incluindo cristalinidade da celulose, o grau de polimerização da celulose, área de

superfície (porosidade) e conteúdo de lignina), a atividade da celulase e condições de reação (temperatura, pH, bem como outros parâmetros) (McMILLAN, 1994).

As variações de concentração de H^+ do meio sensibilizam as enzimas porque cada enzima possui um pH ótimo além de possuírem muitos grupos ionizáveis, pertencentes a resíduos de aminoácido da molécula, onde as trocas de pH podem alterar sua conformação, sua capacidade de união com o substrato e a atividade catalítica dos grupos que formam o sítio ativo (THYS, 2004).

Para a temperatura, existe uma zona para qual a atividade enzimática é máxima, de modo que esta variação é resultado de duas tendências antagônicas. A primeira é o aumento da agitação das moléculas com a elevação da temperatura, que aumenta a frequência das colisões entre o substrato e a enzima e de outro, a desnaturação da enzima, frente à ação do calor. A segunda é quando a desnaturação da proteína que leva tempo para ocorrer, mesmo que o aumento da velocidade de reação se produza de maneira instantânea (SCRIBAN, 1985).

3.5 Metagenômica

Relatos históricos apontam a utilização de microrganismos e enzimas microbianas para processar materiais naturais a muito tempo. Babilônios e sumérios, por exemplo, no ano de 6 mil a.C. utilizavam cereais para produzir bebidas alcoólicas por meio de processos fermentativos, assim como os egípcios em meados do ano 2 mil a.C. faziam uso de fermento para a fabricar cerveja e pão (BUD, 1993).

Na década de 90, a microbiologia ambiental foi revolucionada pelo avanço das técnicas moleculares e assim permitiram a identificação de uma maioria microbiana até então não identificada pelos métodos de cultivo tradicionais (MELO et al., 2014). As técnicas moleculares e análises filogenéticas a partir de sequências de DNA, são importantes para conhecer a distribuição e identificação de microrganismos não-cultiváveis, sem que haja necessidade de cultivá-los (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2003).

O termo metagenômica é derivado do conceito estatístico de meta-análise (processo de combinar estatisticamente análises separadas) e genômica (análise ampla do material genético de um organismo) (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2003). Nesse sentido, o descobrimento de novos genes, proteínas e vias metabólicas que podem ser exploradas para processos industriais, também fazem com que a metagenômica funcione como um grande catálogo representativo de microrganismos, permitindo compreender e prever o impacto da indústria, da agricultura e de

outras atividades na diversidade procariótica e, compreender, ainda, a evolução de patógenos e de bactérias potencialmente úteis (TOUSSAINT; GHIGO; SALMOND, 2003).

Algumas enzimas que podem ser utilizadas como “chaves” de ativação em vários processos de produção de alimentos, manufatura de papel e produção de bioetanol (SARANRAJ; STELLA; REETHA, 2012). Desse modo, a extração direta do DNA metagenômico de amostras do ambiente resultam em construções de bibliotecas metagenômicas, que servem como uma base para examinar vias metabólicas; analisar a diversidade microbiana; e identificar genes codificadores de proteínas de interesse biotecnológicos (RONDON et al., 2000).

A metagenômica envolve a clonagem de fragmentos grandes de DNA (40 a 100 kb), obtido a partir de amostras ambientais, em vetores tipo BAC (Cromossomo Artificial de Bactéria), fosmídeos ou cosmídeos, analisando as bibliotecas resultantes em busca de uma nova expressão fenotípica na linhagem hospedeira de *E. coli* (HANDELSMAN et al., 1998; RONDON et al., 2000).

A partir de uma biblioteca metagenômica, uma variedade maior de compostos com atividade biológica de interesse pode ser obtida simultaneamente, em comparação ao método tradicional de obtenção de compostos naturais, baseado em isolamento, cultivo e triagem de linhagens puras de microrganismos (DANIEL, 2004). Para o mesmo autor, o isolamento de DNA de alta qualidade é primeira etapa para a construção de bibliotecas metagenômica, de modo que seja adequado para clonagem e represente a diversidade microbiana presente na amostra original (Figura 4). As etapas para a construção de bibliotecas metagenômicas incluem: isolamento de DNA, ligação do DNA em vetor específico, clonagem do DNA e inserção do vetor em célula hospedeira, construção da biblioteca metagenômica e rastreamento dos clones da biblioteca.

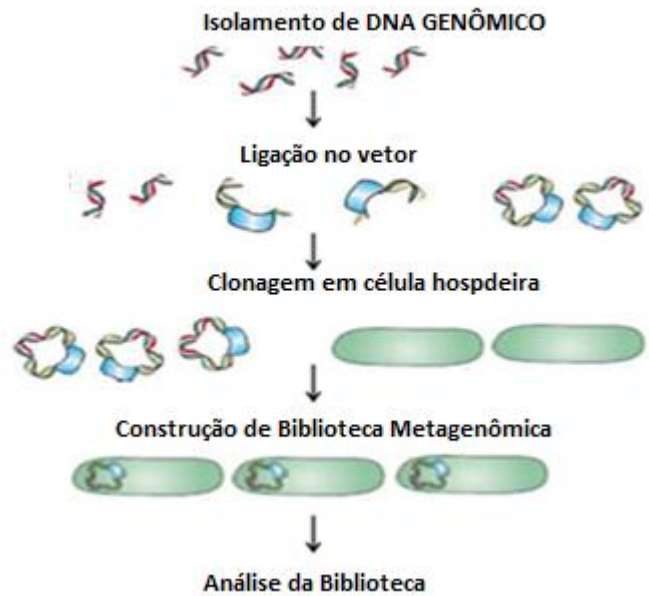


Figura 4. Esquema geral das etapas que envolvem a construção de bibliotecas metagenômica (Fonte DANIEL, 2004) adaptada.

Por apresentar uma grande diversidade e desempenhar funções únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas, a produção de enzimas extracelulares, que ajudem na degradação da matéria orgânica é cada vez mais procurada e explorada pela indústria (MELO et al., 2014). Assim, a identificação de microrganismos permite realizar pesquisas que acarretam em avanços consideráveis, como a busca por enzimas envolvidas no processo de obtenção de biocombustíveis, (SINSABAUGH et al., 1991).

3.6. Obtenção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica

A produção de etanol de segunda geração começa com a obtenção do material lignocelulósico que pode ser palha de trigo, arroz, cana-de-açúcar ou até mesmo o pseudocaule da bananeira. O pré-tratamento aumenta o acesso das enzimas que podem melhorar a digestibilidade da celulose. Cada pré-tratamento tem um efeito específico sobre a fração de celulose, hemicelulose e lignina, de modo que os diferentes métodos do pré-tratamento devem ser escolhidos, de acordo com a configuração do processo selecionado, para a subsequente hidrólise e etapas de fermentação (ALVIRA et al., 2010).

A lignina restringe a hidrólise devido ao fato de esconder a superfície celulósica, impedindo assim o intumescimento das fibras. Por isso, é necessário uma etapa de pré-tratamento, para quebrar a estrutura cristalina da lignocelulose quanto a remover a lignina, expondo as moléculas de celulose e hemicelulose à ação enzimática (OGEDA e PETRI, 2010). Esses processos (Figura 5) de pré-tratamentos desses tipos de matérias podem ser térmicos, químicos, físicos, biológicos

ou uma combinação de todos esses o que dependerá do grau de separação requerido e do fim proposto (SANTOS e GOUVEIA, 2009).

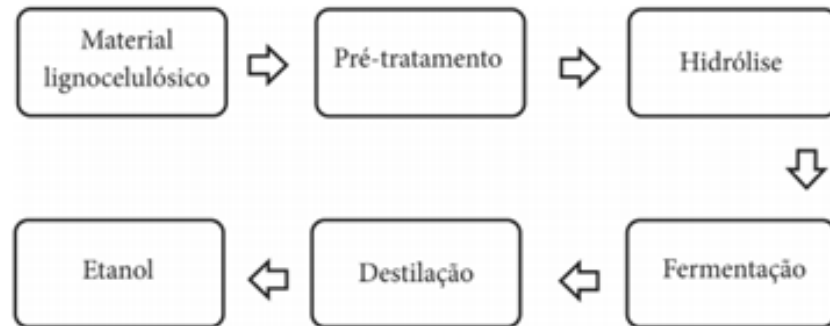


Figura 5. Rota tecnológica da biomassa lignocelulósica, para obtenção de etanol (Fonte: SANTOS, F. et al., 2012) adaptada.

A terceira etapa é a hidrólise dos polissacarídeos da biomassa em açúcares fermentáveis e sua posterior fermentação, é uma reação heterogênea, catalisada pelas celulases, sendo distinguida por um substrato insolúvel (celulose) e um catalisador solúvel (enzimas) (SILVA, 2010). Esta tarefa é executada com base no uso de rotas ácidas e/ou enzimáticas, para a separação dos açúcares e remoção da lignina. Devido às diferenças entre a hemicelulose e a celulose, a hidrólise ácida ocorre em dois estágios. Ainda segundo o mesmo autor, o primeiro é a hidrólise da hemicelulose conduzida conforme as condições do pré-tratamento. No segundo estágio, temperaturas mais altas são aplicadas, buscando otimizar a hidrólise da fração celulósica.

A fermentação é a transformação dos açúcares em etanol, gás carbônico e outros subprodutos, através da ação de leveduras, tais como *Saccharomyces cerevisiae*, bastante utilizada para a produção industrial de álcool combustível, devido à sua capacidade de assimilar facilmente a glicose da cana ou da celulose de biomassas residuais (SILVA, 2010).

A quarta etapa é o bioprocesso Consolidado (CPB) que consiste num processo de hidrólise da biomassa, onde ocorre o máximo de integração, na qual todas as operações de caráter biológico (inclusive a produção de enzimas) são realizadas em um único reator (LYND et al., 2002) e posteriormente ocorre a etapa de destilação.

4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção e avaliação de amostras a partir da compostagem de arroz vermelho

Os restos culturais de arroz vermelho foram coletados no Município de Santana dos Garrotes - PB, situado a 316 metros de altitude. As coordenadas geográficas do município são latitude: 7° 23' 14" e longitude: 37° 58' 20", entre os meses de maio e junho de 2015.

Este trabalho foi dividido em duas partes. A primeira etapa foi a realização da coleta das plantas de arroz vermelho e a compostagem desse material vegetal, sendo esta última executado no Viveiro de Mudas da UEPB, enquanto que, a segunda etapa foi a preparação das amostras, extração do DNA metagenômico e as análises das atividades enzimáticas ambas realizadas no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da UEPB, no município de Campina Grande-PB.

Os restos culturais foram fragmentados em pedaços de 3,0 cm utilizando-se picadeira mecânica. Os restos vegetais foram acondicionados em local cimentado (lisímetro com dimensões de 100 cm de comprimento, 50 cm de largura e 50 cm de profundidade) coberto com lona plástica, a perda de nutrientes por lixiviação devido às chuvas e a perda de umidade.

Para a montagem foram utilizados folhas, caules, espiguetas e palha na proporção de 15:10:6:5 (% em peso) respectivamente foram utilizadas. A temperatura variou de 55-70 ° C e a umidade entre 80% e 90%. O processo de compostagem durou 60 dias após o início do processo (DAIP), tendo como base os resultados obtidos por Leal (2006).

4.2 Extração e purificação do DNA metagenômico a partir da compostagem de arroz vermelho

O DNA metagenômico dos restos culturais foi extraído pelo método de lise direta descrito por Zhou, Bruns e Tiedje (1996) e com as modificações sugeridas por Kauffmann, Schmitt e Schmid (2004) através dos compostos coletados. Para 1 g de amostras adicionou-se 2,6 mL de tampão de extração (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 100 mM de ácido etileno diamonotetracético (EDTA) pH 8,0; 100 mM de fosfato de sódio pH 8,0; 1,5M de cloreto de sódio (NaCl), 1% (p/v) de brometo de cetil-trimetilamônio (CTAB)). A mistura foi homogeneizada em agitador do tipo "vórtex". Foram coletadas um total de dez amostras da pilha de compostagem, para uma representação significativa de todo material.

As amostras foram submetidas a 3 ciclos de congelamento em N₂ líquido e descongelamento a 65°C com posterior adição de 50 µL de solução contendo 20 mg.mL⁻¹ de proteinase K. Após 30 minutos de vigorosa agitação em vórtex a 37°C, onde posteriormente foi adicionado 300 µL de uma solução contendo 20% (p/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS) ao extrato e incubado por 2 horas à 65°C com suaves agitações a cada 20 minutos.

O sobrenadante proveniente da extração foi recuperado a partir de centrifugação a 4.000 x g por 10 minutos. O sedimento foi submetido a nova extração com 2 mL de tampão de extração, incubação à 65°C por 10 minutos e nova centrifugação a 4.000 x g por 10 minutos. Os dois sobrenadantes foram misturados e a eles adicionado 1/10 do volume de uma solução contendo 10% (p/v) de CTAB e, submetidos a outra etapa de centrifugação a 4.000 x g por 10 minutos.

O sobrenadante recuperado foi submetido a extração com solução de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) (v/v). A mistura foi homogeneizada vigorosamente e, em seguida, centrifugada a 14.000 x g por 10 minutos. A fase aquosa foi coletada, o restante precipitado com isopropanol, lavada com etanol 70%, seca e ressuspensa em 100 µL de solução contendo 10 mM de Tris-HCl pH 8,5. Após estes procedimentos, o DNA extraído das 10 amostras foi misturado obtendo-se apenas um tubo contendo todo material extraído.

A purificação do extrato bruto de DNA foi realizada em uma única etapa empregando colunas CHROMA SPIN+TE-1000 (BD Biosciences Clontech, Germany) de acordo com as instruções do fabricante. Onde, na amostra adicionou-se igual volume de Fenol: Clorofórmio: Álcool isoamílico (25:24:1) seguido de uma leve agitação e centrifugados por 10 minutos. A fase superior foi removida e transferida para um novo tubo estéril contendo 3,5 vezes o volume do sobrenadante de n-butanol, seguidos de leve homogeneização e centrifugação por 1 minuto. Posteriormente a fase orgânica (superior) foi retirada e o material concentrado (cerca de 40-70 µL) aplicado nas colunas de cromatografia CHROMA SPIN+TE-1000 para ressuspensão e subseqüentes aplicações de tampão TNE 1x. Uma vez purificado, o DNA metagenômico foi quantificado por método fluorimétrico com auxílio de um fluorímetro do tipo QuBit 3.0, seguindo as especificações do fabricante.

O DNA extraído foi observado por eletroforese em gel de agarose 1,0% a 45 volts por cerca de 30 minutos. Após a eletroforese o gel foi corado com brometo de etídeo (10 µg.mL⁻¹), descorado e, em seguida, fotografado sob luz ultravioleta.

4.3 Construção de biblioteca metagenômica

A biblioteca metagenômica foi construída empregando o kit de clonagem de cosmídeo pWEB::TNC (Epicentre, Madison, WI, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. Onde, o DNA metagenômico isolado da compostagem de arroz vermelho quebrado por passagens sucessivas do mesmo por ponteiros de 200 μ L. Cerca de 20 μ g de todo o DNA quebrado foram então reparados.

4.3.1 Reparo dos fragmentos para clonagem em vetor cosmídeo

A reação de reparo das extremidades do DNA metagenômico foi realizada, possibilitando assim a ligação ao vetor cosmídeo, aberto no sítio de restrição da enzima *Sma*I, ao DNA metagenômico, ver na figura 6. O DNA purificado teve suas extremidades reparadas com a enzima T4 DNA polimerase e T4 polinucleótido-quinase para gerar extremidades cegas.

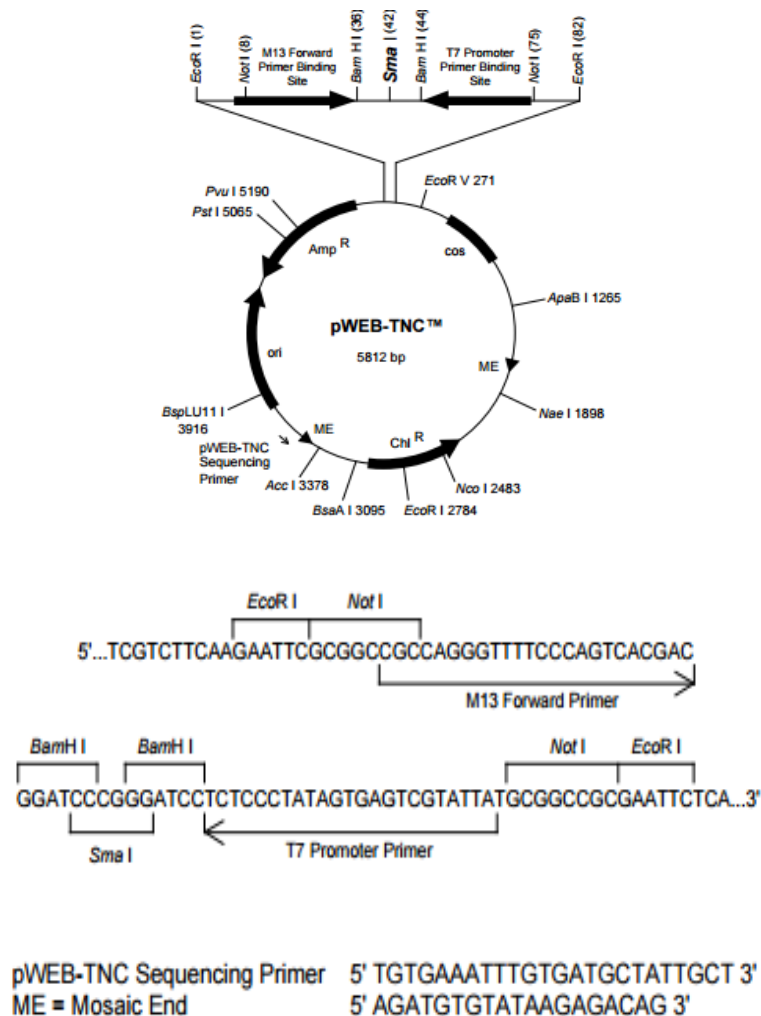


Figura 6. Esquema ilustrativo apresentando características do vetor cosmídeo pWEB-TNC (EPICENTRE)

4.3.2 Seleção do tamanho dos insertos

Os fragmentos de DNA metagenômico entre 40 e 50 kb foram recuperados em gel de agarose e posteriormente ligados ao vetor de cosmídeo pWEB::TNC que foi linearizado no sítio único *SmaI* e desfosforilado (com auxílio de enzima rSAP, Shrimp Alkaline Phosphatase (rSAP)), procedimento que será descrito mais abaixo. A seleção do tamanho do DNA foi realizada através de eletroforese preparada em gel de agarose de baixo ponto de fusão 1% (p/v), isento de brometo de etídio. A cuba de eletroforese foi previamente descontaminada com exposição à luz UV por 20 minutos. Uma alíquota de DNA metagenômico foi aplicada ao gel, e ao lado desta aplicou-se o marcador de tamanho molecular 36 Kb “T7 control DNA” (Epicentre). O restante do DNA foi aplicado em um poço largo do gel. A eletroforese foi conduzida em tampão TAE 1X (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA) isento de brometo de etídio, a voltagem constante 30 V por 15 horas.

Após a eletroforese, foi realizado um corte vertical no gel de agarose resultando em duas porções de géis, uma contendo os insertos a serem recuperados, e outra com o marcador e a amostra comparativa para corar. A porção do gel que continha o marcador foi corada com brometo de etídio e observada sob luz UV em um transiluminador.

O padrão de bandeamento serviu como guia para obtenção dos insertos na porção não corada do gel, colocando-se as duas partes do gel lado a lado. A região do gel contendo insertos de tamanho desejado, em torno de 40 e 50 kb foi marcada e cortada com o auxílio de uma lâmina de bisturi, sendo depositada em tubos eppendorf de 1,5 mL, com aproximadamente 400 mg de gel/tubo. Os pedaços de agarose que continham o DNA de tamanho selecionado foram armazenados a 4 °C até o momento da eluição por meio do kit QIAquick Gel Extraction, seguindo o manual do fabricante.

4.3.3 Reação de ligação dos insertos no vetor cosmídeo

A ligação foi efetuada mantendo-se uma relação de concentração entre insertos de DNA metagenômico e vetor, seguindo a recomendação do cálculo da razão molar. A fórmula abaixo determina a razão molar utilizada na ligação dos insertos de DNA metagenômico ao vetor cosmídeo

$$mi = \frac{Ti.mv}{10.Tv}, \text{ onde: } mi = \text{massa do inserto, } Ti = \text{tamanho do inserto, } mv = \text{massa do vetor e } Tv = \text{tamanho do vetor.}$$

4.3.4 Reação de empacotamento

Foi retirado do freezer (-80 °C) o extrato de empacotamento, mantendo este no gelo por 5 minutos. Ao material ligado foi adicionado 25 µL de extrato de empacotamento. As amostras foram agitadas cuidadosamente e incubadas a 30 °C por 90 minutos. Após esse período, adicionou-se mais 25 µL do extrato de empacotamento e novamente a reação foi incubada a 30 °C por mais 90 minutos. Em seguida, adicionado 500 µL de tampão de diluição de fagos (10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂) e 25 µL de clorofórmio. Os tubos foram agitados por inversão e estocados a 4 °C.

4.4 Infecção das células *E. coli* EPI100

Os produtos ligados foram transformados em células infectadas com *E. coli* EPI100, assim cada 10 µL da solução com os cosmídeos empacotados foi misturado, em condições estéreis, a uma alíquota de 100 µL de células EPI100, previamente preparadas. Os tubos foram levemente agitados e incubados em banho-maria a 37 °C, por 20 minutos. Após esse período, os 110 µL de cada um dos tubos foi aplicado em placa contendo meio de cultura LB, adicionado de cloranfenicol (12,5 µg.mL⁻¹). As placas foram incubadas durante a noite em uma estufa B.O.D. a 37 °C.

Após a incubação das placas que receberam os clones transformantes em estufa B.O.D. a 37 °C por 22 horas, as colônias presentes nas placas foram coletadas. Os clones transformados foram repicados com palitos de madeira esterilizados para placas estéreis de poliestireno (96 “well assay plate”, 250 µL) contendo 125 µL de meio LB acrescido de 12,5 µg/mL de cloranfenicol. As placas foram incubadas em estufa B.O.D. por 22 horas. Após esse período, em fluxo laminar, adicionou-se 125 µL de solução de glicerol 40% (v/v). As placas foram estocadas à -80 °C.

Uma biblioteca de 10.000 clones foi construída e chamada de EglARR. A análise de restrição com a enzima *bamHI* de 50 clones escolhidos aleatoriamente mostrou que todos os cosmídeos continham fragmentos de DNA com tamanhos entre 15 e 60 kb. O tamanho médio dos insertos de DNA da biblioteca foi de aproximadamente 40 kb. Para tal, uma extração de plasmídeos de cada uma dos 50 clones aleatórios foi baseada no método de fervura (HOLMES e QUIGLEY, 1981): 1,5 mL da cultura crescida cerca de 20 h foram sedimentadas (14.000 x g). O precipitado celular foi ressuscitado em 350 µL de tampão STET (100 mM de NaCl; 10 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM de EDTA, pH 8,0; 5% de Triton X-100), foi adicionado 25 µL de solução de lisozima (10 mg.ml⁻¹ em 10 mM de Tris-HCl, pH 8,0) e agitado por 3 s. Após esse procedimento, tubo foi mantido a 90°C por 1 min e centrifugado a 14.000 x g por 10 min. O sobrenadante foi transferido

para um novo tubo, onde foram adicionados 40 μL de NaOAc 3M (pH 5,2), homogeneizados e, adicionados 420 μL de isopropanol. Após 5 min a temperatura ambiente, foi centrifugado a 14.000 x g por 10 min. O sobrenadante foi removido e o material precipitado lavado com 500 μL de etanol 70%. Após a remoção completa do etanol, o precipitado foi ressuspenso em 20 μL de tampão TE (10 mM de Tris-HCl e 1 mM de EDTA, pH 8,0) contendo RNase A (20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

4.5 Seleção de clones com atividades celulolítica

Os 10.000 clones da biblioteca foram rastreadas para a atividade de endo-1.4- β -glucanase (carboximetilcelulase) de acordo com protocolos descritos por Teather e Wood (1982). Uma seleção inicial foi realizada de modo a avaliar a atividade celulolítica. Para tal, os clones obtidos da biblioteca metagenômica foram plaqueados com auxílio de replicador de 96 pinos em meios específicos para cada ensaio suplementados com 12,5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ do antibiótico cloranfenicol e, incubados à 30°C por um período de 2 a 5 dias de acordo com o ensaio em questão.

Para a determinação da atividade celulolítica, os clones da biblioteca metagenômica foram cultivados em meio LB sólido contendo carboximetilcelulose (CMC). Após o crescimento, durante 3 dias, as placas foram reveladas para a detecção da atividade de CMCase. A revelação realizada por meio da incubação da placa a 50°C em tampão citrato de sódio 50mM pH 4.0, durante 30 minutos. Após a incubação, a placa foi corada em solução 0,1% de Vermelho Congo durante 10 minutos, e o excesso de corante foi removido por lavagens sucessivas em NaCl 1M.

4.6 Análise da sequência dos insertos de interesse presentes nos cosmídeos

Após a detecção dos insertos de interesse pela seleção descrita no tópico anterior, os clones de interesse foram crescidos em meio LB contendo cloranfenicol e submetidos a uma extração de DNA plasmídial, (descrito no tópico 4.4.). Logo, os insertos de interesse contidos nos plasmídeos foram amplificados por reações de polimerização em cadeia (PCR) a partir de iniciadores disponíveis no kit pWEN::TNC: M13- (5'-TGTGAAATTTGTGATGCTATTGCT-3') e T7 (5'-AGATGTGTATAAGAGACAG-3'). As condições empregadas nas reações de PCR foram: 5 min a 95°C, desnaturação; 1 min a 95°C, desnaturação; 1 min a 60°C, anelamento; 2 min a 72°C, polimerização; voltar a segunda etapa 29 vezes; depois, 5 min a 72°C, polimerização e, finalmente, 4°C. A reação foi constituída de 2,5 mM de MgCl_2 , 0,2 mM de cada diribonucleotídeos (dNTP), 2,5 U de *Taq* DNA polimerase, tampão para *Taq* DNA polimerase 1X (1 mM de Tris-HCl, pH 9,0 e 5 mM de KCl) (Invitrogen), 10 μM de cada iniciador e 200 ng de DNA total. O que possibilitou

a localização dos genes que codificam a enzima em questão, além de tornar possível o sequenciamento da mesma por uma empresa terceirizada, MACROGEN (Seul, Coreia do Sul).

As ferramentas InterProScan e Pfam foram utilizadas na identificação de domínios conservados nas sequências protéicas estudadas. InterProScan é uma ferramenta que combina diferentes métodos de reconhecimento de assinaturas protéicas nativas do banco de dados InterPro Member em uma única fonte. O banco de dados Pfam é uma ampla coleção de famílias proteicas, cada uma representada por alinhamento múltiplos de sequências e *Hidden Markov Models* (HMMs). O clone testado foi positivo para a atividade de uma nova endo-1.4- glucanase, chamada de EglARR01, e esta foi sequenciada.

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração e quantificação do DNA

O DNA foi extraído com sucesso de acordo com protocolo descrito no item 4.2. Esses DNAs foram utilizados posteriormente para construção da biblioteca metagenômica, o perfil eletroforético pode ser visualizado na figura 7. Ao analisar o gel observa-se uma alta concentração de DNA nas amostras, salientando que todas as amostras foram reunidas em apenas 1 único tubo. Foi utilizado 6 μ L do marcador de tamanho molecular 36 Kb “T7 control DNA” (Epicentre). Uma análise posterior com auxílio de um fluorímetro indicou uma concentração de 150 ng. μ L⁻¹ (figura 8).

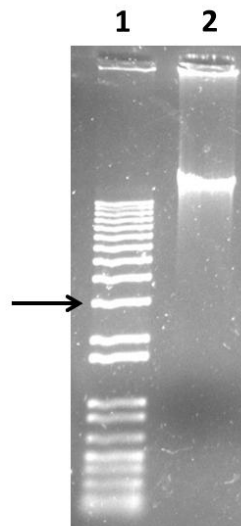


Figura 7. Perfil eletroforético de gel de agarose mostrando a extração e quantificação da amostra de DNA metagenômico. A coluna 1 corresponde ao marcador molecular e a coluna 2 contém DNA metagenômico.

A clivagem do DNA ocorreu de acordo com o esperado, essa quebra mecânica do DNA foi necessária para a escolha do tamanho dos insertos que foram utilizados na clonagem (Figura 6).

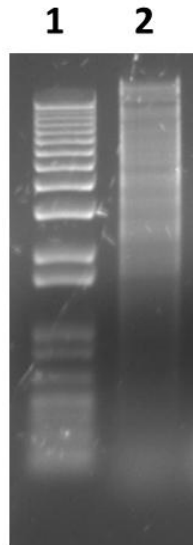


Figura 8. Perfil eletroforético de gel de agarose do DNA metagenômico clivado. A coluna 1 corresponde ao marcador e a coluna 2 corresponde ao DNA clivado. A concentração do DNA foi de aproximadamente $150 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Após a clivagem do DNA, foi realizada a reação de reparo das extremidades do DNA metagenômico, para que este pudesse ser ligado ao vetor. Uma combinação das enzimas T4 DNA polimerase e pela T4 polinucleotídeo quinase foi utilizada para o preenchimento de terminais nos fragmentos de DNA, através da incorporação de nucleotídeos complementares livres em terminais 3' da dupla fita de DNA. Adicionalmente, a atividade exonucleásica 3'→5' da T4 DNA polimerase degrada extremidades protuberantes nos terminais 3'. A enzima T4 ligase com 1mM ATP e a Kinase adicionam grupos 5'-P dos fragmentos de DNA, preparando os insertos para clonagem através de ligação em vetores correspondentes linearizados com a enzima *smaI* (figura 9).

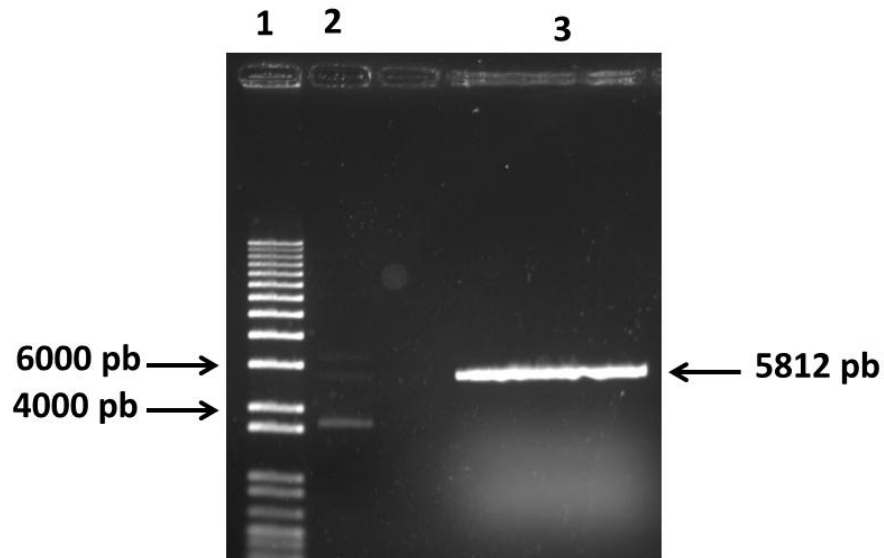


Figura 9. Perfil eletroforético de gel de agarose do vetor pWEB::TNS linearizado, com auxílio da enzima *smaI*. Foi utilizado o marcador de 1kb DNA “Ladder”. A coluna 1 corresponde ao marcador, a coluna 2 corresponde ao vetor circular e a coluna 3 corresponde ao vetor Linearizado com *smaI*.

5.2 Construção e triagem de Biblioteca metagenômica

Para novas atividades enzimáticas, a utilização de metagenomas tem sido bem sucedidas em muitos estudos, demonstrando o quanto de potencial existe em diversos ambientes na busca de proteínas com potencial biotecnológico (LAMBERTZ et al., 2014). A montagem de bibliotecas metagenômicas com insertos entre 15-60 kb é justificada pelo fato de permitir o acesso de vias metabólicas completas, que exigem *operons* inteiros para a síntese de um composto de interesse (figura 10). Dessa forma, a extração de DNA de alto peso molecular (acima de 25 kb) foi de grande importância na montagem da biblioteca.

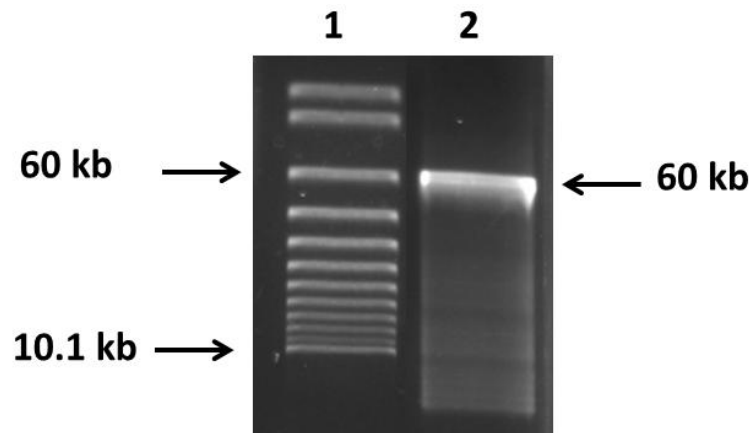


Figura 10. Coluna 1 corresponde ao marcador e a coluna 2 corresponde ao DNA excisado, com bandas que vão desde menos 10.1 Kb e com tamanho máximo de 60 kb.

Assim, neste trabalho, uma biblioteca de 10.000 clones de cosmídeos foi construída usando o DNA isolado a partir de uma pilha de compostagem de resíduos agrícolas de arroz vermelho. Esta biblioteca foi chamada EglARR. Foram escolhidos aleatoriamente 50 clones após a análise da enzima de restrição *Bam*HI e mostrou que todos os cosmídeos continham fragmentos de DNA com tamanhos de 15 a 60 kb (figura 11).

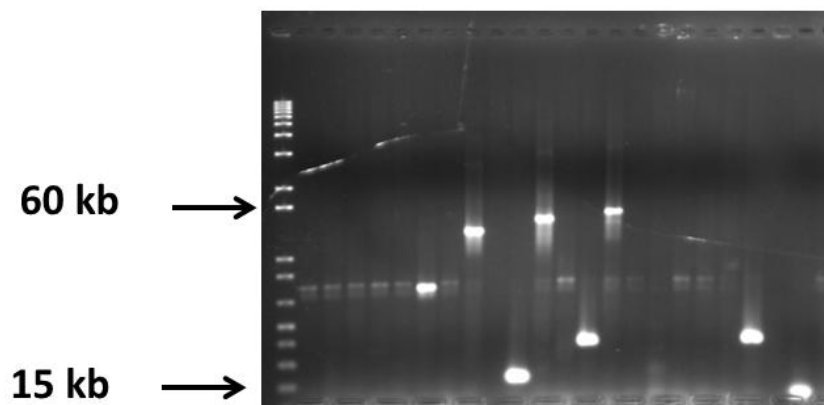


Figura 11. Perfil eletroforético de gel de agarose de plasmídeos recombinantes gerados. DNA excisado com bandas que vão de 15 a 60 kb.

Foram avaliados 10.000 clones em placas de Petri, de modo a fazer uma seleção dos clones produtores de celulase. O teste foi realizado por meio da hidrólise da carboximetilcelulose (CMC) presente no meio de cultura, de modo que a hidrólise foi visualizada através da formação de halo “amarelo” ao redor do clone produtor da celulase (KIM; JUNG; PAN, 2000) (figura 12).

O tamanho médio de DNA inserido na biblioteca foi de aproximadamente 40 kb. Um clone com um fenótipo de carboximetilcelulose-degradantes (CMCase) foi isolado depois de todos os clones de biblioteca EglARR serem examinados (Figura 12). Este gene foi denominado endoglucanase (EglARR01) (depositado como KT779431).

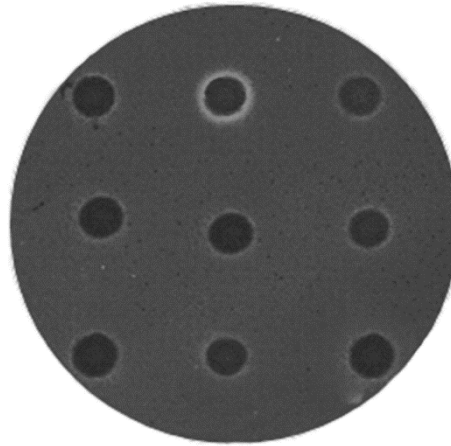


Figura 12. Clonagem de um novo gene de endoglucanase a partir de composto de arroz vermelho utilizando uma abordagem metagenômica funcional. O ensaio de placas de CMC baseia-se na ligação do Vermelho do Congo à celulose.

A clonagem e identificação da nova endoglucanase, EglARR01 está estreitamente relacionada com a família GH8 de hidrolases de glicosilo. A glicosil hidrolases possui 8 familiares (anteriormente conhecida como celulases família D) comumente quebra as ligações glicosídicas β -1 \rightarrow 4, sendo uma das primeiras famílias a ter seus grupos hidrofóbicos caracterizados (WEI et al., 2015).

O principal objetivo das estratégias de triagem funcional é a detecção de reação biocatalítica e posteriormente a identificação do gene responsável pela mesma. Neste sentido, a expressão heteróloga em linhagens de *E. coli* pode vir a limitar a atividade enzimática se houver possíveis diferenças de repertório metabólico e mecanismos de regulação moleculares em relação ao micro-organismo de origem (MELO et al., 2014).

Um exemplo disso, foi uma pesquisa com 32 genomas procarióticos onde constatou-se que 40% dos genes podem ser expressos usando *E. coli* (GRANT et al.,2004) e isso implica dizer que mesmo quando um gene é expresso, o seu nível de expressão pode estar num nível tão baixo que sua detecção pode não ocorrer através de triagem funcional (DANIEL, 2004). Neste trabalho, as amostras avaliadas mostraram que obtivemos sucesso no isolamento de genes envolvidos na degradação da celulose a partir de amostras de resíduos de arroz vermelho.

5.3 Análises de sequência de genes clonados

A sequência de DNA completa do inserto EglARR01 foi de 1,278 pb. Uma análise de alinhamento por BLAST revelou a presença de uma leitura aberta (ORF) de 1080 pb, na inserção que codifica um gene de comprimento completo para uma endoglucanase (EglARR01). O gene EglARR01 foi submetido no GenBank (KT779431) e codifica uma proteína de 359 aminoácidos e massa molecular de 40,1 kDa.

A dedução da cadeia de aminoácidos de EglARR01 foi verificada no NCBI e SwissProt (bancos de dados). Esta pesquisa revelou que EglARR01 pertence à 8 famílias de aminoácidos hidrolase de glicosilo e que a sua identidade é de 69% em relação a uma endoglucanase de uma espécie não cultivável de *Enterobacter* e de 61% para a endo-1,4-D-glucanase de endonuclease III de *Klebsiella oxytoca*.

Uma árvore filogenética foi construída a partir das sequências de aminoácidos para verificar a evolução relacionada de EglARR01 e as 13 endoglucanases conhecidas, incluindo sete a partir de *Klebsiella*. EglARR01 não está intimamente relacionada com quaisquer outros membros da família de endoglucanase, o que sugere que EglARR01 é uma novo tipo de endoglucanase. (Figure 13).

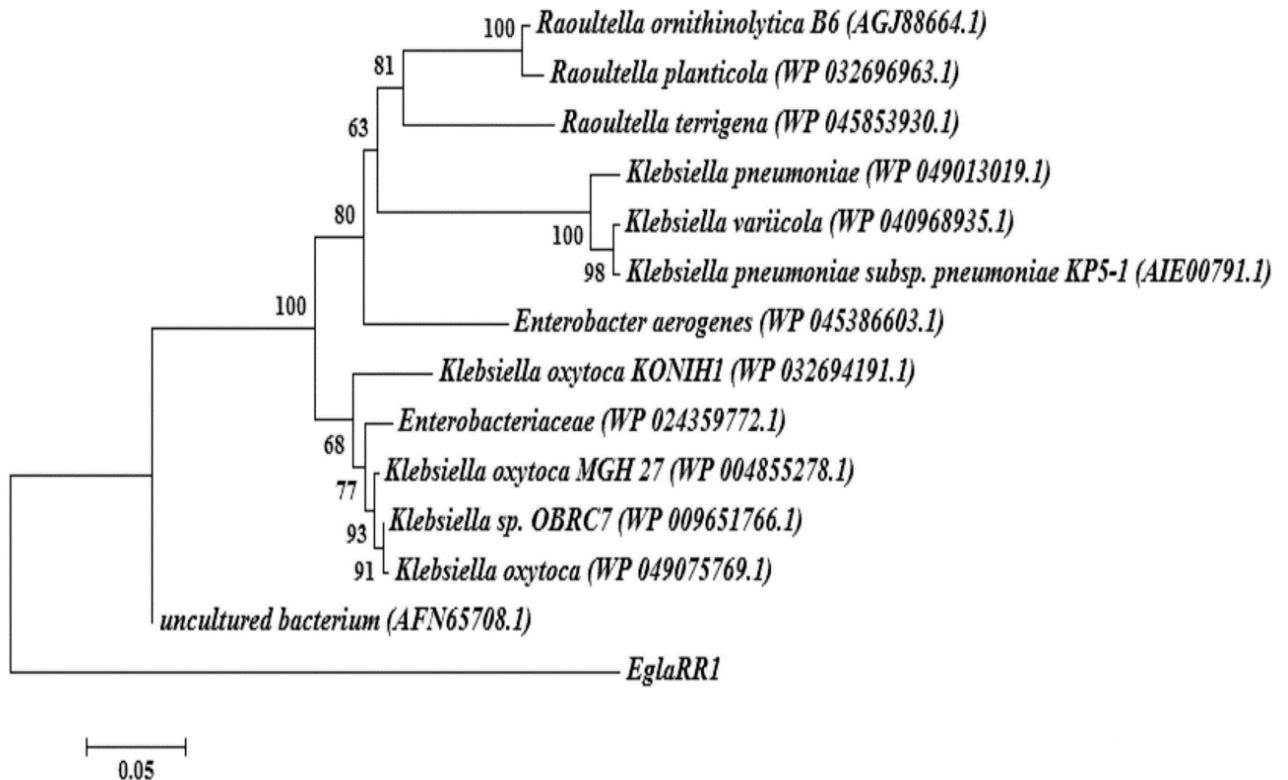


Figure 13. Classificação de EglARR01 por nucleótidos e análise de sequências de aminoácidos. As sequências de aminoácidos de endoglucanases, incluindo EglARR01, foram comparadas e analisadas filogeneticamente usando um método de junção vizinha. Os números de acesso do GenBank estão entre parênteses. A análise filogenética mostrou que EglARR01 está intimamente relacionada com as celulases de uma espécie não cultivada de Enterobacter.

O menor tamanho de uma endoglucanase relatado é de 6,3 kDa a partir de *Cytophaga* (CHANG e THAYER, 1977), enquanto outras celulases estudadas podem chegar a até 400 kDa como encontrado em *Fusarium solani* (WOOD, 1971). O tamanho da proteína purificada EglARR01 neste estudo foi de 40,1 kDa de massa, consistente com o tamanho das proteínas encontradas neste grupo, que variam de 35,9-659 kDa (BABA et al., 2015).

6.0 CONCLUSÕES

- A abordagem funcional para rastrear enzimas usando uma biblioteca metagenômica construída a partir de DNA isolado de restos culturais de arroz vermelho foi eficiente;
- Houve sucesso no isolamento de genes envolvidos na degradação da celulose a partir de amostras de resíduos de arroz vermelho;
- A clonagem e identificação da nova endoglucanase, EglARR01, está diretamente relacionada com a família GH8 de glicosil hidrolases;
- Estas características fazem de EglARR01 uma forte candidata a utilização industrial na produção de etanol de segunda geração.

REFERÊNCIAS

- ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4851-4861, 2010.
- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiol Rev.**, v. 59, p. 69- 143, 1995.
- BABA, Y.; SUMITANI, J.; TANI, S.; KAWAGUCHI, T. Characterization of *Aspergillus aculeatus* β -glucosidase 1 accelerating cellulose hydrolysis with *Trichoderma* cellulase system. Appl. Ind. **Microbiol. Express**, v. 5, p. 1-9, 2015.
- BANSAL, P.; HALL, M.; REALFF, M. J.; LEE, J. H.; BOMMARIUS, A. S. Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. **Biotechnology Advances**, v.27, pp. 833-848, 2009.
- BERGUIN, P.; AUBERT, J.P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.13, p.25-58, 1994.
- BOÊNÔ, J. A.; ASCHERI, D. P. R.; BASSINELLO, P. Z. Qualidade tecnológica de grãos de quatro genótipos de arroz-vermelho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.15, n.7, p.718-723, 2011.
- BUD, R. The use of life: a history of Biotechnology. Cambridge University Press, p. 264, 1993.
- CARVALHO, M. Lucas de. **Estudo cinético da Hidrólise Enzimática de celulose de bagaço de cana-de-açúcar**. 2011. 103 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.
- CASTRO, A.M.; PEREIRA Jr, N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.
- CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento. **Arroz - Brasil: Série Histórica de Área Plantada, Safras 2004/06 a 2014/2015**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=2>>. Acesso em: 17 ago. 2015.
- CONVERSE, A.O; WARE, W. On the reactivity of cellulosic substrates in enzymatic hydrolysis. In: IEA/BIOFOR – Workshop on applications of biotechnology in bioenergy systems, Ottawa. Canadá, 1994.
- COSTA, M.S.S.M.; COSTA, L.A.M.; DECARLI, L.D.; PELÁ, A.; SILVA, C.J.; MATTER, U.F.; OLIBONE, D. Compostagem de resíduos sólidos de frigorífico. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 13, p. 100-107, 2009.
- CHANDRA, M.; KALRA, A.; SHARMA, P.K.; KUMAR, H.; SANGWAN, R.S.. Optimization of cellulases production by *Trichoderma citrinoviride* on marc of *Artemisia annua* and its application for bioconversion process. **Biomass and Bioenergy**. v.34, n.5, p.805-811, 2010.
- CHANG, T. T.; BARDENAS, E. A. **The morphology and varietal characteristics of the rice plant**. Los Baños, 1965. 40p. (IRRI. Technical Bulletin, 4).

- CHANG, W.T.; THAYER, D.W. The celulase system of a *Cytophaga* species. **Can. J. Microbiol**, v.23, p. 1285-1292, 1977.
- D'ALMEIDA, M. L. O., VILHENA, A. **Lixo municipal: manual de gerenciamento integrado**. São Paulo: IPT: CEMPRE, 2000.
- DANIEL, R. The metagenomics of soil. **Nature Reviewpqn Microbiology**, v. 3, n. 6, p.470-478, 2004.
- DIAS, M. O. S. et al. Simulation of integrated first and second generation bioethanol production from sugarcane: comparison between different biomass pretreatment methods. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 955-966, 2010.
- DIARRA, A.; SMITH, J.R.R.J.; TALBERT, R.E. Growth and morphological characteristics of red rice (*Oryza sativa*) biotypes. **Weed Science**, v.33, n.3, p.310-314, 1985.
- DINIZ FILHO, E. T.; MARACAÇA, P. B.; MEDEIROS, M. A.; SOUSA, L.C. F. S. Produção de arroz vermelho utilizando práticas agroecológicas no município de Apodi – RN. **Revista verde de Agroecologia e Desenvolvimento sustentável**, v.6, n.4, p. 157-166, 2011.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISAS AGROPECUÁRIAS (EMBRAPA). **Origem e História do Arroz**. 2010. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/arroz/historia.htm>>. Acesso em: 5 de agosto 2016.
- FARINAS, C.S. **A parede celular vegetal e suas enzimas envolvidas na sua degradação**. São Carlos: Embrapa Instrumentação, p.13, 2011.
- FIDELIS, R. R.; ROTILI, E. A.; SANTOS, M. M.; BARROS, H. B.; RODRIGUES, A. M. Eficiência quanto ao uso e resposta à aplicação de nitrogênio de cultivares de arroz em solos de terras altas no Sul do Estado de Tocantins, safra 2007/2008. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.28, n.3, p. 432-438, 2012.
- GIL N.; FERREIRA S.; AMARAL M.E.; DOMINGUES F.; DUARTEA.P. The influence of diluide acid pretreatment conditions on the enzymatic saccharification of *Erica* SSP for bioethanol production. **Industrial crops and products**. 2010.
- GUIMARÃES, C. M.; FAGERIA, N. K.; BARBOSA FILHO, M. P. Como a planta de arroz se desenvolve. **Arquivo do Agrônomo**, Campinas, n.13, p.1-12, 2002.
- GRANT, S.; SOROKIN, D.Y.; GRANT, W.D.; JONES, B.E.; HEAPHY, S. A phylogenetic analysis of Wadi el Natrun soda lake cellulase enrichment cultures and identification of cellulase genes from these cultures. **Extremophiles**, v.8, p. 421–429, 2004.
- HASSEN, A.; BELGUITHA, K.; CHERIF, A.; CHERIF, M.; BOUBADOUS, A. Microbial characterization durin composting of municipal solid waste. **Bioresources Tecnology**, v. 80, p. 217-225, 2001.
- HAUG, R.T. **The practical handbook of compost engineering**. Lewis Publishers (Ed.), p 717, 1993.

HANDELSMAN, J.; RONDON, M.R.; BRADY, S.F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R.M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry and Biology**, Amsterdam, v. 5, n. 10, p. 245-249, 1998.

JEFFRIES, T.W. Utilization of xylose by bacteria, yeasts and fungi. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**. 63,5,p.495-509, 2000.

JOHANNSEN, S.S.; ARMITAGE, P. Agricultural practice and the effects of agricultural land-use on water quality. **Freshwater Forum**, v. 28, p. 45-59, 2010.

JONSSON ING-M.; VERDRENGH, M.; BRISLERT, M; LINDBLAD, S.; BOKAREWA, M.; ISLANDER, U.; CARLSTEN, H.; OHLSSON, C.; NANDAKUMAR, S.; HOLMDAHL, R.; TARKOWSKI, A. **Ethanol prevents development of destructive arthritis**. Proceeding of the National Academic of Sciences of the United States of America, p.258-263. 2007.

KAUFFMANN, I.M.; SCHMITT, J.; SCHMID, R.D. DNA isolation from soil samples for cloning in different hosts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 64, 665-670, 2004.

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

LAMBERTZ, C.; GARVEY, M.; KLINGER, J.; HEESSEL, D.; KLOSE, H.; FISHER, R.; COMMANDEUR, U. Challenges and advances in the heterologous expression of cellulolytic enzymes: A review. **Biotechnol. Biofuels**, v. 7, p. 1-15, 2014.

LEAL, M.A.A. **Produção e eficiência agrônômica de compostos obtidos com palhada de gramínea e leguminosa para o cultivo de hortaliças orgânicas**. Seropédica, 2006. 133f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

LEAL, M.A.; GUERRA, J.G.M.; PEIXOTO, R.T.G.; ALMEIDA, D.L.; Utilização de compostos orgânicos como substratos na produção de mudas de hortaliças. **Horticultura Brasileira**, v. 25, p. 392-395, 2007.

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

LYND, L. R.; WEIMER, P.J.; VAN ZYL, W.H; PRETORIUS, I.S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MACHADO, D. S. **Seleção de fungos capazes de hidrolisar bagaço de cana-deaçúcar pré-tratado**. Piracicaba, 2009. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e SPA – Secretaria de Política Agrícola. **Informativo de Economia Agrícola 2014**. Disponível em:<http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/INFORMATIVO%20DE%20ECONOMIA%20Agris_%20ano%206%20vol_%201.pdf>. Acesso em: 27 out. 2016.

- MARACAJÁ, P.B.; MARQUES, F. C.; SOUZA, A. H.; PEREIRA, T. F. C.; DINIZ FILHO, E. T. Crescimento de plantas de hortelã sob doses de vermicomposto em dois tipos de solos. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. Mossoró. v. 1, n. 2, p. 10-15, 2006.
- MARTIN, C.; GONZÁLEZ, Y.; FERNÁNDEZ, T.; THOMSEN, A.B.; Investigation of cellulose convertibility and ethanolic fermentation of sugarcane bagasse pretreated by wet oxidation and steam explosion. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, p. 1669-1677, 2006.
- MELO, I. R.; ZUCCHI, T.D.; SILVA, R. E.; VILELA, E.S.D.; SÁBER, M.L.; ROSA, L.H.; PELLIZRI, V.H.; Isolation and characterization of cellulolytic bacteria from the Stain house Lake, Antarctica. **Folia Microbiologica**, v.59, p. 303-306, 2014.
- MENEZES, B. R. S.; MOREIRA, L. B.; PEREIRA, M. B.; LOPES, H. M.; COSTA, E. M.; CURTI, A. T. M. Características morfoagronômicas de dois genótipos de arroz vermelho em cultivo inundado. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. Recife, v.7, n.3, p. 394-401, 2012.
- MENDES, F. M. **Digestibilidade enzimática do bagaço de cana-de-açúcar tratado quimio-mecanicamente**. Lorena, 2010. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo.
- McMILLAN, J.D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: Himmel, M.E., Baker, J.O., Overend, R.P. Enzymatic conversion of biomass for fuels production. **American Chemical Society**, Washington, DC, p. 292–324, 1994
- NABESHIMA, H.A.; EL-DASH, A. **Modificação química da farinha de arroz como alternativa para o aproveitamento dos subprodutos do beneficiamento do arroz**. Curitiba, 2004, 13p. (Boletim do CEPPA, 13).
- KIEHL, E. J. **Manual de Compostagem: maturação e qualidade do composto**. Piracicaba, 1998.
- OCTAVE, S.; TOMAS, D. Biorefinery: Toward an industrial metabolism. **Biochimie**. n.91, p. 659-664, 2009.
- OLIVEIRA, F.J.S.; JUCÁ, J.F.T. Acúmulo de metais pesados e capacidade de impermeabilização do solo imediatamente abaixo de uma célula de um aterro de resíduos sólidos. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 9, p. 211-217, 2004.
- OLSSON, L., JORGENSEN, H., KROGH, K. B. R., ROCA, C.; Bioethanol Production from Lignocellulosic Material. **Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility**; Cap. 42, 2005.
- OGAWA, M. Red rice. **Chemistry and organisms**, v.30, n.6, p.385-388, 1992.
- OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010. Disponível em: http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol33No7_1433_22-RV09400.pdf> Acesso em: 05 dez. 2016.

PACHECO, F. **Sequenciamento, identificação e análise de genes de arroz envolvidos na interação com *Herbaspirillum seropedicae***. Curitiba, 2008. 68 f. Dissertação (Mestre em Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná.

PANTONE, D.J.; BEKER, J.B. Reciprocal yield analysis of red rice (*Oryza sativa*) competition in cultivated rice. **Weed Science**, v.39, n.1, p.42-47, 1991.

PEREIRA, J. A. O arroz-vermelho cultivado no Brasil. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2004.

PEREIRA, F. C., HICKERT, L. R., SEHNEM, N. T., CRUZ, P.B.S., ROSA, C. A., AYUB, M. A. Z. Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations, **Bioresource Technology**, v. 102, p. 4218-4225, 2011.

PIETROBON, V. C. **Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido e álcali utilizando enzimas microbianas comerciais**. Paulo, Piracicaba, 2008. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Piracicaba.

PRASAD A. S., SINGH H. C. J. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. **Bioresource Technology**, v. 3, 2007.

ROBERTO, I.C., MUSSATTO S.I., RODRIGUES R.C. Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor. **Industrial Crops and Products**, v.17, 171-176. 2003.

ROCHA, C.P. **Otimização da Produção de enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em estado sólido**. Uberlândia, 2010. 136f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Uberlândia.

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

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

SANDGREN, M.; SAHLBERG, J.; MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v.89, p. 246- 291, 2005.

SANTOS, S. F. M. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**. Natal, RN. 2007. 148f. Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

SANTOS, J. R. A.; GOUVEIA, E. R. Produção de bioetanol de bagaço de cana de açúcar. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 11, n. 1, p. 27-33, 2009.

SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SAHA B.; COTTA M. Lime pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of rice hulls to ethanol. **Biomassa and Bioenergy**, v.32, p. 971 - 977. 2008.

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

SINSABAUGH, R. L.; ANTIBUS, R. K.; LINKINS, A. E. An enzymic approach to the analysis of microbial activity during plant litter decomposition. **Agriculture, Ecosystems Environment**, v. 34, n. 1-4, p. 43-54, 1991.

SILVA, N. L. C. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose**. Rio de Janeiro, 2010. 109 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química.

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

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

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

SWEENEY, M. T.; THOMSON, M. J.; PFEIL, B. E.; MCCOUVH, S. Caught red-handed; Rc encodes a basic helix-loop-helix protein conditioning red pericarp in rice. **The Plant Cell**, v.18, p. 283-294, 2006.

SLOW FOOD BRASIL, **Fortaleza do arroz-vermelho**. 2007.

<<http://www.slowfoodbrasil.com/content/view/130/60/>> Acesso em: 24 de novembro 2016.

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

TYSON, G.W., CHAPMAN, J.; HUGENHOLTZ, P.; ALLEN, E. E.; RACHNA, A.; RICHARDSON, P. M.; SOLOVYEV, V.V.; RUBIN, E.M.; ROKHSAR, D.S.; BANFIELD, J.F. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. **Nature**, v. 428, p. 37-43, 2004.

TEATHER, R.M.; WOOD, P.J. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Appl. Environ. Microbiol.**, 43, 777-780, 1982.

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

- VAUGHAN, D. A. The wild relatives of rice: a genetic resources handbook. **International Rice Research Institute**: Manilla, p.137, 1994.
- WEI, Y.; ZHOU, H.; ZHANG, J.; ZHANG, L.; GENG, A.; LIU, F.; ZHAO, G.; WANG, S.; ZHOU, Z.; YAN, X. Insight into dominant cellulolytic bacteria from two biogas digesters and their glycoside hydrolase genes. **PLoS ONE**, v. 10, 2015.
- WOOD, T.M. The cellulase of *Fusarium solani*. Purification and specificity of the β -(1 \rightarrow 4)-glucanase and the β -D-glucosidase components. **Biochem**, v.121,p. 353–362, 1971.
- WOOD, T.M; SADDLER, J.N. Increasing the availability of cellulose in biomass materials. **Methodos in Enzymology**, v.160, p.3-11, 1998.
- WHITMAN, W.B; COLEMAN, D.C; WIEBE, W.J.; Prokaryotes: the unseen majority. **Proc. Natl. Acad. Sci**, 1998.
- WHITE, P.J.; CRAWFORD, J.W.; ÁLVAREZ, M.C.D.; MORENO, R.G. Soil Management for Sustainable Agriculture. **Applied and Environmental Soil Science**, 2013.
- ZHOU, J.; BRUNS, M.A.; TIEDJE, J.M. DNA recovery from soils of diverse composition. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 62, p.316–322, 1996.

ANEXO I

Artigo referente a dissertação publicado na revista *Molecules* com fator de impacto 2.465.

Article

A Metagenomic Advance for the Cloning and Characterization of a Cellulase from Red Rice Crop Residues

Carlos Meneses ^{1,*}, Bruna Silva ², Betsy Medeiros ³, Rodrigo Serrato ⁴
and David Johnston-Monje ⁵

¹ Department of Biology and Graduate Program in Agricultural Sciences, State University of Paraíba–UEPB, Campina Grande–PB 58429-500, Brazil

² Graduate Program in Agricultural Sciences, State University of Paraíba–UEPB, Campina Grande–PB 58429-500, Brazil; bruna-reggina@hotmail.com

³ Department of Biology, State University of Paraíba–UEPB, Campina Grande–PB 58429-500, Brazil; betsydantas@gmail.com

⁴ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Paraná–UFPR, Curitiba–PR 81.531-980, Brazil; rvserrato@ufpr.br

⁵ Indigo Agriculture, Boston, MA 02129, USA; damojomo@gmail.com

* Correspondence: chmeneses@gmail.com; Tel.: +55-83-3344-5301

Academic Editor: Derek J. McPhee

Received: 1 June 2016; Accepted: 22 June 2016; Published: 25 June 2016

Abstract: Many naturally-occurring cellulolytic microorganisms are not readily cultivable, demanding a culture-independent approach in order to study their cellulolytic genes. Metagenomics involves the isolation of DNA from environmental sources and can be used to identify enzymes with biotechnological potential from uncultured microbes. In this study, a gene encoding an endoglucanase was cloned from red rice crop residues using a metagenomic strategy. The amino acid identity between this gene and its closest published counterparts is lower than 70%. The endoglucanase was named EglARR01 and was biochemically characterized. This recombinant protein showed activity on carboxymethylcellulose, indicating that EglARR01 is an endoactive lytic enzyme. The enzymatic activity was optimal at a pH of 6.8 and at a temperature of 30 °C. Ethanol production from this recombinant enzyme was also analyzed on EglARR01 crop residues, and resulted in conversion of cellulose from red rice into simple sugars which were further fermented by *Saccharomyces cerevisiae* to produce ethanol after seven days. Ethanol yield in this study was approximately 8 g/L. The gene found herein shows strong potential for use in ethanol production from cellulosic biomass (second generation ethanol).

Keywords: plant compost; functional metagenomics; endoglucanase

1. Introduction

As plant biomass is naturally recycled by microbes in the environment, a diverse spectrum of cellulolytic enzymes must exist with the ability to metabolize cellulose. Cellulose-degrading microbes produce endoglucanases [1], which are able to randomly cleave internal sites on crystalline surfaces of cellulose, generating new ends to the molecular chain. Cellobiohydrolases are then able to act in a progressive manner at the reducing end of the cellulose chain to release cellobiose as the main degradation product of cellulose.

Glycosyl hydrolases are classified into different families, based on the similarity of their protein sequences [2]. Cellulases and hemicellulases are known to be excellent biocatalysts and have a wide spectrum of industrial applications [3–5].

The biofuel industry is constantly searching for renewable alternatives to fossil fuels. Since there is so much cellulose in the world, development of an efficient means to break down this polymer into its constitutive sugars would allow production of very large amounts of ethanol using traditional fermentation based on the activity of yeasts. More specifically, cellulose must first be hydrolyzed by cellulases into cellobiose, which can then be converted by β -glucosidase to glucose, which can then feed into alcoholic fermentation. Extensive investigations have been carried out to find novel cellulases that can be applied to cellulosic biomass as a pretreatment to traditional fermentation; these studies usually focus on isolating, screening, and sequencing of genes from different organisms. Wastes from red rice agriculture and processing are one of the most abundant forms of cellulosic biomass in the northeast of Brazil, presenting an attractive target for production of cellulosic ethanol if a process for cellulose pretreatment could be developed. To find cellulosic enzymes capable of metabolizing the cellulose in red rice wastes, we proposed to isolate and characterize cellulases from organisms that are naturally able to convert red rice waste into glucose.

While metagenomic approaches have been used extensively to study extreme environments [6,7], less extreme environments that are favorable to life show a greater genetic diversity of microorganisms and are more likely to contain cellulase genes than environments where plant growth is rare or absent [6–9].

Bacteria and fungi are the main sources of cellulases for biotechnology [1], however, because the majority of the Earth's microorganisms are not yet cultivable using traditional techniques [10], isolating genes from uncultured microorganisms is an attractive target for functional metagenomics [11]. This approach has already been used to clone and characterize cellulases [2]; however, there is still a large, untapped diversity of microbial cellulases in the many environments and species which have not been studied.

In this study, we apply functional metagenomics to discover a gene encoding a cellulolytic enzyme from composted red rice wastes. The process began with DNA extraction from composted red rice waste, the construction of a metagenomic library and the selection of clones capable of degrading carboxymethylcellulose (CMC) on agar plates. We identified an endoglucanase, EglARR01, which has similarity to other cellulases from uncultivated bacteria. This enzyme was shown to be stable over a range of temperatures and pHs, and represents a significant advancement for the biotechnological degradation of cellulose for ethanol production.

2. Results

2.1. Construction and Screening of Metagenomic Libraries

A cosmid library of 10,000 clones was built using DNA isolated from a compost heap of red rice agricultural wastes; this library was called EglARR. Restriction analysis with the *Bam*HI enzyme of 50 randomly chosen clones showed that all cosmids contained DNA fragments with sizes from 15 to 60 kb. The average size of the inserted DNA library was approximately 40 kb. A clone with a carboxymethylcellulose-degrading phenotype (CMCase) was isolated after all EglARR library clones were examined (Figure 1). This gene was named Endoglucanase 1 (EglARR01) (deposited as KT779431).

2.2. Sequence Analyses of Cloned Cellulase Genes

The complete DNA sequence of the insert containing EglARR01 was determined as 1278 bp. An alignment analysis by BLAST revealed the presence of an open reading frame (ORF) of 1080 bp, in the insert encoding a full-length gene for an endoglucanase (EglARR01). The EglARR01 gene was submitted to GenBank (KT779431) and encodes a predicted protein of 359 amino acids with a molecular mass of 40.1 kDa. The deduced amino acid chain of EglARR01 was used for a BLAST against the NCBI and SwissProt databases. This search revealed that EglARR01 belongs to the glycosyl hydrolase family 8 and that its amino acid identity is 69% with respect to an endoglucanase from an uncultured species of *Enterobacter* and 61% to the endo-1,4- β -glucanase of endonuclease III from *Klebsiella oxytoca*.

A phylogenetic tree built from the amino acid sequences was constructed to verify the evolutionary relationship of the EglARR01 to 13 known endoglucanases, including seven from *Klebsiella*. EglARR01 is not closely related to any other members of the endoglucanase family, which suggests that EglARR01 is a new type of endoglucanase (Figure 2).

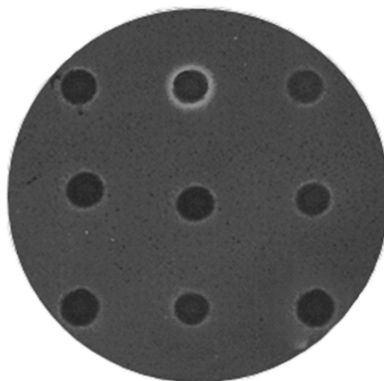


Figure 1. Cloning of a novel endoglucanase gene from red rice compost using a functional metagenomics approach. The CMC plate assay relies on the binding of Congo Red to cellulose [13].

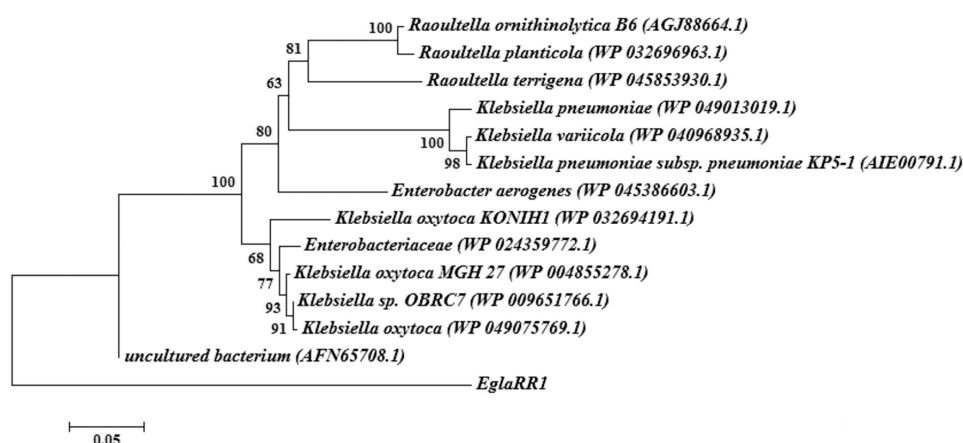


Figure 2. Classification of EglARR01 by nucleotide and amino acid sequence analyses. Amino acid sequences of endoglucanases, including EglARR01, were compared and analyzed phylogenetically using a neighbor-joining method. GenBank accession numbers are in parentheses. Phylogenetic analysis showed that EglARR01 is closely related to cellulases from an uncultured species of *Enterobacter*.

2.3. Expression and Purification of the Recombinant EglARR01

In order to confirm the cellulolytic properties of EglARR01, the recombinant protein was purified and in vitro tests were conducted using CMC zymograms to observe CMCase activity. The purified recombinant EglARR01 protein (1 μ g) was clearly active (Figure 3). Native-PAGE and SDS-PAGE gels were used for the qualitative characterization of cellulase activity. For Native-PAGE, the zymogram (0.1% CMC in the gel) showed a translucent yellow zone, indicating cellulolytic activity. For SDS-PAGE analysis, the enzyme approximate molecular weight was estimated to be 40.1 kDa.

The high specific activity of EglARR01 on CMC and β -D-glucan (barley), and its limited activity on Avicel, cellobiose, and filter paper are consistent with the results found in the CMC zymogram, and with the phylogenetic analysis, which suggests that the recombinant protein is an endoglucanase. Interestingly EglARR01 also showed highly specific activity against β -D-glucan (β -1 \rightarrow 4 linked), like many endoglucanases that target the β -1 \rightarrow 4 bond in CMC. However, EglARR01 showed low laminarinase activity, not breaking β -1 \rightarrow 3/1 \rightarrow 6 linkages of laminarin as shown on Table 1.

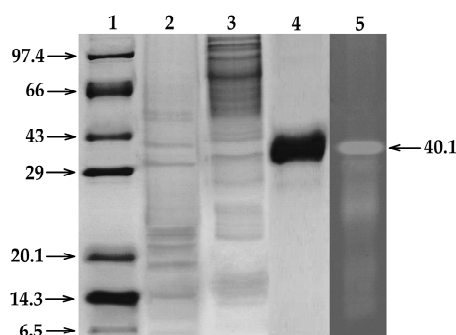


Figure 3. The recombinant EglARR01 enzyme (0.1 μ g) showed an active band at 40.1 kDa in the CMC zymogram. The three additional bands that appeared below 40.1 kDa in the CMC zymogram were probably caused by the action of partially degraded EglARR01. 1: Molecular weight marker (kDa); 2: spin column portion of partly purified endoglucanase; 3: ammonium sulfate (40%–60%) fraction; 4: purified endoglucanase; and 5: purified endoglucanase showing yellow opaque region in native gel.

Table 1. Substrate specificity of EglARR01.

Substrate	Specific Activity (U/mg)
β -D-glucan (Barley)	1487.9
CMC	1002.5
Avicel	0
Cellulose fiber	5.8
Cellobiose	0
Xylan-birchwood	500.4
Lichenan	433.9
Laminarin	6.5
Filter paper	2.9

EglARR01 shows highly specific activity towards CMC, but limited activity towards Avicel, filter paper and Cellobiose. Surprisingly, EglARR01 demonstrated highly specific activities toward natural substrates, such as β -D-glucan and lichenan (containing β -1 \rightarrow 4/1 \rightarrow 3 linkages), compared to that against artificial CMC (β -1 \rightarrow 4 linkage). Given that laminarinase activity (β -1 \rightarrow 3/1 \rightarrow 6 cleavage) of EglARR01 was low, the difference in activity towards multiple substrates is not due to β -1 \rightarrow 3 cleavage potential. One unit is defined as the equivalent of 1 μ mol of glucose produced per minute.

2.4. Temperature and pH Influence on the Activity of EglARR01

The EglARR01 enzyme showed some activity at various temperatures between 25 and 70 °C, but had optimum activity when it was incubated at 60 °C (Figure 4a). Temperatures over 60 °C caused the enzyme to quickly lose its activity. When incubated for 1 h at different temperatures, EglARR01 retained close to 90% of its activity, except at 30 °C when activity was drastically diminished over time (Figure 4b). Enzymatic properties of EglARR01 at these lower temperatures were similar to the properties of other endoglucanases [14,15]. Cold-active enzymes are appealing due to their values in biotechnological applications. They are also useful tools for folding studies of proteins because of their high activity and stability at low temperatures [16]. Compost heaps are known to reach up to 70 °C, thus the optimum functioning temperature for EglARR01 seems to be consistent with the environment from which it was isolated.

The purified EglARR01 enzyme was active at different pH ranges from 6.0 to 8.0. The optimal pH of the enzyme was 6.0, where it reached a maximum enzymatic activity in both acetate and phosphate buffers (Figure 5a). The enzymatic activity remained elevated when the pH was between 5.0 and 8.0. However, EglARR01 activity was completely lost when the pH was reduced to 4.0. After 16 h incubation at 4 °C EglARR01 still retained its activity at pH 4.0–8.0 (see Figure 5b). The pH range of the protein was comparable with that of alkaline cellulases reported elsewhere [17].

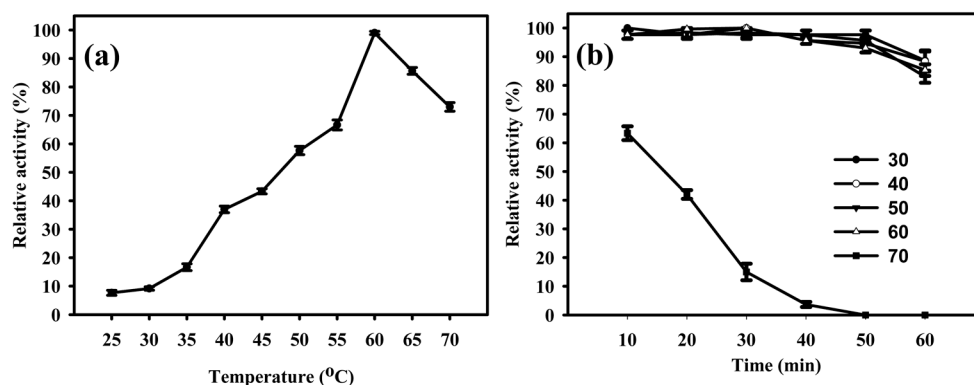


Figure 4. Effect of temperature on the activity and stability of EglARR01. (a) Optimal temperature for EglARR01 is 60 °C, as determined by measuring its enzymatic activity with 1% (*w/v*) CMC in 50 mM sodium acetate buffer, pH 5, at 25 to 70 °C in five degree increments; and (b) thermostability was determined by measuring the enzymatic activity of EglARR01 after incubation at 30 to 70 °C in 10 degree increments for 60 min.

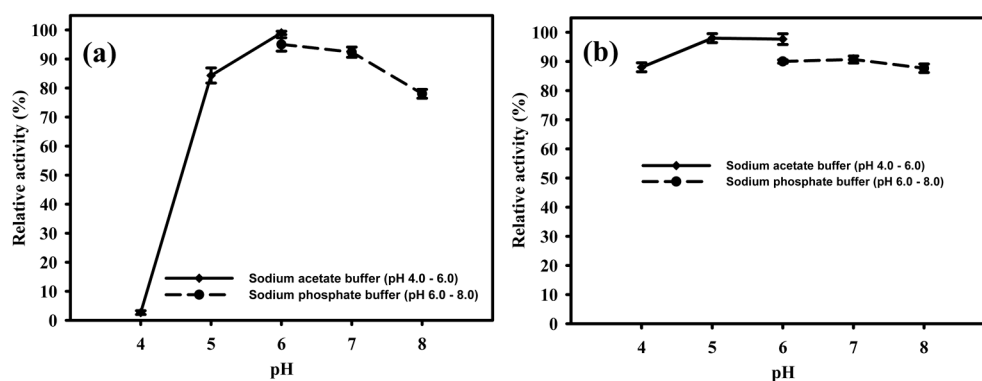


Figure 5. Effect of pH on the activity and stability of EglARR01. (a) The optimal pH for EglARR01 was determined by measuring the enzyme activity on 1% (*w/v*) CMC in 50 mM buffers at 65 °C with various pH values. The buffers used to establish the optimum pH and to assess pH stability were as follows: sodium acetate buffer (pH 4–6, \blacklozenge), and sodium phosphate buffer (pH 6–8, \bullet); and (b) to determine the pH stability of EglARR01, the enzyme was incubated for 16 h at 4 °C in buffers of different pH values. The residual enzyme activity was measured under standard assay procedures. All measurements were carried out in triplicate.

2.5. Production of Bioethanol from Red Rice Compost

The enzymatic extract of EglARR01 was tested for its ability to degrade crop residues of red rice. Reducing sugars were detected at a concentration of 24 mg/g after enzymatic treatment of red rice crop residues, showing that this enzyme is able to convert cellulose containing agricultural wastes into glucose. The enzymatic pretreated red rice compost was then used as the sole carbon source to ferment with *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 for seven days, which yielded 9.2 g/L of ethanol.

3. Discussion

Exploration of “metagenomes” for new enzymatic activities has been successful in a number of studies, which unequivocally demonstrate the potential of searching diverse environments for proteins with biotechnological potential [18]. In this work, a metagenomic library was built successfully using DNA extracted from crop residues of red rice, and functional screening allowed discovery of a novel cellulytic enzyme. We cloned and identified the novel endoglucanase, EglARR01, which is closely related to the GH8 family of glycosyl hydrolases. Glycosyl hydrolases from family 8 (formerly known

as D family cellulases) commonly break β -1 \rightarrow 4 glycosidic linkages, being one of the first families to have its hydrophobic clusters characterized [19]. EglARR01 showed an activity of 178 U/mg, which is approximately 72% higher than the GH8 family endoglucanase supplied by Megazyme (derived from *Aspergillus niger*, which has an activity of 86 U/mg [20]), and is stable on a wide range of pH and temperature. EglARR01 shows much potential towards the efficient production of biofuels from lignocellulosic biomass.

The metagenomic approach employed in this study could also be employed for the isolation of endoglucanases (EC 3.2.1.4), which can release glucose from the ends of cellulose chains. The EglARR01 library was cloned and hosted in *Escherichia coli*, which allowed functional characterization of transgenically-expressed enzymes and of the purified protein extracts. The molecular mass of an endoglucanase can vary over a wide size range. The smallest size of a reported endoglucanase is 6.3 kDa from *Cytophaga* [21], while other studied cellulases can reach up to 400 kDa as found on *Fusarium solani* [22]. The EglARR01 protein purified in this study was about 40.1 kDa in mass, consistent with the size of proteins found in this group, which range from 35.9 to 659 kDa [23].

EglARR01 was active over a wide pH range, maintaining 80% of its optimum activity at pH 8.0 and was stable between pH 4.0 to 8.0. The substrate degradation analysis indicated that EglARR01 hydrolyzes β -(1 \rightarrow 4) linkages more easily than β -(1 \rightarrow 3) linkages. EglARR01 showed activity against a wide variety of linear β -glucan derived from barley, but had a modest activity against mixed binding β -glucans derived from laminarin (6.5%). Microcrystalline cellulose derived from Avicel and filter paper were not degraded by EglARR01 activity, whereas these substrates are promptly hydrolyzed by the action of other cellulases [24]. The high specificity of EglARR01 to a given substrate is consistent with previous reports of cellulases belonging to that family [25].

The major restrictions of functional screening of metagenomic libraries is the need for a host to promote heterologous expression. The inability to recognize regulatory elements and the presence of different codon biases are some of the difficulties that limit success of functional metagenomics. Wang et al. [26] evaluated the overall phylogenetic distribution of CAZyme genes (carbohydrate-active enzymes) in rice straw compost enriched with manure, and found a microbial community involved in the process of lignocellulose decomposition. The CAZyme genes found were from Actinobacteria (46.1%), Proteobacteria (16.7%), Firmicutes (14.2%), Chloroflexi (7.7%), and Bacteroides (6.1%). Although the codons from the Shine-Dalgarno promoting regions of actinobacteria differ from those of *E. coli*, thus diminishing the probability of heterologous expression, the gene we have found in the culture remains of red rice that showed to be expressed in *E. coli*. We were one order of degree more efficient and only had to screen 10,000 clones to find one target gene. Our relatively high success rate could be, in part, explained by the wealth of cellulase gene diversity or the large Gram-negative bacterial population in red rice crop residues.

To facilitate the identification of cellulolytic activity in Petri dishes, a bacteriophage lambda expression system was used, facilitating the release of the cellulases expressed after lysis of *E. coli* host cells. Indeed, further efforts to purify cloned cellulases heterologously expressed in *E. coli* were successful despite residual cellulase activity that was detected in cellular extracts by more sensitive colorimetric assays.

The presented results suggest that, combined with other screening strategies including sequence-driven screening and high-throughput sequencing, functional mining of metagenomic libraries will not only capture new enzymes, but also provide insights into enzymatic hierarchy structure, as well as catalytic mechanisms in specific environmental niches.

The production of ethyl alcohol derived from lignocellulosic biomass comprises four processes: pre-treatment, enzymatic saccharification, fermentation, and ethyl recovery. The lignocellulosic residues have been examined by several studies involving microorganisms and enzymatic bioconversion with commercial cellulase [27–31]. Pre-treated plant cell wall polysaccharides are more susceptible to enzymatic hydrolysis, being broken into monomeric sugars which can then be fermented into

ethanol [32]. We hope the enzyme we report discovering in this study contributes to the development of commercially viable cellulosic ethanol production.

4. Materials and Methods

4.1. Extraction and Purification of DNA from Environmental Samples

Crop residues of red rice (leaves, stems, spikelets, and straw in the proportion of 15:10:6:5 (wt %)) were collected and placed in composting cells at the State University of Paraíba, Campina Grande, Brazil, where they were incubated at temperatures ranging from 55 to 70 °C and at humidity ranging from 80% to 90%. For the extraction of DNA from these materials, we used a direct lysis method [33] with minor modifications.

Briefly, 1 g of plant sample was homogenized by vortexing in 2.6 mL of extraction buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 100 mM sodium EDTA, pH 8.0; 100 mM sodium phosphate, pH 8.0; 1.5 M NaCl, 1% hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB)). Three freeze-thaw cycles were performed on the samples in liquid nitrogen and at 65 °C in a water bath. After adding 50 µL of proteinase K (20 mg/mL), samples were incubated at 37 °C for 30 min with continuous shaking at 120 rpm. Subsequently, 300 µL of 20% SDS (*w/v*) was added and the mixture incubated at 65 °C for 2 h with gentle shaking every 15–20 min. Supernatants were collected from the samples after centrifugation at 4000 × *g* for 10 min and the resulting pellets were subjected to re-extraction in 2 mL of extraction buffer at 65 °C for 10 min. The combined supernatants were then mixed with 1/10 volume of 10% CTAB (*w/v*) [34] and centrifuged again. The resulting supernatant solutions were extracted with isoamyllic chloroform–alcohol (24:1 *v/v*) and the DNA precipitated with isopropanol, washed with 70% (*v/v*) ethanol, dried, and resuspended in 100 of 10 mM Tris HCl, pH 8.5. For DNA purification, the crude DNA extracts were purified by size exclusion chromatography columns CHROMA SPIN + TE-1000 (BD Biosciences Clontech, Heidelberg, Baden-Württemberg, Germany), equilibrated in 10 mM Tris-HCl, pH 8.5, according to the manufacturer's recommendations.

4.2. Construction of Metagenomic DNA Library and Screening

A metagenomic library was constructed using the pWEB::TNC Cosmid Cloning Kit (Epicentre, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. The purified DNA had its ends repaired with T4 DNA polymerase and T4 polynucleotide kinase to generate blunt ends. DNA with repaired ends were separated on agarose gel. The DNA fragments between 40 and 50 kb were recovered from the gel and ligated to a vector cosmid pWEB::TNC which was linearized at the unique site *Sma*I and dephosphorylated. The ligated products were transformed into *E. coli* EPI100 cells infected. The library colonies were screened for endo-1.4-β-glucanase (carboxymethylcellulase) activity according to protocols described by Teather and Wood [13]. The clone that tested positive for endo-1.4-β-glucanase activity (EglaRRN01) was sequenced.

4.3. Sequence and Phylogenetic Analyses

Potential open reading frames in the cloned sequence were identified using ORF finder at the National Center for Biotechnology Information (NCBI). Sequences closely related to candidate cellulases were recognized with the BLASTP and BLASTN algorithms in NCBI. For phylogenetic analysis sequences of the cloned cellulase, its highest Genbank matches, and some sequences of representative cellulases from different families of glycosyl hydrolases were selected. The phylogenetic tree was generated with ClustalW 1.81 (Heidelberg, Baden-Württemberg, Germany) and MEGA 6.0 (Tempe, AZ, USA) using the neighbor-joining technique.

4.4. Expression and Purification of a Recombinant Endoglucanase

Having identified EglaRRN01 as a cellulase, we intended to subclone it using PCR, while excluding the N-terminal signal peptide. This gene was amplified by polymerase chain reaction

(PCR) using pEglaRRN01 as template and the following primers: sense primer 5'-ATAGCATGCCC GCTCGTGCGAAGATCC-3' (containing the *SphI* site at the end 50) and an antisense primer 5'-ATAGTCGACCATGTCCCGCAATGCCGC-3' (containing a *SalI* site at the end 50). The amplified DNA was digested with *SalI* and *SphI* (Promega, Madison, WI, USA) before ligation to the pQE31 vector digested with the same enzymes (Qiagen, Valencia, CA, USA) resulting in plasmid pEglaRR01. The recombinant plasmid pEglaRR01 was then used to transform *E. coli* M15 (Qiagen). His-tagged EglaRR01 was expressed and purified using nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) agarose resin (Qiagen) according to the manufacturer's instructions.

4.5. Endoglucanase Activity Assay

The enzyme's ability to degrade CMC was determined by measuring the concentration of reducing sugars using the dinitrosalicylic acid method (DNS) [35]. The reaction mixture contained 0.5 mL of 1% CMC (*w/v*) in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, and 0.5 mL of enzyme solution, and was incubated at 65 °C for 20 min. The amount of reducing sugars produced was determined after the incubation. One enzymatic unit corresponds to the equivalent of 1 µmol of glucose produced per minute. Protein concentrations were determined by the Bradford method [36] using an assay kit for the quantification of protein (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A standard curve of protein concentration was created using known concentrations of bovine serum albumin.

4.6. CMC-Zymogram Analysis

Sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) [37] was performed with some modifications to detect cellulase and β-glucosidase activity using zymogram [38,39]. For the CMC zymogram, an SDS-PAGE 12% gel was prepared containing 0.1% carboxymethylcellulose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The enzyme extracts were put into half of the gel at a concentration of 40 µg protein per line. This pattern was repeated to entrain the other half of the gel so that it could be cut vertically in half after electrophoresis to produce two identical acrylamide gels. The first half of the gel was stained with colloidal blue stain for visualization of proteins. The second half was used for zymogram analysis. For zymogram analysis, the gel was washed in sodium citrate buffer (50 mmol/L, pH 5.5) containing 1% Triton X-100 for 1 h at room temperature to remove SDS [38]. This was followed by incubation for 1.5 h in sodium citrate buffer (50 mmol/L, pH 5.5) to allow for enzymatic activity to the substrate. Then, the gel was stained with Congo Red (Sigma-Aldrich) at 0.1% for 30 min and destained in 1 mol/L NaCl to reveal the lightening zones. The gel was imaged under ultraviolet light and aligned with colloidal blue stained gels.

4.7. Biochemical Characterization of Endoglucanase EglaRR01

The optimum temperature for EglaRR01 activity was determined by measuring the activity of a control endoglucanase on CMC 1% (*w/v*) (in 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.0) from 25 to 70 °C with differences in five degree increments. The thermal stability was examined by incubating the enzyme at 25 to 60 °C in increments of 10 degrees for 60 min. The residual enzyme activity was, again, checked using 1% (*w/v*) CMC in 50 mM sodium acetate buffer, pH 6.0, at 65 °C [40].

The optimum pH for enzymatic activity of EglaRR01 was also determined by measuring its enzyme activity in CMC 1% (*w/v*) in 50 mM buffer at pH values ranging from 4.0 to 8.0, at 65 °C. Sodium acetate buffer was used at a pH between 4.0 and 6.0. Sodium phosphate buffer was used for pH ranges between 6.0 and 8.0. To determine the pH stability of the enzyme, the extract containing the enzyme was incubated at different pHs as mentioned above, followed by storage at 4 °C for 16 h. The residual enzyme activity was measured under standard assay procedure (1% CMC in 50 mM sodium acetate buffer, pH 6.0, at 65 °C) [40].

To investigate the substrate specificity, enzymatic activities were tested under optimal conditions for 20 min with 1% (*w/v*) of the following polysaccharide substrates: Avicel (Fluka, Sigma-Aldrich), CMC (Sigma-Aldrich), cellobiose (Sigma-Aldrich), cellulose fiber (Sigma-Aldrich), β-D-glucan (Barley,

Sigma-Aldrich), filter paper (Whatman No. 1, Maidstone, Kent, UK), laminarin (Sigma-Aldrich), lichenan (Sigma-Aldrich) and xylan-brichwood (Sigma-Aldrich). 4-Nitrophenyl β -D-cellobioside (pNPC) (Sigma-Aldrich), the final concentration was 1 mM [40].

4.8. Saccharification of Red Rice Residues by Endoglucanase EglARR01

The enzymatic extract EglARR01 was tested for its ability to degrade red rice residues. The residues were ground and separated on 40 mesh sieves. The enzyme activity in degrading red rice remains was determined by measuring the concentration of reducing sugars using the dinitrosalicylic acid method (DNS) [35]. Briefly, the reaction mixture that contained 0.5 mL of red rice residues 1% (*w/v*) in 50 mM sodium acetate buffer, pH 7.0, and 0.5 mL of enzyme solution, was incubated at 60 °C for 20 min. Subsequently, the amount of reducing sugars produced were determined. One enzymatic unit corresponds to the equivalent of 1 μ mol of glucose produced per min. Protein concentrations were determined using the Bradford method [36] using an assay kit for the quantification of protein from Bio-Rad. A standard curve of protein concentration was created using known concentrations of bovine serum albumin (Sigma-Aldrich).

4.9. Bioconversion of Rice Straw Residues into Bioethanol Using Endoglucanase EglARR01

4.9.1. Enzymatic Saccharification

One gram of red rice residue was pre-treated with 0.5 U/g of purified enzyme extract in 50 mM sodium acetate buffer, and then the mixture was packed in 100 mL Erlenmeyer flasks with a magnetic stir bar. The final volume was adjusted to 50 mL using 50 mM sodium acetate buffer. The Erlenmeyer flasks were incubated at 60 °C for 12 h with stirring. After incubation, the reaction was completed by adding 3 mL of DNS 1% for each 1 mL of the reaction mixture, which was subsequently heated for 10 min. The amount of reducing sugars in the reaction was measured as described above.

4.9.2. Detoxification

The pre-treated samples, and purified enzyme extract were mixed with activated charcoal (20:1 *w/w*) and then stirred for 2 days at ambient temperature with a magnetic stirrer. The samples were filtered through filter paper No. 5 (Whatman), after treatment with charcoal [31]. The filtrate was subjected to measurement of reducing sugars as described above.

4.9.3. Fermentation

The ethanol fermentation was conducted with the yeast *S. cerevisiae* BY4742 grown in YEPD medium. A loopful of yeast was inoculated and incubated into a liquid fermentation broth at 30 °C at 200 rpm for 24 h. The count of yeast in the fermentation sample was 9×10^7 CFU/mL.

The medium used in the fermentation for ethanol production was composed of: glucose (from the sugar solution obtained from the saccharified crop residues of red rice), KH_2PO_4 0.1%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%; and yeast extract 0.1%, wherein the pH of the medium was adjusted to pH 5.0. The medium was introduced into Erlenmeyer flasks of 250 mL containing 100 mL of the fermented solution. The pH of the medium adjusted to 5.0 and then inoculated with 10% saccharified solution from the pre-treated sample of red rice residues. All repetitions were incubated at 30 °C at 200 rpm agitation for seven days. The ethanol content was measured seven days after the fermentation process began [28,41].

4.9.4. Ethanol Estimation

One mL of the fermented filtrate was introduced into the distillation flask of 500 mL of capacity containing 30 mL of distilled water. Distilled samples were collected in a 50 mL flask containing 25 mL of a potassium dichromate solution (33.76 g $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ dissolved in 400 mL distilled water with 325 mL

of sulfuric acid in the final volume of 1 L). About 20 mL of sample was collected and kept in a water bath at 62.5 °C for 20 min.

The flasks were cooled to room temperature and the volume was topped up to 50 mL. Five mL of this solution was diluted with 5 mL of distilled water to measure the optical density of the solution at 600 nm using a spectrophotometer [42]. A standard curve was performed under the same conditions using standard ethanol solution containing 2% to 14% (*v/v*) ethanol in distilled water and then the ethanol content of each sample was estimated [31].

5. Conclusions

In conclusion, an enzyme belonging to family 8 of glycosyl hydrolases was isolated successfully using a functional approach to screen a metagenomic library built from DNA isolated from red rice crop residues. The screen involved looking for cellulolytic activity in a heterologous expression in *E. coli*. EglARR01, and subsequent purification and characterization of the recombinant protein. The enzyme exhibited thermal stability and efficiency in a wide pH range, with a significant degradation speed for a variety of beta-glucans: β -(1→4) and β -(1→3/1→4). These characteristics make EglARR01 a strong candidate suitable for future industrial use.

Acknowledgments: This work was supported by the project UNIVERSAL—National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq) no. 483547/2013-1. Bruna Silva and Betsy Medeiros thank Coordination of development of senior staff (CAPES) and CNPq for the fellowships.

Author Contributions: C.M., B.S. and B.M. conceived and designed the experiments; C.M., B.S. and B.M. performed the experiments; C.M., and R.S. analyzed the data; C.M., R.S. and D.J.-M. contributed reagents/materials/analysis tools; C.M., R.S. and D.J.-M. wrote the paper.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

CMC	carboxymethylcellulose
pNPC	4-nitrophenyl- β -D-cellobioside
CBM	carbohydrate binding motif
Ni-NTA	nickel-nitrilotriacetic acid
DNS	dinitrosalicylic acid
CFU	colony-forming unit

References

1. Lynd, L.R.; Weimer, P.J.; van Zyl, W.H.; Pretorius, I.S. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2002**, *66*, 506–577. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Henrissat, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. *Biochem. J.* **1991**, *280*, 309–316. [[PubMed](#)]
3. Collins, T.; Gerday, C.; Feller, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* **2005**, *29*, 3–23. [[PubMed](#)]
4. Lynd, L.R.; van Zyl, W.H.; McBride, J.E.; Laser, M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: An update. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 577–583. [[PubMed](#)]
5. Steele, H.L.; Jaeger, K.E.; Daniel, R.; Streit, W.R. Advances in recovery of novel biocatalysts from metagenomes. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *16*, 25–37. [[PubMed](#)]
6. Rees, H.C.; Grant, S.; Jones, B.; Grant, W.D.; Heaphy, S. Detecting cellulase and esterase enzyme activities encoded by novel genes present in environmental DNA libraries. *Extremophiles* **2003**, *7*, 415–421. [[PubMed](#)]
7. Grant, S.; Sorokin, D.Y.; Grant, W.D.; Jones, B.E.; Heaphy, S. A phylogenetic analysis of Wadi el Natrun soda lake cellulase enrichment cultures and identification of cellulase genes from these cultures. *Extremophiles* **2004**, *8*, 421–429. [[PubMed](#)]
8. Voget, S.; Steele, H.L.; Streit, W.R. Characterization of a metagenome-derived halotolerant cellulase. *J. Biotechnol.* **2006**, *126*, 26–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

9. Warnecke, F.; Luginbühl, P.; Ivanova, N.; Ghassemian, M.; Richardson, T.H.; Stege, J.T.; Cayouette, M.; McHardy, A.C.; Djordjevic, G.; Aboushadi, N.; et al. Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. *Nature* **2007**, *405*, 560–565. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Rappe, M.S.; Giovannoni, S.J. The uncultured microbial majority. *Annu. Rev. Microbiol.* **2003**, *57*, 369–394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Daniel, R. The soil metagenome—A rich resource for the discovery of novel natural products. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, *15*, 199–204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Voget, S.; Leggewie, C.; Uesbeck, A.; Raasch, C.; Jaeger, K.E.; Streit, W.R. Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 6235–6242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Teather, R.M.; Wood, P.J. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* **1982**, *43*, 777–780. [[PubMed](#)]
14. Zeng, R.; Xiong, P.; Wen, J. Characterization and gene cloning of a cold-active cellulase from a deep-sea psychrotrophic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. DY3. *Extremophiles* **2006**, *10*, 79–82. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Schröder, C.; Blank, S.; Antranikian, G. First glycoside hydrolase family 2 enzymes from *Thermus antranikianii* and *Thermus brockianus* with β -glucosidase activity. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2015**, *3*, 1–10.
16. Blank, S.; Schröder, C.; Schirmmayer, G.; Reisinger, C.; Antranikian, G. Biochemical characterization of a recombinant xylanase from *Thermus brockianus*, suitable for biofuel production. *JSM Biotechnol. Biomed. Eng.* **2014**, *2*, 1–10.
17. Zhang, J.; Shi, H.; Xu, L.; Zhu, X.; Li, X. Site-directed Mutagenesis of a hyperthermophilic endoglucanase Cel12B from *Thermotoga maritime* based on rational design. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0133824.
18. Lambertz, C.; Garvey, M.; Klinger, J.; Heesel, D.; Klose, H.; Fischer, R.; Commandeur, U. Challenges and advances in the heterologous expression of cellulolytic enzymes: A review *Biotechnol. Biofuels* **2014**, *7*, 1–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Wei, Y.; Zhou, H.; Zhang, J.; Zhang, L.; Geng, A.; Liu, F.; Zhao, G.; Wang, S.; Zhou, Z.; Yan, X. Insight into dominant cellulolytic bacteria from two biogas digesters and their glycoside hydrolase genes. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0133824. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Zhang, Y.H.P.; Lynd, L.R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, *88*, 797–824. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Chang, W.T.; Thayer, D.W. The cellulase system of a *Cytophaga* species. *Can. J. Microbiol.* **1977**, *23*, 1285–1292. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Wood, T.M. The cellulase of *Fusarium solani*. Purification and specificity of the β -(1→4)-glucanase and the β -D-glucosidase components. *Biochem. J.* **1971**, *121*, 353–362. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Baba, Y.; Sumitani, J.; Tani, S.; Kawaguchi, T. Characterization of *Aspergillus aculeatus* β -glucosidase 1 accelerating cellulose hydrolysis with *Trichoderma* cellulase system. *Appl. Ind. Microbiol. Express* **2015**, *5*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Béra-Maillet, C.; Arthaud, L.; Abad, P.; Rosso, M.N. Biochemical characterization of MI-ENG1 a family 5 endoglucanase secreted by the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 3255–3263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Gong, X.; Gruninger, R.J.; Qi, M.; Paterson, L.; Forster, R.J.; Teather, R.M.; McAllister, T.A. Cloning and identification of novel hydrolase genes from a dairy cow rumen metagenomic library and characterization of a cellulase gene. *BMC Res. Notes* **2012**, *5*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Wang, C.; Dong, D.; Wang, H.; Müller, K.; Qin, Y.; Wang, H.; Wu, W. Metagenomic analysis of microbial consortia enriched from compost: New insights into the role of Actinobacteria in lignocellulose decomposition. *Biotechnol. Biofuels* **2016**, *9*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Li, A.; Antizar-Ladislao, B.; Khraisheh, M. Bioconversion of municipal solid waste to glucose for bio-ethanol production. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2007**, *30*, 189–196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Patel, S.J.; Onkarapp, A.R.; Shobha, K.S. Comparative study of ethanol production from microbial pretreated agricultural residues. *J. Appl. Sci. Environ. Manag.* **2007**, *11*, 137–141.
29. Kovacs, K.; Marcelli, S.; Szakacs, G.; Zacchi, G. Enzymatic hydrolysis of steam-pretreated lignocellulosic materials with *Trichoderma atroviride* enzymes produced in-house. *Biotechnol. Biofuels* **2009**, *2*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Rabelo, S.C.; Filho, R.M.; Costa, A.C. Lime pretreatment of sugarcane bagasse for bioethanol production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2009**, *53*, 139–150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

31. Yoswathana, N.; Phuriphat, P. Bioethanol, production from rice straw. *Energy Res. J.* **2010**, *1*, 26–31. [[CrossRef](#)]
32. Lynd, L.R.; Wyman, C.E.; Gerngross, T.U. Biocommodity engineering. *Biotechnol. Prog.* **1999**, *15*, 777–793. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Zhou, J.; Bruns, M.A.; Tiedje, J.M. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 316–322. [[PubMed](#)]
34. Murray, M.G.; Thompson, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* **1980**, *8*, 4321–4325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **1959**, *31*, 426–428. [[CrossRef](#)]
36. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254. [[CrossRef](#)]
37. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Her, S.; Lee, H.S.; Choi, S.J.; Choi, S.W.; Choi, H.J.; Yoon, S.S.; Oh, D.H. Cloning and sequencing of β -1,4-endoglucanase gene (celA) from *Pseudomonas* sp. YD-15. *Lett. Appl. Microbiol.* **1999**, *29*, 389–395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Chavez, R.; Schachter, K.; Navarro, C.; Peirano, A.; Aguirre, C.; Bull, P.; Eyzaguirre, J. Differences in expression of two endoxylanase genes (xynA and xynB) from *Penicillium purpurogenum*. *Gene* **2002**, *293*, 161–168. [[CrossRef](#)]
40. Yeh, Y.F.; Chang, S.C.; Kuo, H.W.; Tong, C.G.; Yu, S.M.; Ho, T.H. A metagenomic approach for the identification and cloning of an endoglucanase from rice straw compost. *Gene* **2013**, *519*, 360–366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Sandhu, H.; Bajaj, K.L.; Arneja, J.S. Biochemical studies on bioconversion of rice straw to ethanol. *Ind. J. Ecol.* **1998**, *25*, 62–65.
42. Caputi, A.J.; Ueda, M.; Brown, T. Spectrophotometric determination of ethanol in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **1968**, *19*, 160–165.

Sample Availability: Samples of the purified EglRR01 cellulase are available from the authors.



© 2016 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).