

**IDENTIFICAÇÃO DE UMA NOVA FITASE BACTERIANA ATRAVÉS DE  
PROSPECÇÃO METAGENÔMICA**

**NATHÁLYA CARVALHO FARIAS**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA**

**CAMPINA GRANDE – PB**

**FEVEREIRO DE 2018**

# **IDENTIFICAÇÃO DE UMA NOVA FITASE BACTERIANA ATRAVÉS DE PROSPECÇÃO METAGENÔMICA**

**NATHÁLYA CARVALHO FARIAS**

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 em Ciências Agrárias / Área de Concentração: Biotecnologia e Melhoramento Vegetal.

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses**

**CAMPINA GRANDE – PB**

**FEVEREIRO DE 2018**

É expressamente proibido 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 do trabalho.

F224i Farias, Nathálya Carvalho.  
Identificação de uma nova fitase bacteriana através de  
prospecção metagenômica [manuscrito] : / Nathálya Carvalho  
Farias. - 2018.  
67 p. : il. colorido.  
  
Digitado.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) -  
Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-  
Graduação e Pesquisa, 2018.  
"Orientação : Prof. Dr. Carlos Henrique Salvino Gadelha  
Meneses, Departamento de Biologia - CCBS."  
  
1. Metagenômica funcional. 2. restos culturais. 3. *Oryza*  
sativa L.

21. ed. CDD 633.2

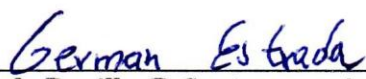
# IDENTIFICAÇÃO DE UMA NOVA FITASE BACTERIANA ATRAVÉS DE PROSPECÇÃO METAGENÔMICA

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 em Ciências Agrárias / Área de Concentração: Biotecnologia e Melhoramento Vegetal.

Aprovada em 26 de fevereiro de 2018

Banca examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Diogo Gonçalves Neder (D.Sc. Genética e Melhoramento de Plantas) – UEPB

  
\_\_\_\_\_  
Dr. German Andres Estrada Bonilla (D.Sc. Agronomia – Solo e Nutrição de Plantas) –  
CORPOICA - Colômbia

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses (D.Sc. Biotecnologia Vegetal) – UEPB  
Orientador

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela paz e luz.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão à bolsa de estudo.

À UEPB, ao PPGCA e Embrapa Algodão pelas condições de ensino e pesquisa para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Dr. Carlos Henrique, pela amizade, profissionalismo, dedicação, ensinamentos, conselhos e pela imensa paciência durante todo período de pesquisa e escrita desta dissertação.

A banca examinadora, pela disponibilidade, participação e contribuições positivas para este trabalho.

A minha família, em especial aos meus pais, pelo estímulo e pelos grandiosos ensinamentos que fizeram de mim uma pessoa grata por todas as oportunidades.

Ao meu esposo, Thiago, por me acompanhar desde o início da minha vida acadêmica e por sempre me apoiar e me incentivar a se entregar nas escolhas e decisões.

A minha grande amiga Sinthia, pela fiel amizade, por todo apoio e por sempre estar torcendo por mim.

Às amigas que o Mestrado trouxe: Aline, Maysa, Karol e Geovana! Meninas, muito obrigada pelas risadas e pelas palavras nos momentos que tudo parecia perdido.

A toda turma 2016 do PPGCA pela partilha de companheirismo e aflições durante os dois anos de curso.

À Isabela pelo auxílio na escrita do artigo.

A todos, muito obrigada.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	v
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	vi
<b>RESUMO</b> .....	vii
<b>ABSTRACT</b> .....	viii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	09
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	11
3.1 Geral .....	11
3.2 Específicos .....	11
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	12
3.1 A cultura do arroz vermelho .....	12
3.2 Torta de mamona .....	13
3.3 Compostagem .....	14
3.4 Diversidade microbiana ambiental .....	15
3.5 Bibliotecas metagenômicas .....	16
3.6 Solubilização de fosfato inorgânico .....	18
3.6.1 Fosfatases .....	20
3.6.2 Fitases .....	21
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	24
4.1 Obtenção e avaliação de amostras a partir da compostagem dos restos culturais de arroz vermelho e torta de mamona .....	24
4.2 Extração do DNA metagenômico .....	24
4.3 Construção de biblioteca metagenômica .....	26
4.3.1 Reparo dos fragmentos para clonagem em vetor fosmídeo .....	26
4.3.2 Seleção do tamanho dos insertos .....	28
4.3.3 Reação de ligação dos insertos no vetor fosmídeo .....	29
4.3.4 Reação de empacotamento .....	29
4.4 Infecção das células EPI300-T1R .....	29
4.5 Seleção de clones com atividade fitásica .....	30

4.6 Análise da sequência dos insertos de interesse presentes nos cosmídeos .....	31
4.7 Modelagem da proteína PhyRc001 .....	31
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>33</b>
5.1 Extração e quantificação de DNA .....	33
5.2 Construção e triagem da biblioteca metagenômica .....	35
5.3 Análise da sequência de genes clonados .....	37
5.4 Modelagem da proteína PhyRC001 .....	39
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>41</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>42</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>51</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Fases da compostagem (Adaptado de D'ALMEIDA e VILHENA, 2000) .....	15
<b>Figura 2:</b> Construção de biblioteca metagenômica (Adaptado de SCHLOSS e HANDELSMAN, 2003) .....	17
<b>Figura 3:</b> Principais espécies microbianas solubilizadoras de fosfato (Adaptado de SHARMA et al., 2013) .....	19
<b>Figura 4:</b> Hidrólise do ácido fítico pela enzima fitase (Adaptado de Yao et al., 2011) .....	21
<b>Figura 5:</b> Modelos moleculares gerados pela plataforma do <i>National Center for Biotechnology Information</i> (NCBI) ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a> ) de representantes das três classes de fitases .....	23
<b>Figura 6:</b> Esquema ilustrativo apresentando características do vetor cosmídeo pWEB-TNC ...	27
<b>Figura 7:</b> Perfil eletroforético de gel de agarose indicando a extração do DNA metagenômico.....	32
<b>Figura 8:</b> Perfil eletroforético em gel de agarose do DNA metagenômico clivado .....	33
<b>Figura 9:</b> Perfil eletroforético em gel de agarose do vetor pWEB::TNS linearizado, com auxílio da enzima <i>smal</i> .....	34
<b>Figura 10:</b> Seleção dos insertos clonados .....	35
<b>Figura 11:</b> Clonagem de um novo gene de fitase a partir de compostagem de arroz vermelho e torta de mamona utilizando uma abordagem metagenômica funcional .....	36
<b>Figura 12:</b> Classificação de PhyRC001 por análise de nucleotídeos e aminoácidos .....	37
<b>Figura 13:</b> Modelagem por homologia da enzima fitase PhyRC001 .....	39
<b>Figura 14:</b> Gráfico de Ramachandran para PhyRC001 obtido pelo PROCHECK .....	40



## LISTA DE ABREVIATURAS

ADP – Adenosina difosfato

AMP – Adenosina monofosfato

ATP – Adenosina trifosfato

B.O.D – Biochemical Oxygen Demand (Demanda Bioquímica de Oxigênio)

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool* (Ferramenta Básica de Alinhamento Local)

BPP – Fitase  $\beta$ -hélice

DNA – Ácido desoxirribonucleico

GTP – Guanosina trifosfato

h – Hora

HAP – Fosfatase ácida de histidina

kb - Kilobase

kDa – Kilodalton

min – Minuto

mM – Milimolar

NADP – Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

Na-IHP – Fitato

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

ng - Nanograma

ORF - *Open Reading Frame* (Quadro de Leitura Aberto)

PAP – Fosfatase ácida púrpura

pb – Pares de bases

pH – Potencial hidrogeniônico

PSM – Microrganismos solubilizantes de fosfato

RNA – Ácido ribonucleico

rRNA – RNA ribossomal

$\mu$ g – Micrograma

$\mu$ L – Microlitro

## RESUMO

FARIAS, NATHÁLYA CARVALHO. M.Sc., Universidade Estadual da Paraíba/Embrapa Algodão, fevereiro de 2018. **Identificação de uma nova fitase bacteriana através de prospecção metagenômica.** Campina Grande, PB, 2018. 67p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias). Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses.

A diversidade bacteriana de amostras ambientais e seu potencial ainda são pouco explorados. As abordagens metagenômicas oferecem a oportunidade para a prospecção de genes de interesse biotecnológico a partir de microrganismos não-cultiváveis em laboratório. Materiais em processo de compostagem exibem grande atividade microbiológica, o que torna o ambiente propício para a degradação de material lignocelulósico. Neste contexto, diversas enzimas vêm sendo identificadas por catalisarem estas reações. As fitases são enzimas fosfatases amplamente produzidas que hidrolisam o fitato liberando fósforo e minerais quelados. Devido a este potencial, estas enzimas têm se tornado facilmente interessantes para o campo biotecnológico. Procurou-se assim, investigar o potencial metagenômico para a identificação de genes com atividade fitásica. Após a obtenção do material, foi realizada a extração de DNA, seguida da etapa de purificação. Usou-se o DNA total extraído para construção de biblioteca metagenômica em vetor cosmídeo, através de kits comerciais (EPICENTRE). Os clones positivos para atividade fitásica foram sequenciados e analisados. A prospecção realizada neste estudo, identificou um gene (PhyRC001) que codifica uma fitase, onde, a identidade de aminoácidos entre PhyRC001 e os seus homólogos mais próximos publicados são inferiores a 60%.

**Palavras-chave:** Metagenômica funcional; restos culturais; *Oryza sativa* L.; *Ricinus communis* L.

## ABSTRACT

FARIAS, NATHÁLYA CARVALHO. M.Sc., Universidade Estadual da Paraíba/Embrapa Algodão, February 2018. **Identification of a new bacterial phytase through metagenomic prospection.** Campina Grande, PB, 2015. 67p. Dissertation (Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias). Advisor: Prof. Dr. Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses.

The bacterial diversity of environmental samples and their potencial are still poorly explored. Metagenomics approaches offer the opportunity for the prospection of genes with biotechnological interest from non-cultured microorganisms in the laboratory. Materials in the process of composting exhibit high microbiological activity, which indicates that the environment is conducive to the degradation of lignocellulosic material. In this context, several enzymes have been identified by catalyzing these reactions. Phytases are widely produced phosphatase enzymes that hydrolyze phytate by releasing phosphorus and chelated minerals. Due to this potential, these enzymes have become easily interesting for the biotech field. The aim was to investigate the metagenomic potential for the identification of genes with phytase activity. After obtaining the material, DNA extraction was performed, followed by its purification. Total extracted DNA was used to construct the metagenomic library with cosmid vector through commercial kits (EPICENTRE). Positive clones for phytase activity were sequenced and analyzed. The prospection carried out in this study identified a gene (PhyRC001) encoding a phytase where the amino acid identity between PhyRC001 and its nearest published homologs is less than 60%.

**Keywords:** Functional metagenomics; cultural remains; *Oryza sativa* L.; *Ricinus communis* L.

## 1. INTRODUÇÃO

Os requisitos nutricionais das plantas, considerando um balanço mineral que fornece o desempenho máximo e que tem menor custo, vem sendo abordado em estudos recentes (BRINDRABAN et al., 2015). Entre os minerais, o fósforo (P) destaca-se por sua participação em muitas funções durante o desenvolvimento da planta pelo seu alto custo como fonte de suplementação na fertilização (BRINDRABAN et al., 2015; ALORI et al., 2017).

O fósforo orgânico (Po) representa até 80% do total de P presente nos solos, dos quais 50% estão na forma de fitato (Na-IHP). Esta forma de Po parece ser usada ligeiramente apenas pelas plantas (VOGEL et al., 2018). A hidrólise do fitato é mediada especificamente pela fitase, enzima cuja contribuição para a nutrição das plantas ainda é pouco explorada. Sabe-se que o ambiente apresenta uma alta taxa de diversidade biológica microbiana, no entanto, apenas uma pequena parte disso é conhecida (PROSSER, 2015). Alguns desses microorganismos são responsáveis pela direção dos principais ciclos biogeoquímicos e, portanto, desempenham funções ecológicas que os tornam indispensáveis, como sua participação na hidrólise do fitato (ALORI et al., 2017).

Com o desenvolvimento de técnicas de cultivo puro, os microorganismos podem ser estudados individualmente e caracterizados, principalmente, por critérios nutricionais. No entanto, o uso deste tipo de abordagem de cultivo limita as avaliações taxonômicas e filogenéticas de alguns organismos, uma vez que os organismos cultivados representam apenas uma pequena fração da diversidade de espécies nas comunidades microbianas (MÉNDEZ-GARCÍA et al., 2015). Nesta perspectiva, a metagenômica aparece como a melhor ferramenta de prospecção para revolucionar o campo da biotecnologia, permitindo a descrição de alta resolução de comunidades bacterianas complexas em seus ambientes naturais (ESCOBAR-ZEPEDA et al., 2015; OFAIM et al., 2017).

O isolamento de genes de microrganismos não cultiváveis é um alvo atraente para a metagenômica funcional e esta abordagem já foi utilizada em diversos estudos para clonar e caracterizar fitases e fosfatases (SUENAGA, 2015; PAL-ROY et al., 2016). No entanto, ainda

existe uma grande diversidade de fitases microbianas inexploradas em muitos ambientes e espécies que ainda não foram estudadas.

Assim como os restos culturais de arroz apresenta-se como uma ótima fonte de carbono para o solo, a torta de mamona é um fertilizante orgânico rico em nitrogênio que vem sendo amplamente utilizado na agricultura, e que apresenta grande potencial para fornecer matéria-prima para a produção de biodiesel (MENESES et al., 2016; PATEL et al., 2016). Este produto originado a partir do óleo da semente da mamona exibe uma liberação gradativa de compostos nutricionais para o solo, auxiliando em seu melhoramento (PATEL et al., 2016). Uma abordagem metagenômica sobre esses materiais em decomposição parece ser uma ótima oportunidade para explorar um microambiente favorável à diversidade genética de microorganismos contendo genes que codifiquem fitases.

A utilização de catalisadores biológicos aliados a técnicas de análise molecular demonstram uma abordagem promissora para a prospecção biotecnológica. Esta inovação traz consigo uma ampla possibilidade na descoberta de novos genes, enzimas e compostos químicos que podem ser aplicados em procedimentos industriais ou agrônômicos visando à redução de custos e a sustentabilidade ambiental.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Identificar genes de interesse biotecnológico, em biblioteca metagenômica construída a partir de amostras de compostagem de restos culturais de arroz vermelho com torta de mamona.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Construir uma biblioteca metagenômica a partir de amostras da compostagem de restos culturais de arroz vermelho com torta de mamona;
- Realizar triagem funcional da biblioteca metagenômica visando à identificação de clones com atividades fitásicas;
- Conhecer as sequências de DNA responsáveis pela atividade fitásica dos clones identificados.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 A cultura do arroz vermelho

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma das plantas cultivadas mais antigas da história da humanidade. Postula-se que este cereal seja originário do sudeste asiático e tenha sido introduzido no Brasil durante o século XVI quando caravelas de Pedro Álvares Cabral chegaram à Bahia (CASTRO et al., 2005; FREITAS, 2010).

Por apresentar uma alta concentração de carboidratos, o arroz é considerado um importante alimento básico para mais da metade da população mundial. Além de fornecer proteínas, vitaminas e minerais e possuir um baixo teor lipídico, este cereal constitui-se como um dos alimentos mais importantes para o equilíbrio alimentar e nutricional (WALTER et al, 2008; BOERS et al., 2015; PENGKUMSRI et al., 2015).

Botanicamente, é uma gramínea da família Poaceae, pertencente ao grupo das monocotiledôneas. Suas espécies apresentam caule oco com flores verdes e reduzidas e um sistema radicular formado por raízes adventícias (KELLOGG, 2009). Apesar de ser considerada uma espécie hidrófila, a água não é um fator limitante e cultivares de arroz adaptam-se e desenvolvem-se em todas as regiões e continentes (VAUGHAN, 1994).

Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) (2017), o arroz ocupa a terceira maior produção cerealífera no Brasil, ficando atrás apenas das produções de trigo e milho. De acordo com os dados obtidos até junho de 2017 (safra 2016/2017), foram plantados aproximadamente 6.141 mil hectares resultando numa produção de 12.129,9 mil toneladas, tornando o país o maior produtor desse cereal no Hemisfério Ocidental (CONAB, 2017).

Apesar da predominância da produção e consumo do arroz tipo branco comum, o tipo vermelho vem ganhando prestígio na mesa brasileira, mas atualmente apresenta cultivo restrito a pequenas áreas do Norte, Nordeste e Centro-Oeste. Também conhecido como arroz-de-Veneza ou arroz-da-terra, o arroz vermelho (*Oryza sativa* L.) pertence à mesma espécie do arroz branco

cultivado, é assim denominado devido à coloração de seu pericarpo a qual pode variar desde o vermelho claro até o vermelho escuro (PEREIRA et al., 2014).

Segundo Sweeney e colaboradores (2006), a alusão a esta cor é dada por uma substância conhecida como proantocianina, característica esta, condicionada pelo caráter dominante controlado pelo gene *Rd* no cromossomo 1 e pelo gene *Rc* no cromossomo 7. Este pigmento apresenta grande importância para a alimentação humana à qual se atribuem propriedades antioxidantes e ações repelentes contra alguns patógenos e predadores da cultura do arroz (PEREIRA et al., 2014).

Embora seja considerada uma planta invasora por gerar competição intraespecífica em arrozais comerciais, o arroz vermelho é considerado patrimônio cultural e alimentar para grande parte da população que habita o semiárido nordestino brasileiro (MENEZES et al., 2011). Apesar de seu cultivo ser, principalmente, como lavoura de subsistência, a sua larga produção acaba gerando um grande volume de resíduos agrícolas, trazendo preocupações ambientais pelo descarte inadequado.

Devido a seu baixo valor nutritivo, poucas alternativas para a utilização dos restos culturais do arroz têm sido abordadas na literatura, entretanto, este material orgânico apresenta grande potencial para tratamento e fertilização do solo, aplicação em ração animal, além de ser considerado um grande recurso para geração de calor e susceptibilidade de biotransformação (PENHA et al., 2016).

### **3.2 Torta de mamona**

A mamona (*Ricinus communis* L.), mamoneira, carrapateira ou rícino, é uma planta pertencente à família das Euforbiáceas e disseminada por diversas regiões do globo terrestre. Nativa de países de clima tropical e subtropical de origem africana, a sua introdução no Brasil deu-se durante a vinda de escravos africanos no período da colonização portuguesa (CAMPOS, 2015).

Devido a sua excelente capacidade de adaptação e pouca exigência em termos de clima, solo e manejo, a mamoneira é encontrada espontaneamente em várias regiões brasileiras, desde o Amazonas até o Rio Grande do Sul. Morfologicamente, suas espécies apresentam características bastante variáveis como altura, teor de óleo, tamanho e coloração de suas folhas, caule e sementes (COSTA et al., 2006; CAMPOS, 2015).



O Brasil é o terceiro maior produtor mundial dessa oleaginosa, tanto em área colhida, como em quantidade produzida, e a região Nordeste é a principal responsável pela produção nacional de mamona (OLIVEIRA FILHO et al., 2010; CONAB, 2016).

O principal produto obtido deste vegetal é o óleo de rícino, uma matéria-prima valiosa que corresponde a uma fração muito alta do peso das sementes (variando de 42 a 58%), e que vem sendo amplamente utilizado na indústria química para fabricação de tintas, vernizes, lubrificantes, cosméticos e plásticos (COSTA et al., 2010; KALOGIANNIS et al., 2016). O processo de extração do óleo das sementes deste vegetal produz um importante subproduto, chamado torta de mamona. Esta torta apresenta excelentes propriedades químicas para uso na agricultura, por apresentar elevados teores de nitrogênio e outros importantes nutrientes (COSTA et al., 2004).

De um modo geral, a torta de mamona apresenta grande potencial de uso como fertilizante orgânico e condicionador de solo, além de apresentar propriedades inseticida e nematicida (SILVA et al., 2012). A grande vantagem do uso como adubo em relação à aplicação de fertilizantes químicos é a liberação gradual dos nutrientes à medida que são demandados para o crescimento da planta (SEVERINO et al., 2004).

Apesar do alto teor proteico, usos mais nobres desta torta, como alimento animal, ainda dependem de tecnologia industrial para sua detoxificação e desalerginação, uma vez que a semente da mamona apresenta a ricinina, uma proteína tóxica (encontrada exclusivamente no endosperma das sementes) que pode causar sérios danos ao sistema nervoso central (KALOGIANNIS et al., 2016).

### **3.3 Compostagem**

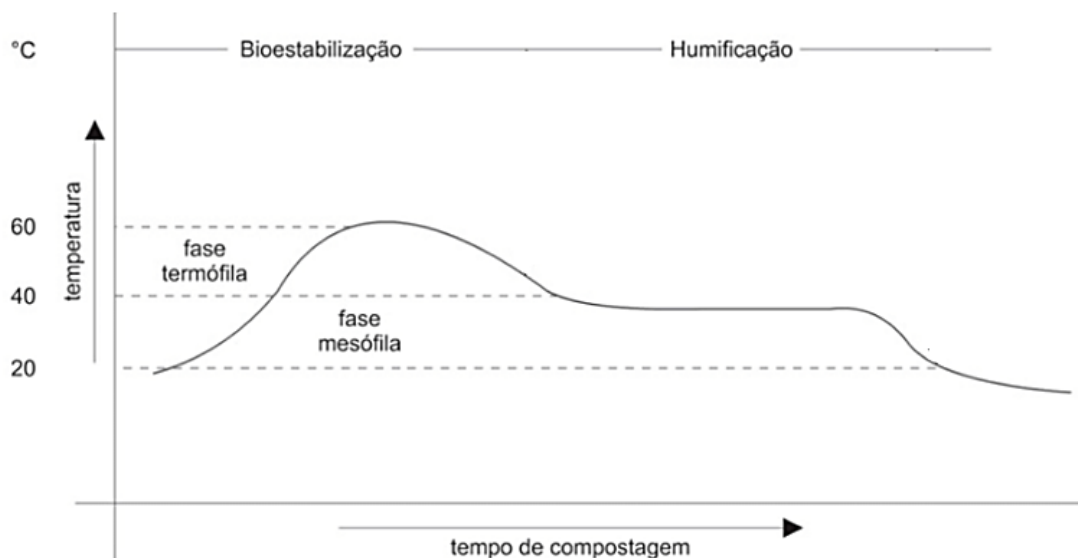
Compostagem é um termo designado ao processo natural em que ocorre a degradação biológica e estabilização da matéria orgânica sob condições aeróbicas ou anaeróbicas (através do processo de fermentação) de microrganismos. Em larga escala, tornou-se uma alternativa biotecnológica e de baixo custo comumente utilizada para o tratamento de resíduos agrícolas, esgotos e outros resíduos orgânicos (YU et al., 2011; WÉRY, 2014).

Durante o processo de compostagem, a digestão da matéria orgânica é realizada através do metabolismo microbiano pela ação de enzimas como proteases, lipases, celulasas e fosfatases, onde, o volume inicial do material pode ser reduzido à metade devido a degradação dos materiais disponíveis no ambiente (WEI et al., 2000).

A compostagem prevê duas etapas distintas (fase de biodegradação e fase de maturação) as quais estão relacionadas diretamente com modificações na temperatura, umidade, pH, além de alterações na composição da microbiota presente no ambiente (Figura 1).

Na fase de biodegradação ou bioestabilização, ocorre uma rápida transformação da matéria orgânica devido a intensa atividade microbológica, portanto, o acentuado metabolismo impulsiona o aumento da temperatura. Na fase de maturação, a temperatura é reduzida junto à taxa da atividade biológica e o término do processo metabólico resulta na polimerização de moléculas orgânicas estáveis no processo conhecido como humificação (JURADO et al., 2014; BERTICELLI et al., 2016).

Do ponto de vista sustentável, o processo de compostagem proporciona uma redução dos resíduos e dos impactos ambientais, bem como apresenta grandes benefícios para o desenvolvimento e nutrição das plantas, manutenção da vida e condicionamento de propriedades físicas, químicas e biológicas do solo devido a maximização da reciclagem de macro e micronutrientes (SÁNCHEZ-GARCÍA et al., 2015; SÁNCHEZ et al., 2017).



**Figura 1:** Fases da compostagem (Adaptado de D'ALMEIDA e VILHENA, 2000)

### 3.4 Diversidade microbiana ambiental

Há tempos os microrganismos exercem um papel fundamental na história do desenvolvimento biotecnológico. Os primeiros processos envolvidos mediante a utilização de técnicas de fermentação ocorreram há cerca de 6000 anos atrás com o processo para a produção de bebidas alcóolicas e pães. Desde então, o aprimoramento de técnicas permite o homem lidar, melhorar e até solucionar problemas a partir de sua utilização (BUCHHOLZ e COLLINS, 2013).

Como a forma primitiva e predominante de vida na Terra, os microrganismos exibem um espectro de diversidade evolutiva, funcional e metabólica que excede amplamente a de todos os outros organismos da árvore filogenética (THIMMIS et al., 2017). Atualmente, as formas de vida microbiana são encontradas em todos os nichos ecológicos da Terra e tal comunidade está formada por organismos que constituem os três domínios taxonômicos: Archaea, Bacteria e Eukarya (fungos e protistas) (DUDANIEC et al., 2016).

Os microrganismos são importantes elementos por mediar e regular os ciclos biogeoquímicos bem como participarem na reciclagem de nutrientes, interagirem com animais e plantas, além de apresentarem participação em processos de biodegradação, compostagem, tratamento de águas, bioindicação de qualidade ambiental e serem utilizados como fontes de substâncias antimicrobianas e fármacos (BROSSI et al., 2014; KOUZUMA e WATANABE, 2014; PROSSER, 2015).

Com o desenvolvimento de técnicas de cultivo puro, uma vasta gama de microrganismos puderam ser estudados e caracterizados individualmente, entretanto, esta abordagem de cultivo tradicional limita-se a avaliação taxonômica e filogenética. Devido ao alto grau de diversidade biológica e a heterogeneidade de ambientes habitada pela vida microbiana, avanços na área da Biologia Molecular permitiram estudos (principalmente a partir de sequências de rRNA 16s) que contribuem para o rastreamento e catalogação de genes ainda não descritos (QUINCE et al., 2017).

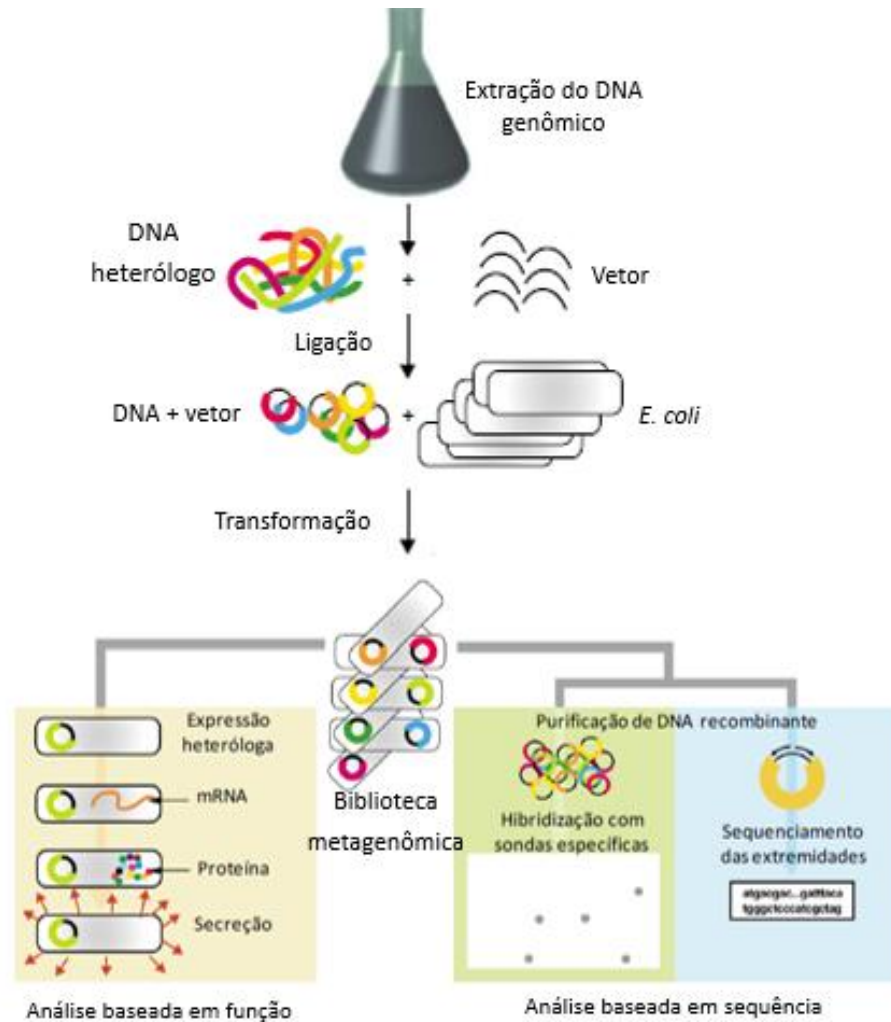
Tecnologias de sequenciamento de DNA ou RNA em conjunto com estudos computacionais são combinados em métodos metagenômicos que permitem uma análise detalhada e uma maior difusão sobre a diversidade microbiana não-cultivável em laboratório. A utilização deste importante recurso permite, principalmente, o uso de microrganismos como potencial não somente em serviços ambientais, mas também como potencial para o desenvolvimento de oportunidades para prospecção biotecnológica (PYLRO et al., 2014).

### **3.5 Bibliotecas metagenômicas**

Nessa busca incessante de se evitar limitações na exploração genética de microrganismos dependentes de meio de cultura, muitas tecnologias baseadas na extração e sequenciamento de ácidos nucleicos vem acelerando o progresso na compreensão da diversidade da vida microbiana em muitos ambientes (CÁRDENAS et al., 2016). Baseada neste objetivo, a metagenômica, uma nova e rápida estratégia de prospecção gênica, permite o acesso a completa composição genética contida em amostras ambientais específicas (OULAS et al., 2015).

A abordagem metagenômica é uma ferramenta funcional e já provou ser poderosa para a demanda de novos biocatalizadores a partir de fontes procarióticas não-cultiváveis. A partir das informações vinculadas a descoberta de novas formas genéticas, torna-se possível o aprofundamento e compreensão dos parâmetros físicos, químicos e biológicos que caracterizam o ambiente, além da identificação da diversidade e filogenia da comunidade microbiana existente (THOMAS et al., 2012; GOMES et al., 2013; CÁRDENAS et al., 2016; NAZIR, 2016).

Os processos metodológicos empregados para a construção das bibliotecas metagenômicas, envolvem as seguintes etapas: 1) extração de DNA de uma amostra ambiental, 2) clonagem em vetor adequado e 3) transformação em bactéria hospedeira (Figura 2). Por apresentar um fácil manuseio, padrões fisiológicos e genéticos estabelecidos, a bactéria *Escherichia coli* vem sendo utilizada com sucesso como hospedeiro padrão para a análise das bibliotecas através de sua expressão fenotípica (DANIEL, 2004; NAZIR, 2016).



**Figura 2:** Construção de biblioteca metagenômica (Adaptado de SCHLOSS e HANDELSMAN, 2003)

A prospecção das bibliotecas metagenômicas pode ser conduzida de forma que o DNA genômico seja analisado através da investigação funcional e/ou baseada em sequência. O método baseado na função identifica clones que expressam uma enzima sob condições seletivas em meio de cultivo através da formação de um halo de hidrólise em torno de uma colônia bacteriana, enquanto o método baseado na sequência faz uso de regiões conservadas do DNA clonado, tendo a identificação do microrganismo realizada por comparação das sequências nucleotídicas obtidas com bancos de dados (SIMON e DANIEL, 2011).

O desenvolvimento de ferramentas da bioinformática avançou significativamente nesta metodologia e tem sido determinante para a triagem, processamento e análise dos dados gerados pelas técnicas de sequenciamento (BRAGG e TYSON, 2014). O emprego da metagenômica associado a construção de bibliotecas vem mostrando resultados positivos ao longo dos anos,

colaborando para a descoberta de novas enzimas, como lipases, fitases, celulases, fosfatases e vários outros biocatalisadores (NAZIR, 2016).

Desse modo, a biotecnologia, tida como uma das mais promissoras tecnologias, aliada a metagenômica, apresentam juntas um acelerado e grande potencial para a prospecção biotecnológica na busca de novos recursos biológicos industrialmente exploráveis e por novas soluções para problemas na agricultura, saúde, indústria e no meio ambiente (SCHENBERG, 2010; PEÑA-GARCÍA et al., 2016).

### **3.6 Solubilização de fosfato inorgânico**

O fósforo é um macronutriente que tem posição de destaque entre os animais, vegetais e microrganismos, sendo as rochas, o maior reservatório de P na natureza (LÓPEZ-ORTEGA et al., 2013). Seu papel torna-se indispensável em virtude de ser um dos elementos constituintes das moléculas de DNA, RNA, ATP e ADP e por atuar em diversas atividades fisiológicas como fotossíntese, respiração e divisão celular. Após o nitrogênio (N), geralmente é o fator mais limitante para o crescimento e a produtividade das plantas (SHARMA et al., 2011; BEHERA et al., 2017).

Em média, o nível de fósforo disponível para absorção do solo é de cerca de 0,05%, no entanto, apenas uma pequena parcela está disponível para absorção e utilização pelos vegetais (ZHU et al., 2011). Mediante a grande necessidade deste nutriente na agricultura, a aplicação de fertilizantes de síntese química vem sendo comumente empregada para suprir esse déficit, embora acarrete problemas ambientais (ALORI et al., 2017). Alternativamente, a utilização de microrganismos solubilizantes de fosfato (PSM - *Phosphorus Solubilizing Microorganisms*) permite a redução no uso destes compostos químicos (ALORI et al., 2012).

Os PSM efetuam processos metabólicos que são efetivos na solubilização e mineralização do P. Eles estão envolvidos em uma ampla gama de processos biológicos, incluindo a transformação e o aumento da biodisponibilidade do fósforo insolúvel do solo para uso da planta (ALORI et al., 2017). Um número substancial de espécies microbianas, como bactérias, fungos, actinomicetos e até mesmo algas e micorrizas arbusculares já foram descritas por exibirem esta atividade (Figura 3) (SHARMA et al., 2013).

Bactérias	<i>Alcaligenes sp., Aerobacter aerogenes, Achromobacter sp., Actinomadura oligospora, Agrobacterium sp., Azospirillum brasilense, Bacillus sp., Bacillus circulans, B.cereus, B.fusiformis, B. pumils, B. megaterium, B. mycooides, B. polymyxa, B. coagulans B.chitinolyticus, B. subtilis, Bradyrhizobium sp., Brevibacterium sp., Citrobacter sp., Pseudomonas sp., P. putida, P. striata, P. fluorescens, P. calcis, Flavobacterium sp., Nitrosomonas sp., Erwinia sp., Micrococcus sp., Escherichia intermedia, Enterobacter asburiae, Serratia phosphoticum, Nitrobacter sp., Thiobacillus ferrooxidans, T. thiooxidans, Rhizobium meliloti, Xanthomonas sp.</i>
Fungos	<i>Aspergillus awamori, A. niger, A. terreus, A. flavus, A. nidulans, A. foetidus, A. wentii. Fusarium oxysporum, Alternaria tenuis, Achrothcium sp. Penicillium digitatum, P. lilacinium, P. balaji, P. funiculosum, Cephalosporium sp. Cladosporium sp., Curvularia lunata, Cunninghamella, Candida sp., Chaetomium globosum, Humicola insolens, Humicola lanuginosa, Helminthosporium sp., Paecilomyces fusisporous, Pythium sp., Phoma sp., Populospora mytilina, Myrothecium roridum, Morteirella sp., Micromonospora sp., Oideodendron sp., Rhizoctonia solani, Rhizopus sp., Mucor sp., Trichoderma viridae, Torula thermophila, Schwanniomyces occidentalis, Sclerotium rolfsii.</i>
Actinomicetos	<i>Actinomyces,, Streptomyces.</i>
Algas (Cianobactérias)	<i>Anabena sp., Calothrix braunii, Nostoc sp., Scytonema sp.,</i>
Microrrizas arbusculares	<i>Glomus fasciculatum.</i>

**Figura 3:** Principais espécies microbianas solubilizadoras de fosfato (Adaptado de SHARMA et al., 2013)

Os principais mecanismos empregados pelos microrganismos para a solubilização/mineralização do P do solo incluem a produção de ácidos orgânicos e inorgânicos e a liberação de enzimas extracelulares. Fatores externos como temperatura, pH e tipo de solo favorecem este processo (SESHACHALA e TALLAPRGADA, 2012; ALORI et al., 2017).

Como observado em muitas experiências, a produção dos ácidos orgânicos dá-se em decorrência do metabolismo microbiano, principalmente pela respiração oxidativa ou pela fermentação de fontes orgânicas de carbono. Sua liberação, através da membrana citoplasmática, resulta na acidificação das células, reduzindo o pH e liberando os íons de P. De todos os ácidos orgânicos, o ácido glucônico é o agente mais frequente de solubilização de fosfatos minerais (SHARMA et al., 2013; BEHERA et al., 2014).

Embora a liberação de ácidos orgânicos tenha sido sugerida como o principal mecanismo de solubilização de P, a produção de ácidos inorgânicos (ácido sulfúrico, nítrico e carbônico), mesmo com menor eficácia, e a liberação de enzimas como fosfatases e fitases, tem se revelado como importantes mecanismos para a disponibilidade deste nutriente (ALORI et al., 2017).

### 3.6.1 Fosfatases

A absorção de fósforo do ambiente e sua utilização eficiente exigem a atuação de uma grande classe de enzimas denominadas de fosfatases (EC 3.1.3). Essas enzimas estão amplamente distribuídas em grupos animais, vegetais e de microrganismos e desempenham um

papel importante catalisando a hidrólise de ésteres e anidridos de ácido fosfórico (KOTROCZÓ et al., 2014).

As características exibidas pelas fosfatases são fundamentais para diversos processos biológicos como a fosforilação e desfosforilação de proteínas e participação em vias de sinalização celular e no metabolismo microbiano. No solo, sua principal função é a disponibilização de fósforo solúvel para melhor absorção pelos vegetais, bem como assimilação e mineralização do fosfato orgânico (AYOAMA et al., 2003).

A hidrólise do fosfato no solo é predominantemente mediada pela ação de fosfatases extracelulares produzidas por microrganismos. A secreção destas enzimas é induzida em decorrência da baixa concentração de fosfato inorgânico presente no solo e sua atuação ocorre para tentar suprir a necessidade de fósforo, principalmente pelas raízes das plantas (KAPRI et al., 2010).

Na literatura, as fosfatases são descritas e caracterizadas de acordo com o pH ótimo de atuação, podendo ser divididas em dois grandes grupos: fosfatases ácidas (EC 3.1.3.2) (pH > 6.0) e fosfatases alcalinas (EC 3.1.3.1) (pH > 8.0). Outras classificações também são descritas para estas enzimas, dividindo-as em a) fosfatase alcalina, b) fosfatase ácida de alta massa molecular (maior que 90 kDa), c) fosfatase ácida de baixa massa molecular (menos que 50 kDa), d) fosfatase ácida púrpura e e) proteínas fosfatases (GUIMARÃES et al. 2004).

Estas enzimas, apesar de serem identificadas nos mesmos grupos de organismos, são caracterizadas e podem ser distinguidas baseadas nas peculiaridades em seu mecanismo de ação, faixa atuante de pH, função, sequência, estrutura, ativadores e inibidores. Como por exemplo, as fosfatases alcalinas que diferenciam-se das ácidas, devido a necessidade da presença de cátions, tais como, magnésio ( $Mg^{2+}$ ), cobalto ( $Co^{2+}$ ) e manganês ( $Mn^{2+}$ ), para realização de sua atividade catalisadora (AOYAMA et al. 2003; LUCIANO e NEWELL, 2017).

Entre os microrganismos produtores de fosfatases já descritos, pode-se citar os gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter* e *Rhizobium* (WHITELAW, 2000), bem como os fungos do gênero *Aspergillus* (MULLANEY e ULLAH, 2003). *Gluconacetobacter diazotrophicus* (STEPHEN et al. 2015) e *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* (SATO et al., 2014), são exemplos de bactérias e fungos, respectivamente, que já demonstraram atividade fosfatásica.

### 3.6.2 Fitases

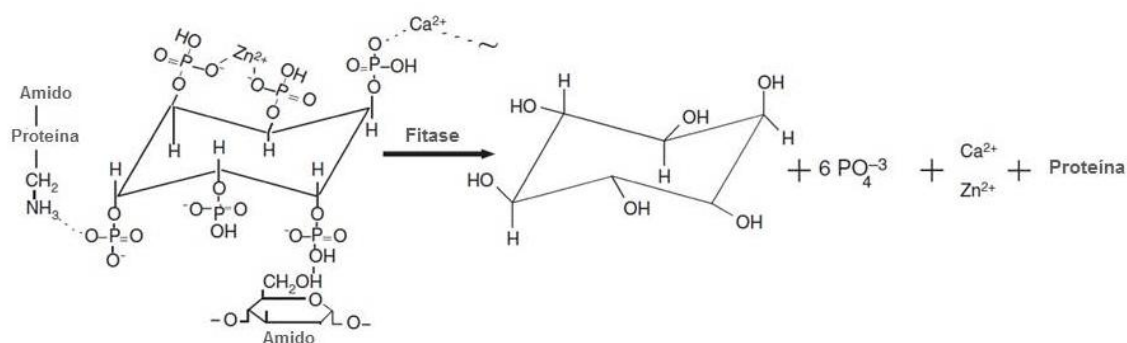
O fitato ou ácido fítico é uma molécula bastante presente na natureza e que apresenta diversas funções fisiológicas nas plantas, como o armazenamento de fósforo em cereais,



leguminosas e sementes oleaginosas além de outros minerais para a formação da parede celular após a germinação das sementes (YAO et al., 2011).

O ácido fítico apresenta alta capacidade de formar quelantes com íons, como o cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ), zinco ( $\text{Zn}^{2+}$ ) e magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), bem como com resíduos de proteínas e amido, tornando-os complexos insolúveis à degradação intestinal, diminuindo assim, a energia metabolizável. Apesar de ser considerado fator anti-nutricional, o fitato constitui a maior forma de armazenamento de P na maioria plantas (cerca de 60-90%) (GUIMARÃES et al., 2006; BENEVIDES et al., 2011; MONTEIRO et al., 2015).

A enzima fitase (mio-inositol-hexaqui-fosfato fosfohidrolase (EC 3.1.3.8)) é um tipo de fosfatase fitato-específica que catalisa a hidrólise a partir do fitato, resultando na liberação de porções de fosfato, inositol e dos minerais quelados (Figura 4). Por remover os efeitos negativos do ácido fítico, a presença da atividade desta enzima, permite a biodisponibilidade de seus nutrientes, principalmente para os animais (JÚNIOR et al., 2015; MONTEIRO et al., 2015).



**Figura 4:** Hidrólise do ácido fítico pela enzima fitase (Adaptado de Yao et al., 2011)

As fitases constituem um grupo de catalisadores que compreendem atividade em uma variável escala de pH (3.0-9.0) e temperatura (5°C-70°C), ocorrendo naturalmente de forma endógena em sementes e acumulada durante a germinação ou como enzima microbiana endógena. Entre os microrganismos produtores de fitase destacam-se diversos gêneros de bactérias (*Bacillus* e *Pseudomonas*), fungos (*Aspergillus*) e leveduras (*Saccharomyces*) (KUMAR et al., 2010; ZHANG et al., 2013).

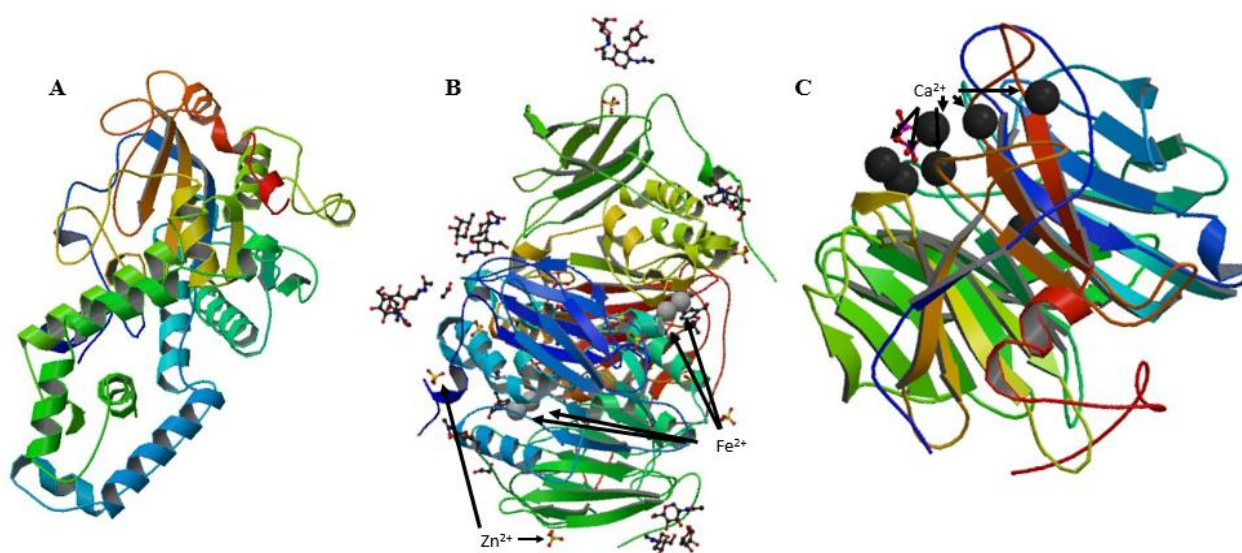
O número de fitases descritas vem aumentando, e, com base no mecanismo catalítico, estrutura e sequências de aminoácidos específicas, as fitases podem ser categorizadas em três

classes: as HAP (fosfatase ácida de histidina), PAP (fosfatase ácida púrpura) e as BPP (fitase  $\beta$ -hélice) (MULLANEY e ULLAH, 2003) (Figura 5).

A maioria das fitases bacterianas, fúngicas e vegetais pertencem a classe das HAP, constituindo assim, o maior grupo de representantes. Estas enzimas são facilmente caracterizadas pois, além de compartilharem uma sequência conservada composta por sete aminoácidos (RHGXEXP), hidrolisam o fitato na faixa de pH ácido (BOHN et al., 2008).

As PAP são metaloenzimas de elevado peso molecular (70–72 kDa) e amplamente estudadas em vegetais e animais. Assim como as HAP, catalisam a hidrólise do fitato sob condições ácidas, embora, seja normalmente em resposta a estresses e/ou durante o desenvolvimento vegetal (MULLANEY e ULLAH, 2003).

Por outro lado, as BPP são enzimas que apresentam alta atividade sob pH neutro e também elevada termorresistência em comparação com as HAPs e PAPs. A forte dependência de  $\text{Ca}^{2+}$  para sua atividade catalítica, distingue ainda mais esta enzima das outras classes de fitases (KUMAR et al., 2017).



**Figura 5:** Modelos moleculares gerados pela plataforma do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) de representantes das três classes de fitases: A) fosfatase ácida de histidina (1IPH – *Aspergillus ficcum*); B) fosfatase ácida púrpura (4DT2 - *Phaseolus vulgaris*); C) fitase  $\beta$ -hélice (1H6L – *Bacillus amyloliquefaciens*) (Adaptado)

Por apresentarem um alto potencial para melhorar a eficiência do uso do fósforo, as fitases tornaram-se facilmente interessantes para o campo biotecnológico, pois os estudos voltados para esta enzima têm como principais finalidades a redução dos gastos na dieta animal e a maximização o desenvolvimento vegetal com sua aplicação no solo (YAO et al., 2011).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Obtenção e avaliação de amostras a partir da compostagem dos restos culturais de arroz vermelho e torta de mamona**

Os restos culturais de arroz vermelho foram coletados no Município de Santana dos Garrotes - PB, situado a 316 metros de altitude, entre os meses de maio e junho de 2017. As coordenadas geográficas do município são latitude: 7° 23' 14" e longitude: 37° 58' 20". Utilizou-se a torta de mamona cultivar BRS Nordestina (gentilmente cedido pela Embrapa Algodão), produzida pelo processo de prensagem (sem extração por solvente) em prensa hidráulica (capacidade de 5 toneladas) no Laboratório de Desenvolvimento de Medicamentos – LABDEM Universidade Estadual da Paraíba.

Este trabalho foi dividido em duas partes. A primeira etapa foi à realização da coleta das plantas de arroz vermelho e aquisição da torta de mamona 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.

O material da compostagem foi fragmentado 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, para evitar a perda de umidade e de nutrientes por lixiviação devido às chuvas.

Para a montagem, folhas, caules, espiguetas, e palha na proporção de 15: 10: 6: 5 (% em peso) respectivamente e a mesma proporção de torta de mamona 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 Meneses (2016).

### **4.2 Extração e purificação do DNA metagenômico**

O DNA metagenômico dos restos culturais foi extraído pelo método de lise direta descrito por Zhou et al. (1996) e com as modificações sugeridas por Kauffmann et al. (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 N<sub>2</sub> líquido e descongelamento a 65°C com posterior adição de 50 µL de solução contendo 20 mg.mL<sup>-1</sup> de proteinase K. Após 30 minutos de vigorosa agitação em “vórtex” a 37°C, foi posteriormente 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 de 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 subsequentes 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 ( $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), descorado e, em seguida, fotografado sob luz ultravioleta.

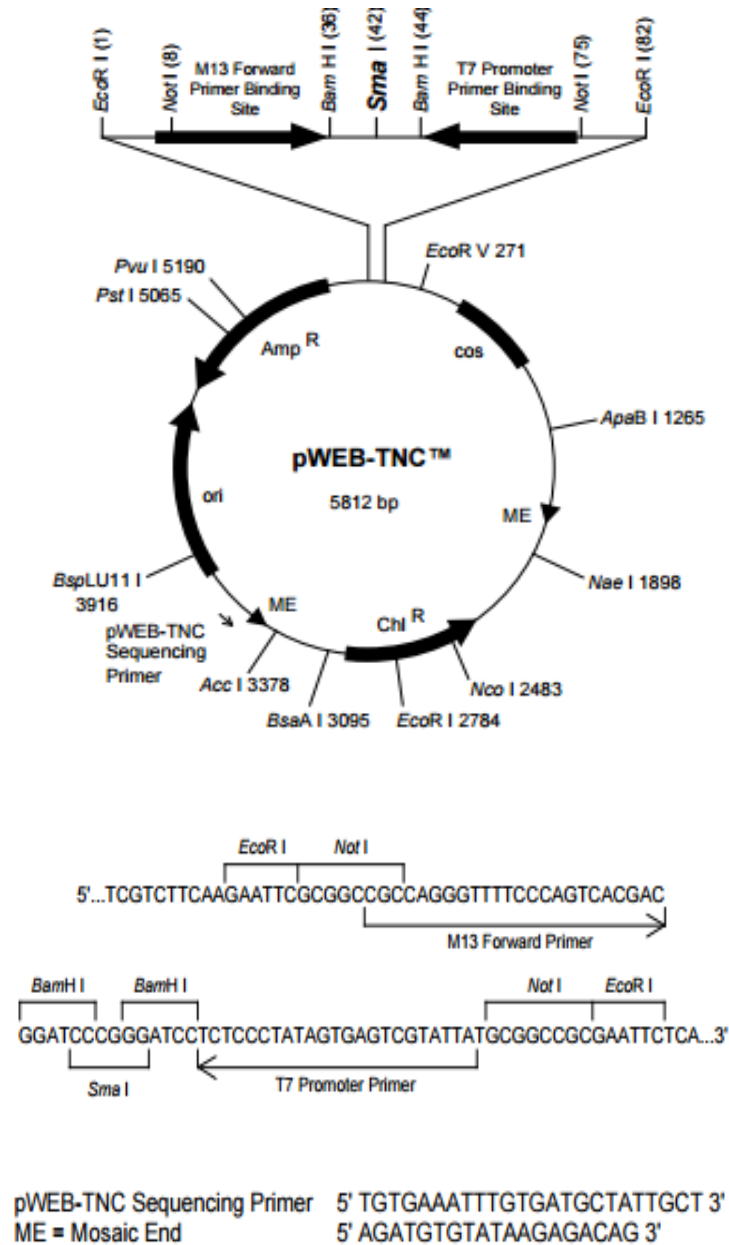
### **4.3 Construção de biblioteca metagenômica**

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 e torta de mamona foi quebrado por passagens sucessivas por ponteiras de  $200 \mu\text{L}$ . Cerca de  $20 \mu\text{g}$  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 *SmaI*, ao DNA metagenômico (Figura 6). O DNA purificado teve suas extremidades reparadas com a enzima T4 DNA polimerase e T4 polinucleótido-quinase para gerar extremidades cegas.

Para tanto, na reação de polimerização foi utilizado:  $1,5 \mu\text{g}$  de DNA metagenômico, 1x tampão NEB2 (Biolabs),  $0,5 \text{ mM}$  de dNTPs, 2 U de enzima T4 DNA Polimerase (Biolabs) e água ultrapura autoclavada para o volume final de  $80 \mu\text{L}$ . A reação foi mantida a  $12 \text{ }^\circ\text{C}$  por 30 min e logo após a  $75 \text{ }^\circ\text{C}$  por 20 min, em termociclador, para inativação da enzima. Na reação de fosforilação, foi adicionado ao mesmo tubo da reação anterior: 1x tampão da quinase (Biolabs),  $2 \text{ mM}$  de ATP, 10 U de T4 Polinucleotide quinase (Biolabs) e água ultrapura autoclavada para o volume final de  $90 \mu\text{L}$ . A reação foi incubada por 10 min a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  e, para inativação da enzima, foi mantida a  $65 \text{ }^\circ\text{C}$  por mais 10 min.



**Figura 6:** Esquema ilustrativo apresentando características do vetor cosmídeo pWEB-TNC

Para a ocorrência da ligação inserto/vetor cosmídeo foi utilizado o seguinte protocolo: a reação foi mantida novamente a 12 °C por 30 min e logo após a 75 °C por 20 min, em termociclador, para inativação da enzima. Na reação de fosforilação, foi adicionado ao mesmo tubo da reação anterior: 1x tampão da quinase (Biolabs), 2 mM de ATP, 10 U de T4 Polinucleotídeo quinase (Biolabs) e água ultrapura autoclavada para o volume final de 90 µL. A reação foi incubada por 10 min a 37 °C e, para inativação da enzima, foi mantida a 65 °C por

mais 10 min.

#### 4.3.2 Seleção do tamanho dos insertos

Assim, os fragmentos de DNA metagenômico entre 180 e 30000 bp foram recuperados em gel e posteriormente ligados ao vetor de cosmídeo pWEB::TNC que foi linearizado no sítio único *Sma*I e desfosforilado (com auxílio de enzima rSAP, *Shrimp Alkaline Phosphatase*), procedimento que será descrito mais abaixo.

Para verificação do tamanho dos insertos de interesse contidos nos plasmídeos foi realizada uma reação 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<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada deoribonucleotídeos (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

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. 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 de 30 V por 15 horas.

Após a eletroforese, foi realizado um corte vertical no gel de agarose resultando em duas porções de gel, 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 bandamento 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 180 e 30000 pb foi marcada e cortada com o auxílio de uma lâmina de bisturi, sendo depositada em tubos tipo 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, na proporção [1:10], respectivamente. Para o cálculo da razão molar, foi utilizada a fórmula abaixo para determinação da razão molar utilizada na ligação do insertos de DNA metagenômico e o 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 MgCl<sub>2</sub>) 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 (Luria-Bertani), adicionado de cloranfenicol (12,5 µg.mL<sup>-1</sup>). 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  $\mu\text{L}$  de solução de glicerol 40% (v/v). As placas foram estocadas à  $-80^\circ\text{C}$ .

Uma biblioteca de 50.000 clones foi construída e chamada de PhyRC. O tamanho médio dos insertos de DNA da biblioteca foi de aproximadamente 2,5 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 ( $14.000 \times g$ ). O precipitado celular foi ressuscitado em 350  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  de solução de lisozima (10  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  em 10 mM de Tris-HCl, pH 8,0) e agitado por 3 s. Após o tubo foi mantido a  $90^\circ\text{C}$  por 1 min e centrifugado a  $14.000 \times g$  por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde foram adicionados 40  $\mu\text{L}$  de NaOAc 3M (pH 5,2), homogeneizados e, adicionados 420  $\mu\text{L}$  de isopropanol. Após 5 min a temperatura ambiente, foi centrifugado a  $14.000 \times g$  por 10 min. O sobrenadante foi removido e o material precipitado lavado com 500  $\mu\text{L}$  de etanol 70%. Após a remoção completa do etanol, o precipitado foi ressuscitado em 20  $\mu\text{L}$  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 atividade fitásica**

Os 50.000 clones da biblioteca foram rastreados para a atividade fitásica de acordo com protocolos descritos por Unno et al. (2005). Uma seleção inicial foi realizada de modo a avaliar a atividade fitásica. 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  $35^\circ\text{C}$  por um período de 2 a 5 dias.

Para a determinação da atividade fitásica, os clones da biblioteca metagenômica foram cultivados em meio LB sólido contendo fitato de sódio (Na-IHP). Após o crescimento, durante 5 dias, as placas foram reveladas para a detecção da atividade fitásica. A revelação realizada por meio da incubação da placa a  $35^\circ\text{C}$  em tampão citrato de sódio 50mM pH 4,0, durante 30 minutos. A atividade foi visualizada por imersão da placa numa solução aquosa de cloreto de cobalto a 2% (p/v). Após uma incubação de 5 min a temperatura ambiente, a solução de cloreto de cobalto foi substituída por uma solução recentemente preparada contendo volumes iguais de uma solução aquosa de molibdato de amônio a 6,25% (p/v) e uma solução de vanadato de

amônio a 0,42% (p/v). A atividade fitásica foi evidente com o aparecimento de zonas de claras em um fundo opaco.

#### 4.6 Análise da sequência dos insertos de interesse e 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 clorafenicol e submetidos a uma extração de DNA plasmidial, (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<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada deoribonucleotídeos (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. Este procedimento 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 proteicas 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).

As análises filogenéticas foram conduzidas nos programas BioEdit ([www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html](http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html)), e MEGA versão 6.0 (TAMURA, 2013) utilizando as sequências de aminoácidos das enzimas fitases identificadas no inserto de DNA do clone PhyRC001 junto as fitases conhecidas depositadas no GenBank. O programa BioEdit foi utilizado para análises envolvendo todas as famílias de fitases com o objetivo de reproduzir os melhores alinhamentos possíveis. O programa MEGA 6.0 foi utilizado para outras análises mais específicas, como a construção da árvore filogenética. As árvores filogenéticas foram construídas pelo método *Neighbor-Joining* usando a correção de Poisson e 1000 réplicas de *bootstrap*.

#### 4.7 Modelagem da proteína de PhyRC001

A metodologia empregada para a análise molecular por homologia envolveu quatro etapas sucessivas: identificação e seleção da proteína modelo, alinhamento entre as sequências modelo e a sequência alvo, construção do modelo e validação.

A sequência de aminoácidos de PhyI 01 foi submetida a uma análise comparativa através do BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, NCBI, Bethesda, MD, EUA) ([www.ncbi.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nih.gov/BLAST)) (ALTSCHUL et al., 1990) no banco de dados PDB. As sequências de aminoácidos de alguns dos microorganismos encontrados no resultado da pesquisa foram submetidos ao alinhamento de múltiplas sequências pelo programa CLUSTALX. Neste primeiro passo, uma proteína relacionada à sequência de aminoácidos de PhyRC001 (proteína alvo) foi identificada, levando em consideração, durante o processo de escolha da proteína modelo, aspectos como: conhecimento estrutural, semelhança de sequência, similaridade de função, expressão pelo mesmo grupo de genes e correlação evolutiva entre as proteínas, 3AMR: cadeia A (ZENG et al., 2011).

Identificados no modelo de proteína, foram aplicados métodos de alinhamento geral entre as sequências, que consistiu no segundo passo da modelagem comparativa. O alinhamento entre sequências foi realizado usando o programa CLUSTALW (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>). O objetivo deste alinhamento foi reconhecer regiões estruturalmente conservadas e regiões variáveis, observando resíduos estruturalmente equivalentes na sequência primária.

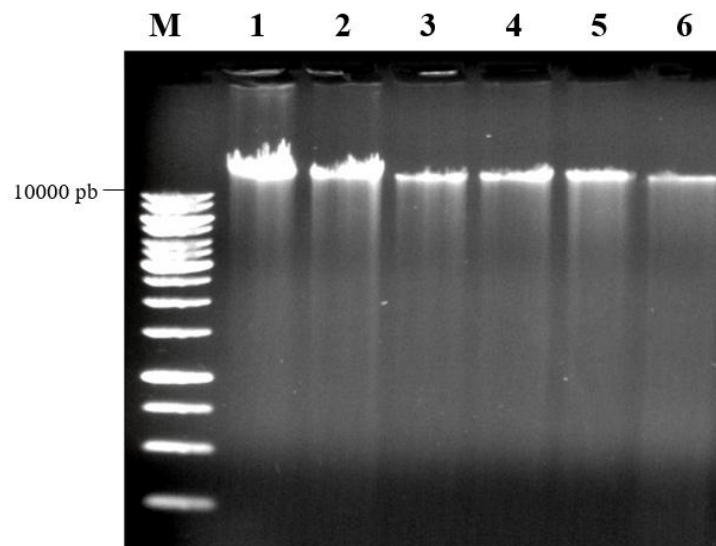
O terceiro passo da modelagem foi a construção do modelo, que se baseou na informação contida no alinhamento gerado entre as sequências. O modelo foi construído usando o programa MODELLER (ŠALI e BLUNDELL, 1993). A modelagem utilizada satisfazia todas as restrições espaciais, usando distâncias geométricas e técnicas de otimização. A visualização da estrutura tridimensional foi realizado com o auxílio do programa RASMOL (SAYLE e MILNER-WHITE, 1995).

A qualidade do modelo 3D gerado foi validada pelo gráfico de Ramachandran (RAMACHANDRAN e SASISEKHARAN, 1968) juntamente ao programa PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1993) que avaliou a estrutura tridimensional da proteína indicando sua qualidade estereoquímica. A qualidade do modelo foi vinculada à escolha do molde e à construção do alinhamento que serviu como referência para a construção dos átomos que compõem a proteína.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

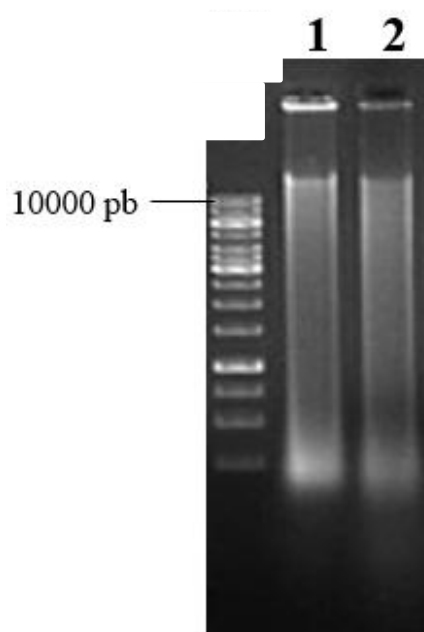
### 5.1 Extração e quantificação de DNA

O DNA obtido da pilha de compostagem de arroz vermelho e torta de mamona foi extraído com sucesso de acordo com o protocolo descrito no item 4.2. O perfil eletroforético para esta etapa pode ser visualizado na figura 7. O material genético extraído foi posteriormente utilizado para a construção da biblioteca metagenômica. Ao analisar o gel abaixo, observa-se uma alta concentração de DNA nas amostras que variam entre as colunas 1 a 6. Após este procedimento, todas as amostras foram reunidas em um único tubo. Foi utilizado 6  $\mu$ L do marcador de tamanho molecular 1 Kb DNA “Ladder” (Promega).



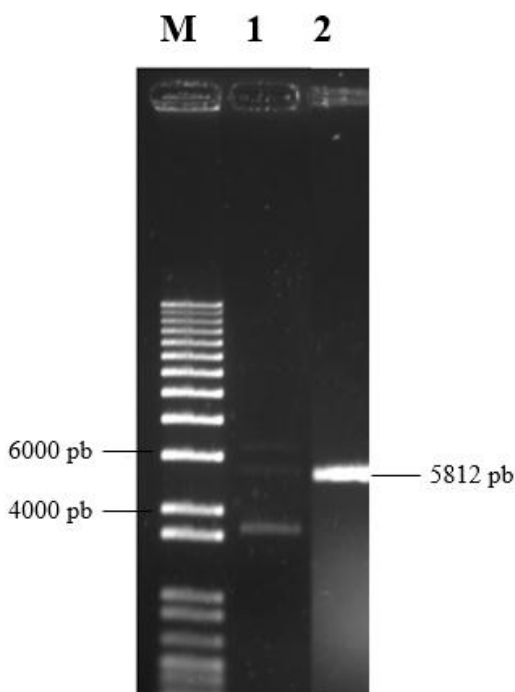
**Figura 7:** Perfil eletroforético de gel de agarose indicando a extração do DNA metagenômico. M: marcador molecular; 1 a 6: amostras de DNA metagenômico. A quantidade de DNA extraído para as amostras 1, 2, 3, 4, 5, e 6, foram respectivamente de 10  $\mu$ L, 5  $\mu$ L, 2,5  $\mu$ L, 2  $\mu$ L, 1  $\mu$ L e 0,5  $\mu$ L

A clivagem do DNA metagenômico ocorreu de acordo com o protocolo descrito. A quebra mecânica do material genético foi necessária para escolha do tamanho dos insertos a serem utilizados no vetor de clonagem (Figura 8).



**Figura 8:** Perfil eletroforético em gel de agarose do DNA metagenômico clivado. M: marcador molecular; 1 e 2: DNA clivado com aproximadamente 300 e 150  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente

Após a clivagem do DNA, foi realizada a reação de reparo das extremidades do DNA metagenômico, para que este pudesse ser ligado ao vetor (Figura 9). A combinação das enzimas T4 DNA polimerase e T4 polinucleotídeo quinase possibilitou o preenchimento das sequências terminais geradas por *smal*. Através da incorporação de nucleotídeos complementares livres, o inserto pôde tornar-se complementar ao vetor cosmídeo linearizado devido a suas extremidades cegas.



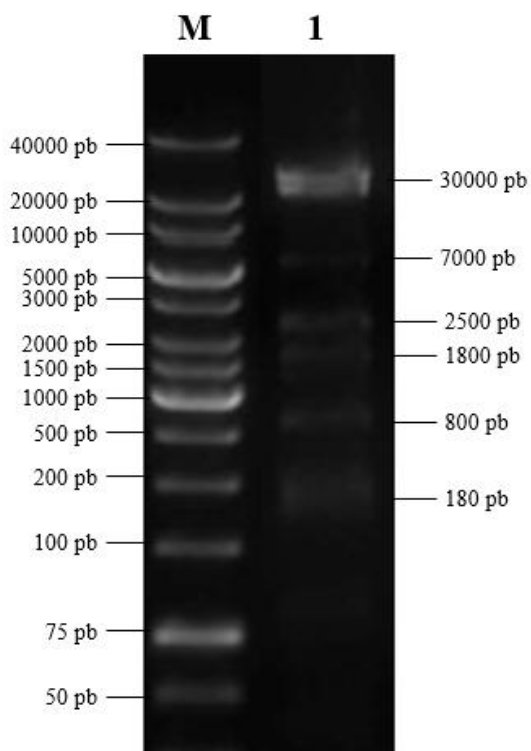
**Figura 9:** Perfil eletroforético em gel de agarose do vetor pWEB::TNS linearizado, com auxílio da enzima *smaI*. Foi utilizado 6 $\mu$ L do marcador de tamanho molecular 1kb “*Invitrogen High DNA Mass Ladder*”. M: marcador molecular, a coluna 1 corresponde ao vetor circular e a coluna 2 corresponde ao vetor linearizado com *smaI*

## 5.2 Construção e triagem da biblioteca metagenômica

A utilização de metagenomas tem proporcionado a identificação e composição de genes derivados de comunidades microbianas. Este recurso biotecnológico auxilia numa capacidade infinita de bioprospecção e permite a descoberta de novas enzimas capazes de catalisar reações e de serem utilizadas amplamente em processos biotecnológicos (OULAS et al., 2015).

Como já citado no item 4.3, a montagem das bibliotecas metagenômicas foram realizadas em vetor cosmídeo. A utilização deste tipo de vetor de clonagem justifica-se por ser capaz de receber grandes insertos de DNA. A capacidade de clonar grandes fragmentos de DNA metagenômico constitui um importante fator que permite o acesso a vias metabólicas possibilitando um melhor estudo do material a ser estudado (COWAN et al., 2005).

Após a reação de PCR e análises, os insertos identificados neste trabalho, variaram entre 180 e 30000 pb (Figura 10).



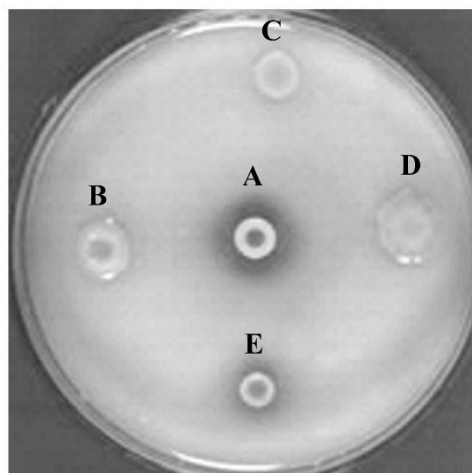
**Figura 10:** Seleção dos insertos clonados. M: marcador molecular 36 Kb “T7 control DNA” (Epicentre); 1: insertos clonados

Os cosmídeos contendo os insertos foram empacotados em fagos (células bacteriófagas) para que pudessem infectar células de *E.coli* EPI100. Após estes procedimentos, foi construída uma biblioteca contendo 50.000 clones de cosmídeos a partir de 1 ng de DNA. Esta biblioteca foi chamada de PhyRC. Os 50.000 clones foram avaliados em placas de Petri, de modo a se fazer uma seleção destes com a atividade fitásica. O teste foi realizado por meio da hidrólise do ácido fítico presente no meio de cultura.

Um clone com fenótipo compatível com atividade degradante de ácido fítico foi isolado após todos os clones da biblioteca PhyRC serem analisados (Figura 11). Este gene foi denominado fitase 1 (PhyRC001) (depositado como MG544855).

Embora a presença de atividade fitásica possa ser encontrada em diversos microrganismos, a bactéria *Bacillus subtilis* tem sido amplamente estudada nestes casos e tem se tornado organismo modelo devido ao seu grande potencial para hidrolisar fitato (TSUJI et al., 2015). Para tal, *B. subtilis* foi utilizada neste trabalho como controle positivo para comparação e detecção de tal atividade.





**Figura 11:** Clonagem de um novo gene de fitase a partir de compostagem de arroz vermelho e torta de mamona utilizando uma abordagem metagenômica funcional. A: controle positivo (*Bacillus subtilis*); B, C e D: clones com atividade fitásica negativa; E: clone com atividade fitásica positiva

O principal objetivo da triagem funcional é a detecção rápida e eficiente da reação de hidrólise, demonstrando funções (THOMAS et al., 2012) e posterior identificação dos clones positivos para a atividade testada. Embora a expressão heteróloga em algumas linhagens de *E. coli* possa limitar a atividade enzimática, a utilização desta bactéria para identificação de novas enzimas em restos culturais de arroz tem sido bem-sucedida (MENESES et al., 2016).

### 5.3 Análise da sequência dos genes clonados

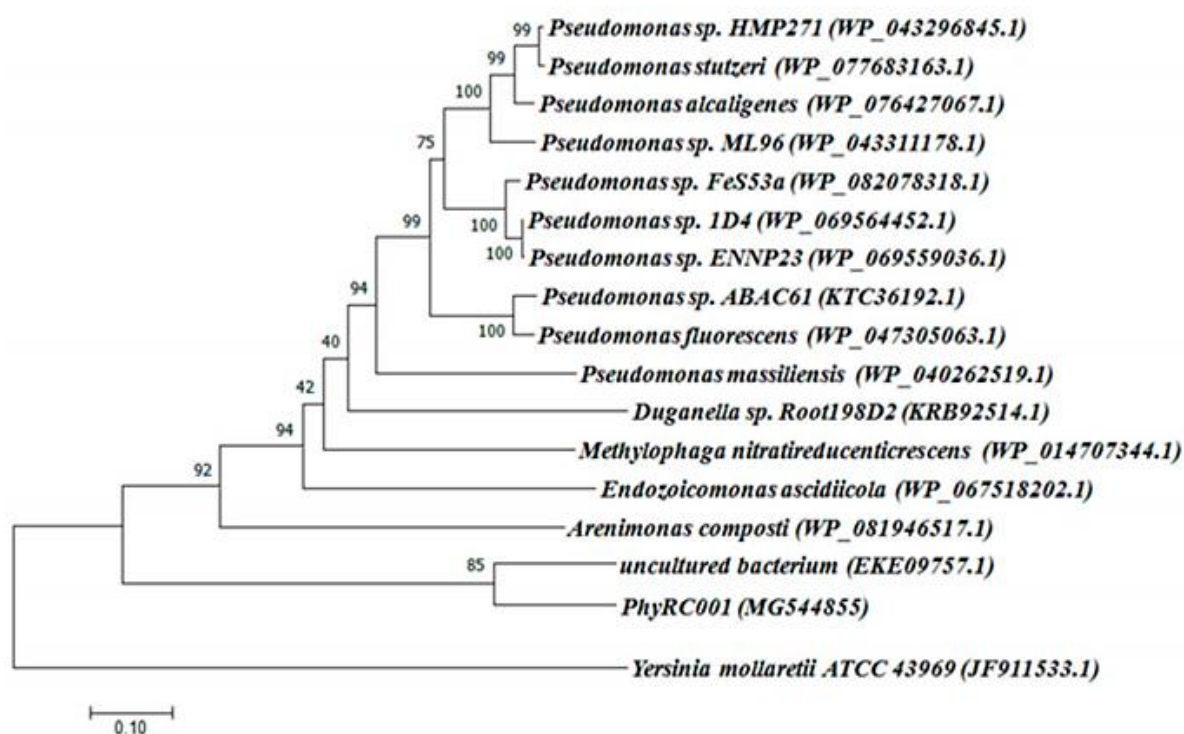
A sequência de DNA metagenômica completa inserida no vetor cosmídio foi determinada completamente por sequenciamento do fragmento de PhyRC001. O tamanho do fragmento de DNA inserido foi de 1450 pb. As análises por alinhamento no BLAST revelou a presença de uma leitura aberta (ORF) de 1200 pb, na inserção que codifica um gene para uma fitase (PhyRC001).

A massa molecular de uma fitase pode variar em uma ampla gama de tamanhos. Por isto, o gene PhyRC001 foi submetido ao GenBank (MG544855) e constatou-se que este codifica uma proteína de 400 aminoácidos e massa molecular de 45,12 kDa. O tamanho mensurado para PhyRC001 é consistente com o tamanho das proteínas encontradas neste grupo que variam de 38 a 500 kDa (QUAN et al., 2002).

A dedução da cadeia de aminoácidos de PhyRC001 foi verificada através de uma análise pelo BLASTp no banco de dados do NCBI, pelo pFAM, SignallP 4.0 e SwissProt. Esta pesquisa

revelou que PhyRC001 pertence à família das fitases  $\beta$ -hélice e apresenta identidade de 60% em relação a uma fitase de uma espécie não cultivável e de 28% para uma 3-fitase de *Arenimonas composti*.

Uma árvore filogenética foi construída baseada nas sequências de aminoácidos para verificar a relação evolutiva de PhyRC001 com outras fitases conhecidas. Para isto, foram selecionadas 15 fitases conhecidas, incluindo 13 a partir de *Arenimonas*. Após a análise, verificamos que PhyRC001 não está intimamente relacionada com quaisquer outros membros da família das fitases, sugerindo que PhyRC001 é uma nova fitase (Figura 14).



**Figura 12:** Classificação de PhyRC001 por análise de nucleotídeos e aminoácidos. As sequências de aminoácidos das fitases, incluindo PhyRC001, foram comparadas e analisadas filogeneticamente utilizando o método de *Neighbor-Joining*. Os números de acesso do GenBank estão entre parênteses

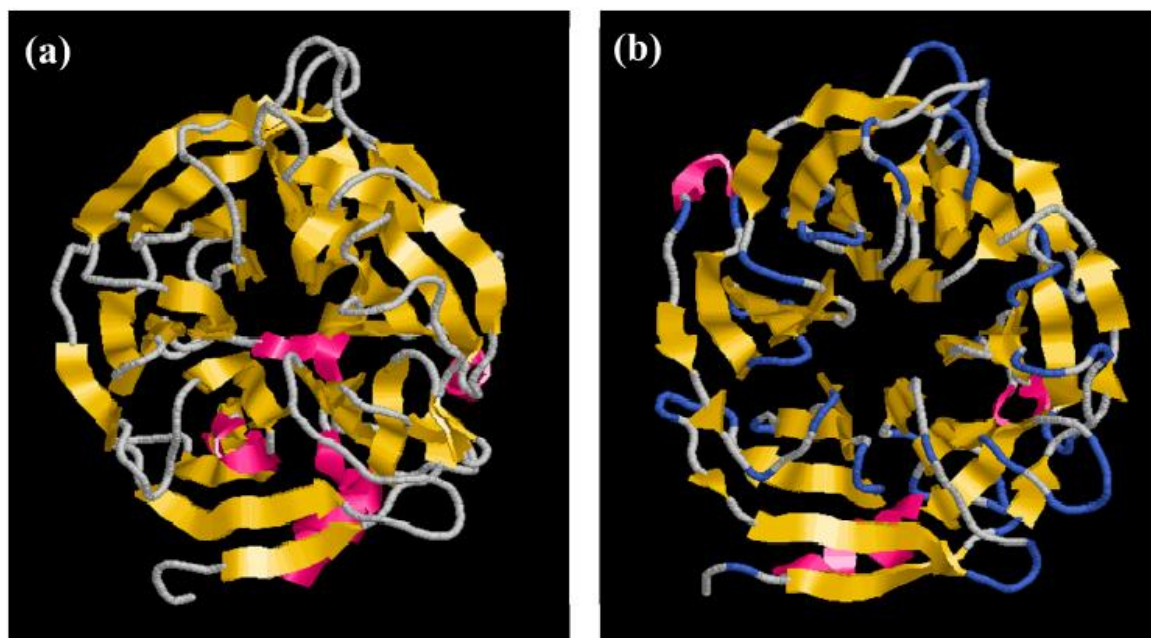
Como ponto de comparação entre PhyRC001, classificada como fitase  $\beta$ -hélice, a sequência de um microrganismo produtor de uma fitase HAP, *Yersinia mollaretii* ATCC 43969 (JF911533.1), foi utilizada como “outgroup”. A utilização de “outgroups” em estudos

filogenéticos é importante para a compreensão das relações evolutivas do conjunto de dados analisados (FARRIS, 1982).

#### 5.4 Modelagem da proteína PhyRC001

A estrutura inicial obtida para PhyRC0001 foi obtida pela modelagem comparativa/homologia, realizada com o programa MODELLER 9.13. Cada unidade assimétrica da célula unitária da estrutura contém um monômero de fitase. O modelo estudado contém uma cadeia de polipeptídico contínuo iniciando no resíduo 4 e terminando no resíduo 376. PhyRC001 compartilha uma identidade de sequência de 37% com a de *Bacillus subtilis* (Figura 13a).

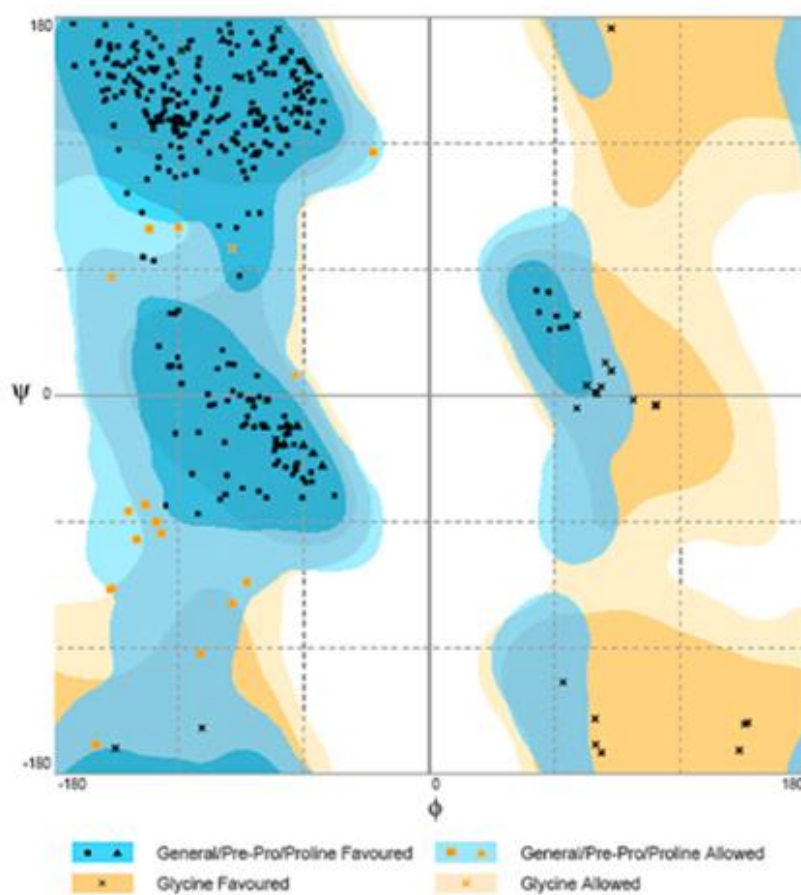
O modelo formado para PhyRC001, assim como o modelo da fitase *B. Subtilis*, apresentam uma fitase  $\beta$ -hélice composta por cinco folhas  $\beta$  antiparalelas de quatro cadeias e uma de cinco cadeias. No motivo da folha  $\beta$  de PhyRC001, o sítio ativo da enzima é frequentemente encontrado na fenda formada no centro da hélice por *loops* que conectam os sucessivos motivos de cinco folhas (Figura 13b).



**Figura 23:** Modelagem por homologia da enzima fitase PhyRC001. (a) Modelo da fitase pertencente a *B. Subtilis* (3AMR, cadeia A) e (b) modelo da fitase PhyRC001.

A adequação do modelo gerado foi avaliada utilizando os parâmetros estereo químicos gerais utilizando o PROCHECK. O eixo x do gráfico Ramachandran corresponde aos ângulos

Phi e o eixo y representa ângulos Psi. As parcelas dividem-se em quatro quadrantes que incluem região de baixa energia, região permitida, região genericamente permitida e região não permitida. A fitase identificada apresentou 81,1% dos resíduos na região mais favorável, 14,9% na região de maior permissão, 2,5% na região genericamente permitida e 1,5% na região não permitida (Figura 14).



**Figura 14:** Gráfico de Ramachandran para PhyRC001 obtido pelo PROCHECK

## 6. CONCLUSÃO

- A abordagem funcional para rastrear enzimas utilizando uma biblioteca metagenômica construída a partir de DNA isolado de restos culturais de arroz vermelho e torta de mamona foi eficiente;
- Houve sucesso no isolamento e caracterização de genes envolvidos na hidrólise do fitato;
- A enzima identificada, PhyRC001, está diretamente relacionada a família das fitases  $\beta$ -hélice;
- Estas características fazem de PhyRC001 uma forte candidata para utilização em diversos processos biotecnológicos, tais como, redução de gastos na dieta animal e aplicação no solo para maximização do desenvolvimento vegetal.

## 7. REFERÊNCIAS

- ALORI, E. T.; GLICK, B. R.; BABALOLA, O. O. Microbial phosphorus solubilization and its potencial for use sustainable agriculture. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 971, p. 1-6, 2017.
- ALORI, E.; FAWOLE, O.; AFOLAYAN, A. Characterization of arbuscular mycorrhizal spores isolated from Southern Guinea Savanna of Nigeria. **Journal of Agricultural Science**, v. 4, n. 7, p. 13-19, 2012.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 15, p. 403-410, 1990.
- ANASTASSIADIS, S. G. Carbon sources for biomass, food, fossils, biofuels and biotechnology - Review article. **World Journal Of Biology and Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 1-32, 2016.
- AYOAMA, H.; SIVA, T. M. A.; MIRANDA, A. A.; FERREIRA, C. V. Proteínas tirosinas fosfatases: propriedades e funções biológicas. *Química Nova*, v. 26, n. 6, p. 896-900, 2003.
- BEHERA, B. C.; YADAV, H.; SINGH, S. K.; MISHRA, R. R.; SETHI, B. K.; DUTTA, S. K.; THATOI, H. N. Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of *Serratia* sp. isolated from mangrove soil of Mahanadi river delta, Odisha, India. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 169-178, 2017.
- BEHERA, B. C.; SINGDEVSACHAN, S. K.; MISHRA, R. R.; DUTTA, S. K.; THATOI, H. N. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove – a review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 97-110, 2014.
- BENEVIDES, C. M. J.; SOUZA, M. V.; SOUZA, R. D. B.; LOPES, M. V. Fatores antinutricionais em alimentos: revisão. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 18, n. 2, p. 67-79, 2011.
- BERTICELLI, R.; DECESARO, A.; MAGRO, F.; COLLA, L. M. Compostagem como alternativa de biorremediação de áreas contaminadas. **Revista CIATEC**, v. 8, n. 1, p. 12-28, 2016.
- BOERS, H. M.; HOORN, J. S.; MELA, D. J. A systematic review of the influence of rice characteristics and processing methods on postprandial glycaemic and insulinaemic responses. **British Journal of Nutrition**, v. 114, n. 7, p. 1035-1045, 2015.

BOHN, L.; MEYER, A. S.; RASMUSSEN, S. K. Phytate: impacto on environment and human nutrition: a challenge for molecular breeding. **Journal Zhejiang University Science B**, v. 9, n. 3, p. 165-191, 2008.

BRAGG, L.; TYSON, G. W. Metagenomics us next-generation sequencing. **Methods in Molecular Biology**, v. 1096, p. 183-201, 2014.

BRINDRABAN, P.S.; DIMKPA, C. O.; NAGARAJAN, L.; ROY, A.; RABBINGE, R. Revisiting fertilisers and fertilisation strategies for improved nutrient uptake by plants. **Biology and Fertility of Soils**, n. 51, v. 8, p. 897-911, 2015.

BROSSI, M. J. L.; MENDES, L. W.; GERMANO, M. G.; LIMA, A. B.; TSAI, S. M. Assesment of bacterial *bph* gene in Amazonian Dark Earth and their adjacente soils. **PLOS One**, v. 9, p. 1-12, 2014.

BUCHHOLZ, K.; COLLINS, J. The roots – a short history of industrial microbiology and biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 9, p. 3747-3762, 2013.

CÁRDENAS, J. P.; QUATRINI, R.; HOLMES, D. S. Genomic and metagenomic challenges and opportunities for bioleaching: a mini-reviwe. **Research in Microbiology**, v. 167, n. 7, p. 529-538, 2016.

CASTRO, E. M.; BRESEGHELLO, F.; RANGEL, P. H. N., MORAIS, O. P. Arroz. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. 2ª edição, Viçosa, MG: UFV, p. 103-140, 2005.

CAMPOS, E. S. C.; SANTOS, V. M. L. Estudo do processo de extração de óleo de mamona em cooperativas do pólo São Francisco. **Engevista**, v. 17, n. 4, p. 477-490, 2015.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, safra 2015/2016, v. 3, n. 10, 2016. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16\\_07\\_29\\_15\\_12\\_51\\_boletim\\_graos\\_julho\\_2016.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_07_29_15_12_51_boletim_graos_julho_2016.pdf)>. Acessado em: Outubro de 2016.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, safra 2016/2017, v. 4, n. 10, 2017. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17\\_07\\_12\\_11\\_17\\_01\\_boletim\\_graos\\_julho\\_2017.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_07_12_11_17_01_boletim_graos_julho_2017.pdf)>. Acessado em: Agosto de 2017.

COSTA, F. X.; BELTRÃO, N. E. M.; SILVA, F. E. A.; MELO FILHO, J. S.; SILVA, M. A. Disponibilidade de nutrientes no solo em função de doses de matéria orgânica no plantio da mamona. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.5, n.3, p. 204-212, 2010.

COSTA, F.X.; SEVERINO, L.S. BELTRÃO, N.E.M.; FREIRE, R.M.M.; LUCENA, A.M.A.; GUIMARÃES, M.M.B. Composição química da torta de mamona. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 1., 2004, Campina Grande. Energia e sustentabilidade, **Anais**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2004.

COSTA, M. N.; PEREIRA, E. W.; BRUNO, R. L. A.; FREIRA, C. E.; NÓBREGA M. B. M.; MILANI, M.; OLIVEIRA, A. P. Divergência genética entre acessos e cultivares de mamoneira

por meio de estatística multivariada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n.11, p. 1617-1622, 2006.

COWAN, D.; MEYER, Q.; STAFFORD, W.; NYANGA, S.; CAMERON, R.; WITWER, P. Metagenomic gene discovery: past, present and future. **Trends in Biotechnology**, n. 23, p. 321-329, 2005.

D'ALMEIDA, M. L. O.; VILHENA, A. **Lixo municipal: Manual de Gerenciamento Integrado**. 2. ed. São Paulo: IPT/CEMPRE, 2000.

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

DUDANEIC, R. Y.; TESSON, S. V. M. Applying landscape genetics to the microbial world. **Molecular Ecology**, v. 25, n. 14, p. 3266-3275, 2016.

ESCOBAR-ZEPEDA, A.; LEÓN, A. V. P.; SANCHEZ-FLORES, A. The road to metagenomics: from microbiology to DNA sequencing technologies and bioinformatics. **Frontiers in Genetics**, v. 6, n. 328, p. 1-15, 2015.

FARRIS, J. S. Outgroups and Parsimony. **Systematic Biology**, v. 31, n. 3, 328-334, 1982.

FREITAS, G. A. Produção e área colhida de arroz no Nordeste. **Banco do Nordeste**. Ano IV, n. 23, p. 1-8, 2010.

GOMES, E. S.; SCHUCH, V.; GERTRUDES, E.; LEMOS, M. Biotechnology of polyketides: new breath of life for the novel antibiotic genetic pathways Discovery through metagenomics. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1007-1034, 2013.

GUIMARÃES, L. H. S.; PEIXOTO-NOUGUEIRA, S. C.; MICHELIN, M.; RIZZATI, A. C. S.; SANDRIM, V. C.; ZANOELO, F. F.; AQUINO, A. C. M. M.; JUNIOR, A. B.; POLIZELI, M. L. T. M. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 474-480, 2006.

GUIMARÃES, L. H. S.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A.; LEONE, F. A.; POLIZELI, M. L. T. M. Characterization and properties of acid phosphatases with phytase activity produced by *Aspergillus caespitosus*. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 201-207, 2004.

HENNE, A.; SCHMITZ, R. A.; BOMEKE, M.; GOTTSCHALK, G.; DANIEL, R. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 3113-3116, 2000.

HOLMES, D. S.; QUIGLEY, M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids, **Analytical Biochemistry**, v. 114, n. 1, p. 193-197, 1981.

JÚNIOR, V. R.; RIBEIRO, C. L. N.; MESSIAS, R. K. G.; ROCHA, T. C. Importância da enzima fitase na nutrição animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 12, n. 4, p. 4127-4139, 2015.

JURADO, M.; LÓPEZ, M. J.; SUÁREZ-ESTRELLA, F.; VARGAS-GARCÍA, M. C.; LÓPEZ-GONZÁLEZ, J. A.; MORENO, J. Exploiting composting biodiversity: study of the persistent



and biotechnologically relevant microorganisms from lignocellulose-based composting. **Bioresource Technology**, v. 162, p. 283-293, 2014.

KALOGIANNIS, K. G.; STFANIDIS, S. D.; MATHAILOF, C. M.; LAPPAS, A. A. Castor bean cake residues upgrading towards high added value products via fast catalytic pyrolysis. **Biomass & Bioenergy**, v. 95, p. 405-415, 2016.

KAPRI, A.; TEWARI, L. Phosphate Solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma spp.* **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 1517-8382, 2010.

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

KELLOGG, E. A. The Evolutionary History of Ehrhartoideae, Oryzeae, and *Oryza*. **Rice**, v. 2, n. 1, p. 1-14, 2009.

KOTROCZÓ, Z.; VERES, Z.; FEKETE, I.; KRAKOMPERGER, Z.; TÓTH, J. A.; LAJTHA, K.; TÓTHMÉRÉSZ, B. Soil enzyme activity in response to long-term organic matter manipulation. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 70, p. 237-243, 2014.

KOUZUMA, A.; WATANABE, K. Microbial ecology pushes frontiers in biotechnology. **Microbes and Environments**, v. 29, n. 1, p. 1-3, 2014.

KUMAR, V.; SINHA, A. K.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: a review. **Food Chemistry**, v. 120, n. 4, p. 945-959, 2010.

LASKOWSKI, R.A.; MACARTHUR, M.W.; MOSS, D.S.; THORNTON, J.M. PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, p. 283-291, 1993.

LÓPEZ-ORTEGA, M. P.; CRIOLLO-CAMPOS, P. J.; GÓMEZ-VARGAS, R. M.; CAMELO-RUSINQUE, M.; ESTRADA-BONILLA, G.; GARRIDO-RUBIANO, M. F.; BONILLA-BUITRAGO, R. Characterization of diazotrophic phosphate solubilizing bacteria as growth promoters of maize plants. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 15, n. 2, p. 115-123, 2013.

LUCIANO, C. S.; NEWELL, S. J. Effects of prey, pitcher age, and microbes on acid phosphatase activity in fluid from pitchers of *Sarracenia purpurea* (Sarraceniaceae). **PlosOne**, v. 12, n. 7, p. 1-17, 2017.

LYND, L. R.; LASER, M. S.; BRANSBY, D.; DALE, B. E.; DAVISON, B.; HAMILTON, R.; HIMMEL, M.; KELLER, M.; MCMILLAN, J. D.; SHEEHAN, J.; WYMAN, C. E. How biotech can transform biofuels. **Nature Biotechnology**, v. 26, p. 169-172, 2008.

MÉNDEZ-GARCÍA, C.; PELÁEZ, A.I.; MESA, V.; SÁNCHEZ, J.; GOLYSHINA, O.V.; FERRER, M. Microbial diversity and metabolic networks in acid mine drainage habitats. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 475, 2015.

MENESES, C.; SILVA, B.; MEDEIROS, B.; SERRATO, R.; JOHNSTON-MONJE, D. A metagenomic advance for the cloning and characterization of a cellulase from red rice crop residues. **Molecules**, v. 21, n. 7, 2016.

- MENEZES, B. R. S.; MOREIRA, L. B.; LOPES, H. M.; PEREIRA, M. B. Caracterização morfoagronômica em arroz vermelho e arroz de sequeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 41, n. 4, p. 490-499, 2011.
- MONTEIRO, P. S.; GUIMARÃES, V. M.; MELO, R. R.; REZENDE, S. T. Isolation of a thermostable acid phytase from *Aspergillus niger* UFV-1 with Strong proteolysis resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 251-260, 2015.
- MULLANEY, E. J.; ULLAH, A. H. The term phytase comprises several different classes of enzymes. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v. 312, v. 1, p. 179-184, 2003.
- MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Avaliação de diferentes tipos de carvão ativo na destoxificação de hidrolisado de palha de arroz para produção de xilitol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n.1, p.94-100, 2004.
- NAZIR, A. Review on metagenomics and its applications. **Imperial Journal of Interdisciplinary Research**, v. 2, n. 3, p. 277-286, 2016.
- OFAIM, S.; OFEK-LALZAR, M.; SELA, N.; JINAG, J.; KASHI, Y.; MINZ, D. Analysis of microbial functions in the rhizosphere using a metabolic-network based framework for metagenomics interpretation. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 1606, p. 1-14, 2017.
- OLIVEIRA FILHO, A. F.; OLIVEIRA, F. A.; MEDEIROS, J. F.; MESQUITA, T. O.; ZONTA, E. Crescimento de cultivares de mamona sob doses de torta de mamona. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 05, p. 18-24, 2010.
- OULAS, A.; PAVLOUDI, C.; POLYMENAKOU, P.; PAVLOPOULOS, G. A.; PAPANIKOLAOU, N.; KOTOULAS, G.; ARVANITIDIS, C.; ILIOPOULOS, I. Metagenomics: tools and insights for analyzing next-generation sequencing data derived from biodiversity studies. **Bioinformatics and Biology Insights**, v. 9, p. 75-88, 2015.
- PAL-ROY, M.; MAZUMDAR, D.; DUTTA, S.; SAHA, S.P.; GHOSH, S. Cloning and expression of phytase appA gene from *Shigella* sp. CD2 in *Pichia pastoris* and comparison of properties with recombinant enzyme expressed in *E. coli*. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, 2016.
- PATEL, V.R.; DUMANCAS, G.G.; KASI VISWANATH, L.C.; MAPLES, R.; SUBONG, B.J.J. Castor oil: Properties, uses, and optimization of processing parameters in commercial production. **Lipid Insights**, v. 9, p. 1-12, 2016.
- PEÑA-GARCÍA, C.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, M.; REYES-DUARTE, D.; FERRER, M. High throughput screening of esterases, lipases and phospholipases in mutante and metagenomic libraries: a review. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 19, n. 8, p. 605-615, 2016.
- PENKUMSRI, N.; CHAIYASUT, C.; SAENJUM, C.; SIRILUN, S.; PEERAJAN, S.; SUWANNALERT, P.; SIRISATTHA, S.; SIVAMARUTHI, B. S. Physicochemical and antioxidative properties of black, brown and red rice varieties of northern Thailand. **Food Science and Technology**, v. 35, n. 2, p. 331-338, 2015.

PENHA, R. S.; SANTOS, C. C.; CARDOSO, J. J. F.; SILVA, H. A. S.; SANTANA, S. A. A.; BEZERRA, C. W. B. Casca de arroz quimicamente tratada como adsorvente de baixo custo para a remoção de íons metálicos ( $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Ni}^{2+}$ ). **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 3, p. 588-604, 2016.

PEREIRA, J. A.; MORAIS, O. P. **As variedades de arroz vermelho brasileiras**. 39 p. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2014.

PROSSER, J. I. Dispersing misconceptions and identifying opportunities for the use of ‘omics’ in soil microbial ecology. **Nature Reviews**, v. 13, n. 7, p. 439-446, 2015.

PYLRO, V. S.; ROESCH, L. F.; ORTEGA, J. M.; AMARAL, A. M.; TÓTOLA, M. R.; HIRSCH, P. R.; ROSADO, A. S.; GÓES-NETO, A.; COSTA da SILVA, A. L.; ROSA, C. A.; MORAIS, D. K.; ANDREOTE, F. D.; DUARTE, G. F.; MELO, I. S.; SELDIN, L.; LAMBAIS, M. R.; HUNGRIA, M.; PEIXOTO, R. S.; KRUGER, R. H.; TSAI, S. M.; AZEVEDO, V. Brazilian Microbiome Project: revealing the unexplored microbial diversity – challenges and prospects. **Microbial Ecology**, v. 67, n. 2, p. 237-241, 2014.

QUAN, C.S.; FAN, S. D.; ZHANG, L. H.; WANG, Y. J.; OHTA, Y. Purification and properties of a phytase from *Candida krusei* WZ-001. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, n. 5, p. 419-425, 2002.

QUINCE, C.; WALKER, A. W.; SIMPSON, J. T.; LOMAN, N. J.; SEGATA, N. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. **Nature Biotechnology**, v. 35, n. 9, p. 833-844, 2017.

RAMACHANDRAN, G.N.; SASISEKHARAN, V. Conformation of polypeptides and proteins. **Advances in Protein Chemistry**, v. 23, p. 283–437, 1968.

ROBE, P.; NALIN, R.; CAPELLANO, C.; VOGEL, T. M.; SIMONET, P. Extraction of DNA from soil. **European Journal of Soil Biology**, v. 39, p. 183-190, 2003.

ŠALI, A.; BLUNDELL, T.L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **Journal of Molecular Biology**, v. 234, n. 3, p. 779–815, 1993.

SÁNCHEZ, O. J.; OSPINA, D. A.; MONTOYA, S. Compost supplementation with nutrients and microorganisms in composting process. **Waste Management**, v. 69, p. 136-153, 2017.

SÁNCHEZ-GARCÍA, M.; ALBUQUERQUE, J. A.; SÁNCHEZ-MONEDERO, AM. A.; ROIG, A.; CAYUELA, M. L. Biochar accelerates organic matter degradation and enhances N mineralisation during composting of poultry manure without a relevant impact on gas emissions. **Bioresource Technology**, v. 192, p. 272-279, 2015.

SATO, V. S.; JORGE, J. A.; OLIVEIRA, W. P.; SOUZA, C. R. F.; GUIMARÃES, L. H. S. Phytase production by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* biofilm: characterization of enzymatic activity after spray drying in presence of carbohydrates and nonconventional adjuvants. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 177-187, 2014.

SAYLE, R.A.; MILNER-WHITE, E.J. RasMol: Biomolecular graphics for all. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 20, n. 9, p. 374–376, 1995.

- SCHENBERG, A. C. G. Biotechnology and sustainable development. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 7-17, 2010.
- SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN J. Biotechnological prospects from metagenomics. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 303-310, 2003.
- SESHACHALA, U.; TALLAPRAGADA, P. Phosphate solubilizers from the rhizosphere of *Piper nigrum* L. in Karnataka, India. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 72, n. 3, p. 397-403, 2012.
- SEVERINO, L. S.; COSTA, F. X.; BELTRÃO, N. E. M., Mineralização da torta de mamona, esterco bovino e bagaço de cana estimada pela respiração microbiana. **Revista Biologia e Ciências da Terra**, v. 5, n. 1, 2004.
- SHARMA, S. B.; SAYYED, R. Z.; TRIVEDI, M. H.; GOBI, T. A. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 587, 2013.
- SHARMA, S.; KUMAR, V.; TRIPATHI, R. B. Isolation of phosphate solubilizing microorganism (PSMs) from soil. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 1, n. 2, p. 90-95, 2011.
- SILVA, A. N.; ROMANELLI, T. L.; REICHARDT, K. Energy flow in castor bean (*Ricinus communis* L.) production systems. **Scientia Agricola**, v. 67, n. 6, p. 737-742, 2010.
- SILVA, S. D.; PRESOTTO, R. A.; MAROTA, H. B.; ZONTA, E. Uso de torta de mamona como fertilizante orgânico. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 42, n. 1, p. 19-27, 2012.
- SIMON, C.; DANIEL, R. Metagenomic analyses: past and future trends. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 4, p. 1153-1161, 2011.
- STEPHEN, J.; SHABANAMOL, S.; RISHAD, K. S.; JISHA, M. S. Growth enhancement of rice (*Oryza sativa*) by phosphate solubilizing *Gluconacetobacter* sp. (MTCC 8368) and *Burkholderia* sp. (MT 8369) under greenhouse conditions. **3 Biotech**, v. 5, n. 5, p. 831-837, 2015.
- SUENAGA, H. Targeted metagenomics unveils the molecular basis for adaptive evolution of enzymes to their environment. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 1018, 2015.
- 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.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.30, n. 12, p. 2725–2729, 2013.
- THIMMIS, K.; de VOS, W. M.; RAMOS, J. L.; VLAEMINCK, S. E.; PRIETO, A.; DANCHIN, A.; VERSTRAETE, W.; LORENZO, V.; LEE, S. Y.; BRÜSSOW, H.; TIMMIS, J. K.; SINGH, B. K. The contribution of microbial biotechnology to sustainable development goals. **Microbial biotechnology**, v. 10, n. 5, p. 984-987, 2017.

THOMAS, T.; GILBERT, J.; MEYER, F. Metagenomics –a guide from sampling to data analysis. **Microbial Informatics and Experimentation**, v. 2, n. 3, p. 1-12, 2012.

TSUJI S.; TANAKA, K.; TAKENAKA, S.; YOSHIDA, K. Enhanced secretion of natto phytase by *Bacillus subtilis*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 79, n. 11, p. 1906-1914, 2015.

UNNO, Y. OKUBO, K.; WASAKI, J.; SHINANO, T.; OSAKI, M. Plant growth promotion abilities and microscale bacterial dynamics in the rhizosphere of Lupin analysed by phytate utilization ability, **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 396-404, 2005.

VAUGHAN, D. A. The wild relatives of rice: a genetic resources handbook. **International Rice Research Institute**: Manila, p. 137, 1994.

VIJAYARAGHAVAN, P.; PRIMIYA, R. R.; VINCENT, S. G. P. Thermostable alkaline phytase from *Alcaligenes* sp. in improving bioavailability of phosphorus in animal feed: *in vitro* analysis, **ISRN Biotechnology**, v. 2013, p. 1-6, 2013.

VOGEL, C.; RIVARD, C.; WILKEN, V.; MUSKOLUS, A.; ADAM, C. Performance of secondary P-fertilizers in pot experiments analyzed by phosphorus X-ray absorption near-edge structure (XANES) spectroscopy. **Ambio**, v. 47, p. 62-72, 2018.

WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; AVILA, L. A. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, v. 38, n. 4, p. 1184-1192, 2008.

WEI, Y. S.; FAN, Y. B.; WANG, M. J.; WANG, J. S. Composting at compost application in China. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 30, p. 277-300, 2000.

WÉRY, N. Bioaerosols from composting facilities – a review. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, n. 42, p. 1-9, 2014.

WHITELAW, M. A. Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. **Advances in Agronomy**, v. 69, p. 99-151, 2000.

YAO, M. Z.; ZHANG, Y. H.; LU, W. L.; HU, M. Q.; WANG, W.; LIANG, A. H. Phytases: Crystal structures, protein engineering and potential biotechnological applications. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, n. 1, 12 p., 2011.

YU, Z.; ZENG, G.M.; CHEN, Y.N.; ZHANG, J.C.; YU, Y.; LI, H. Effects of inoculation with *Phanerochaete chrysosporium* on remediation of pentachlorophenol contaminated soil waste by composting. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 6, p. 1285–1291, 2011.

ZENG, Y.F.; KO, T.P.; LAI, H.L.; CHENG, Y.S.; WU, T.H.; MA, Y.; CHEN, C.C.; YANG, C.S.; CHENG, K.J.; HUANG, C.H.; GUO, R. T.; LIU, J. R. Crystal structures of *Bacillus* alkaline phytase in complex with divalent metal ions and inositol hexasulfate. **Journal of Molecular Biology**, v. 409, n. 2, p. 214–224, 2011.

ZHANG, G. Q.; WU, Y. Y.; NG, T. B.; CHEN, Q. J.; WANG, H. X. A phytase characterized by relatively high pH tolerance and thermostability from the shiitake mushroom *Lentinus edodes*. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-7, 2013.

ZHOU, J.; BRUNS, M. A.; TIEDJE, J. M. DNA recovery from soils of diverse composition. **Applied Environmental in Microbiology**, v. 62, p. 316-322, 1996.

ZHU, F.; QU, L.; HONG, X.; SUN, X. Isolation and characterization of a phosphate-solubilizing halophilic bacterium *Kushneria* sp. YCWA18 from Daqiao Saltern of the Coast of Yellow Sea of China. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 8, n. 1, p. 1-6, 2011.

## **ANEXO**

Artigo referente a dissertação publicado na revista *Molecules* com fator de impacto 2,861.

Article

# New Bacterial Phytase through Metagenomic Prospection

Nathália Farias <sup>1</sup>, Isabela Almeida <sup>2</sup>  and Carlos Meneses <sup>3,\*</sup> 

<sup>1</sup> Graduate Program in Agricultural Sciences, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campina Grande/PB 58429-500, Brazil; nathalyacfarias@gmail.com

<sup>2</sup> Department of Biology, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campina Grande/PB 58429-500, Brazil; isabelaalmeida42@outlook.com

<sup>3</sup> Department of Biology and Graduate Program in Agricultural Sciences, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campina Grande/PB 58429-500, Brazil

\* Correspondence: chmeneses@gmail.com; Tel.: +55-83-3315-3362

Received: 23 January 2018; Accepted: 15 February 2018; Published: 17 February 2018

**Abstract:** Alkaline phytases from uncultured microorganisms, which hydrolyze phytate to less phosphorylated myo-inositols and inorganic phosphate, have great potential as additives in agricultural industry. The development of metagenomics has stemmed from the ineluctable evidence that as-yet-uncultured microorganisms represent the vast majority of organisms in most environments on earth. In this study, a gene encoding a phytase was cloned from red rice crop residues and castor bean cake using a metagenomics strategy. The amino acid identity between this gene and its closest published counterparts is lower than 60%. The phytase was named PhyRC001 and was biochemically characterized. This recombinant protein showed activity on sodium phytate, indicating that PhyRC001 is a hydrolase enzyme. The enzymatic activity was optimal at a pH of 7.0 and at a temperature of 35 °C.  $\beta$ -propeller phytases possess great potential as feed additives because they are the only type of phytase with high activity at neutral pH. Therefore, to explore and exploit the underlying mechanism for  $\beta$ -propeller phytase functions could be of great benefit to biotechnology.

**Keywords:** crop residues; functional metagenomics; phytasic activity

## 1. Introduction

The nutritional requirements of plants, considering a mineral balance that provides the maximum performance at lower cost, have been examined in recent studies [1]. Among minerals, phosphorus (P) stands out for its participation in many functions during plant development and its high cost in phosphorus fertilization supplementation [1,2]. The lack of this mineral in the soil is due to the fact that it has limited diffusion in most soils, where its ions are highly reactive with numerous soil constituents [3] and the plants use this nutrient almost exclusively in the form of phosphate anions, mainly  $\text{HPO}_4^{-2}$  and  $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$  [4].

Organic phosphorus (Po) represents up to 80% of the total P present in soils, 50% of which occurs in the form of phytate (Na-IHP). This form of Po appears to be used only slightly by plants [5]. Phytate hydrolysis is mediated specifically by phytase, whose contribution to plant nutrition has been poorly explored. It is known that the environment presents a high level of microbial biological diversity; however, only a small part of this is known [6]. Some of these microorganisms are responsible for directing the main biogeochemical cycles and therefore perform ecological functions that make them indispensable, for example through their participation in phytate hydrolysis [2].

With the development of pure culture techniques, microorganisms could be studied individually and characterized, mainly, based on nutritional criteria. However, the use of that approach limits the taxonomic and phylogenetic evaluations of some organisms, since the cultivated ones represent



only a small fraction of the diversity of species in microbial communities [7]. From this perspective, metagenomics appears as the best prospecting tool to revolutionize the field of biotechnology, allowing high resolution description of complex bacterial communities in their natural environments [8,9].

Bacteria and fungi are the main sources of phytases for biotechnology [1], and most of the earth's microorganisms are not yet cultivable using traditional techniques [10]. Therefore, isolating genes from uncultured microorganisms is an attractive target for functional metagenomics [11]. This approach has already been used to clone and characterize phosphatases and phytases [12]. However, there is still a great diversity of microbial phytases unexplored in many environments and species that have not been studied.

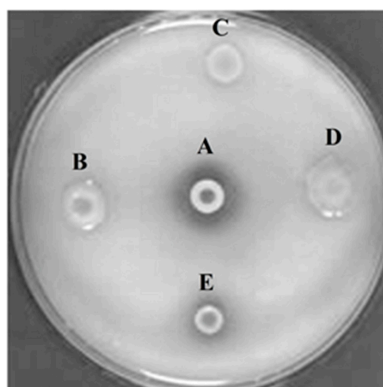
While rice is a great source of soil carbon, castor bean is an organic fertilizer rich in nitrogen that has been widely used in agriculture and has great potential to provide raw material for biodiesel production [13,14]. This product originates from castor oil obtained from the castor oil plant, showing a gradual release of nutritional compounds, aiding in soil improvement [14]. A metagenomic approach to these decomposing materials seems to be a great opportunity to explore a microenvironment that is favorable for the genetic diversity of microorganisms and more likely to contain genes encoding phytases.

In this study, we applied functional metagenomics as a tool to identify a gene that encodes an enzyme with phytasic activity present in red rice and composted castor bean cake residues. The process involved the extraction of DNA from red rice residues and composted castor bean cake, the construction of a metagenomic library and the selection of clones capable of degrading phytate in agar plates. We identified a phytase, PhytRC001, which has similarity to other phytases of uncultured bacteria. This enzyme has been shown to be stable at a variety of temperatures and pHs, and represents a significant advance for the biotechnological degradation of phosphorus for mineral nutrition in plants.

## 2. Results

### 2.1. Construction and Screening of Environmental Genomic Libraries

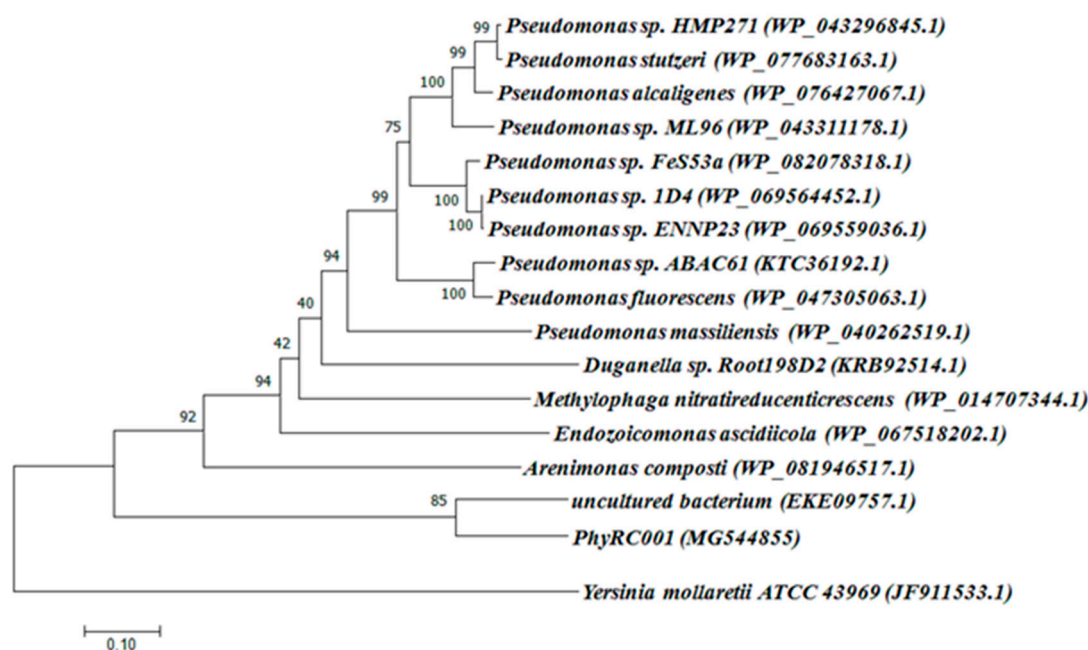
After extraction and purification of metagenomic DNA isolated from the cultural remains of red rice and castor bean cake, a cosmid library containing 50,000 cosmid clones (PhyRC library) was constructed from one nanogram of metagenomic DNA. A cleavage with the restriction endonuclease *Bam*HI in 50 randomly chosen clones of PhyRC revealed that the clones contained DNA inserts with sizes between 20 and 60 kb; the mean size of the fragments was approximately 30 kb. A cosmid clone expressing the activity of degrading Na-IHP was isolated, after all clones from the PhyRC library were analyzed for phytase activity (Figure 1). We named this gene from cultural remains of red rice and castor cake Phytase 1 (PhyRC001) (deposited as MG544855).



**Figure 1.** Screening for phytasic activity in metagenomic library using Na-IHP as substrate. A: positive control (*Bacillus subtilis*); B, C and D: clones with negative phytase activity; E: clone with positive phytase activity.

## 2.2. Sequence Analyzes of the Cloned Phytase Gene

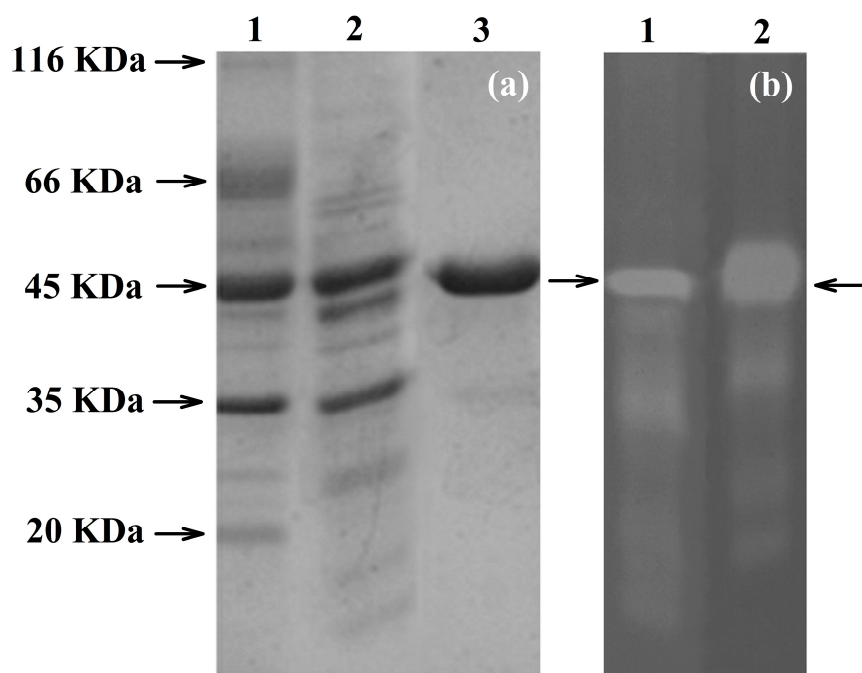
The complete metagenomic DNA sequence inserted into the cosmid vector was determined completely by sequencing the PhyRC001 fragment. Alignment analyses, performed with the help of BLAST and ORF finder, revealed the presence of a 1203 bp open reading frame encoding a phytase (PhyRC001). The sequence for PhyRC001 (MG544855) encodes a predicted protein of 400 amino acids with a predicted molecular mass of 45.12 kDa. The deduced amino acid sequence of PhyRC001 was used for a BlastP analysis at NCBI, pFAM, SignallP 4.0 and SwissProt databases. This search revealed that PhyRC001 belonged to the  $\beta$ -propeller phytase family (beta-sheet motif, the enzyme's active site is often found in the cleft formed in the center of the propeller by loops connecting the successive four-sheet motifs) and the amino acid of the gene separately shared 60% with the phytase (uncultured bacterium–EKE09757.1), and 28% with the phytase from 3-phytase (*Arenimonas composti*–WP\_081946517.1). The phylogenetic tree based on amino acid sequence was constructed to verify the evolutionary relationship of the PhyRC001 to other known phytases, and 15 phytase proteins including 10 from *Pseudomonas* were selected for the phylogenetic tree analysis. PhyRC001 is not closely related to other members of the phytase family, suggesting that it is a new member of phytase (Figure 2).



**Figure 2.** Classification of PhyRC001 based on amino acid sequence analyses. Amino acid sequences of phytases, including PhyRC001, were compared and analyzed phylogenetically using a neighbor-joining method. GenBank accession numbers are in parentheses. Phylogenetic analysis showed that PhyRC001 is closely related to phytases from an uncultured species. The histidine acid phosphatases (HAPs) phytase of *Yersinia mollaretii* ATCC 43969 (JF911533.1) was included as an outgroup.

## 2.3. Expression and Purification of the Recombinant PhyRC001

To confirm the identity of PhyRC001, we purified the recombinant protein and performed assays to detect its phytase activity. For SDS-PAGE analysis, the enzyme approximate molecular weight was estimated to be 45 kDa (Figure 3a). The recombinant protein was purified and in vitro tests were conducted using Na-IHP zymograms (native-PAGE) to observe Na-IHPase activity. The purified recombinant PhyRC001 protein (one microgram) was clearly active (Figure 3b). Native-PAGE and SDS-PAGE gels were used for the qualitative characterization of phytase activity. For Native-PAGE, the zymogram (0.1% Na-IHP in the gel) showed a translucent zone, indicating phytasic activity.



**Figure 3.** Electrophoretic analyses of PhyRC001 phytase purified from red rice crop residues and castor bean cake. (a) SDS-PAGE. 1: Molecular weight marker (kDa); 2: spin column portion of partly purified phytase (crude extract); 3: purified phytase; and (b) zymogram analysis of PhyRC001 phytase: 1: crude extract showing opaque region in native gel (arrow); 2: purified phytase showing opaque region in native gel (arrow).

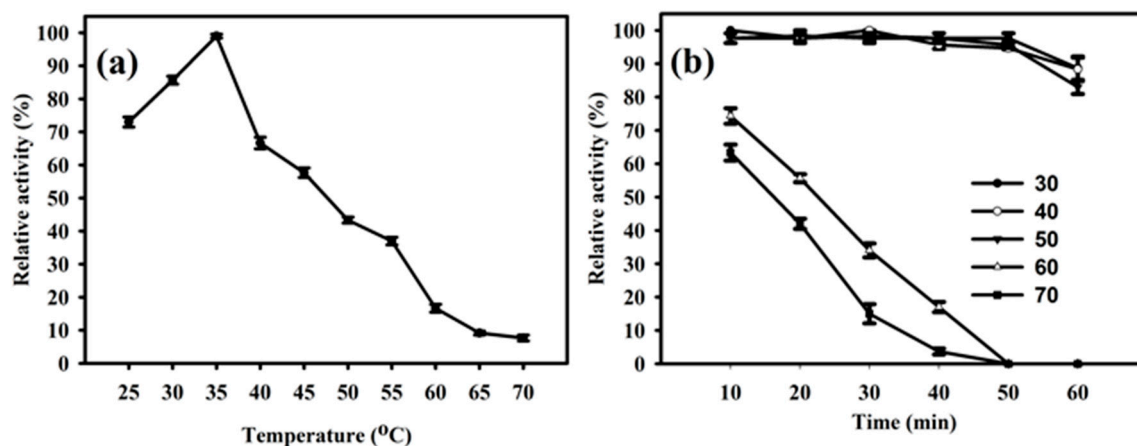
When PhyRC001 was subjected to Na-IHP zymogram, the degradation with a drag to the smaller molecular weight mass region was revealed, providing a strong indication that PhyRC001 may be formed by smaller protein subunits.

#### 2.4. Biochemical Characterization of PhyRC001

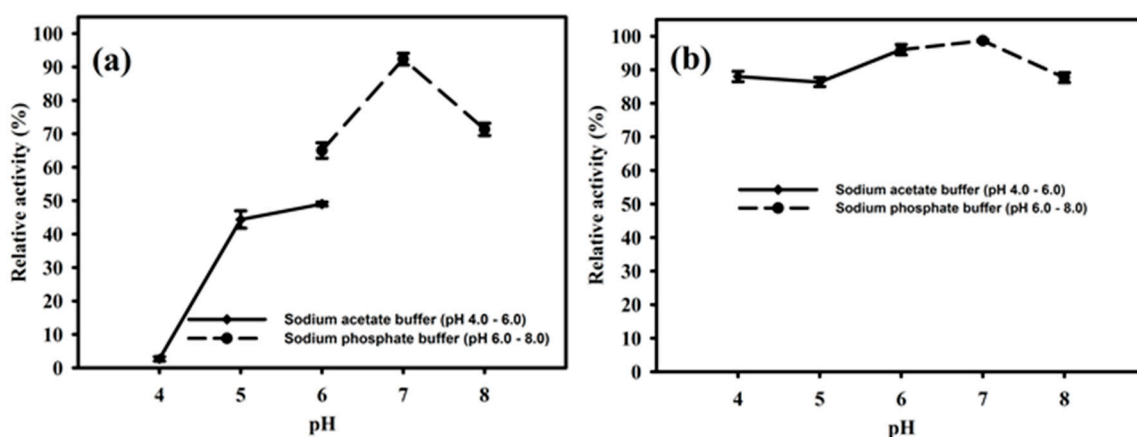
##### 2.4.1. Temperature and pH Effect on Activity of PhyRC001

The enzyme PhyRC001 showed its principal activity at temperatures between 25 to 70 °C, and the maximum activity of PhyRC001 was detected when it was incubated at 35 °C (Figure 4A). When the temperature was above 35 °C, the enzymatic activity was rapidly lost. After one hour of incubation at different temperatures, PhyRC001 retained its activity at 60 and 70 °C (Figure 4B). Cold-active enzymes are attractive because of their value in biotech applications. They are also useful tools for protein folding studies because of their high activity and stability at low temperatures [15].

The purified enzyme PhyRC001 was active at different pH values between 4.0 and 8.0. The optimal pH of the enzyme was 7.0, where it reached a maximal enzymatic activity in this condition (Figure 5A). The enzyme activity remained high when the pH ranged from 4.0 to 6.0. However, when the pH was raised to 8.0 the activity of PhyRC001 was completely lost. After 16 h incubation at 4 °C, PhyRC001 maintained its constant activity in the pH range 4.0–6.0 (Figure 5B). The pH range of the recombinant enzyme was consistent with the alkaline phytase property reported previously [16].



**Figure 4.** Effect of temperature on the activity and stability of PhyRC001. (a) Optimal temperature for PhyRC001 is 35 °C, as determined by measuring its enzymatic activity with 1% (*w/v*) Na-IHP in 50 mM sodium acetate buffer, pH 7, at 25 to 70 °C in five degree increments; and (b) thermostability was determined by measuring the enzymatic activity of PhyRC001 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 PhyRC001. (a) The optimal pH for PhyRC001 was determined by measuring the enzyme activity on 1% (*w/v*) Na-IHP in 50 mM buffers at 35 °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 PhyRC001, 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.

#### 2.4.2. Growth, Specificity and Inhibition on Activity of PhyRC001

To confirm that the product generated by PhyRC001 possesses enzymatic phytasic activity, an assay previously described by Yanke et al. [17] was performed to monitor the release of inorganic phosphate from a phytate extract by the purified protein, at a temperature of 45 °C. The assay indicated that the purified PhyRC001 protein showed a high phytasic activity based on the rate of release of inorganic phosphate ( $251 \pm 22 \mu\text{mol P/min/g}$ ). This indication revealed that the phytase activity in PhyRC001 is sharp.

The highly specific activity of PhyRC001 (Table 1) on phytic acid, and the limited activities on *para*-Nitrophenyl phosphate, glucose 1-phosphate and glucose 6-phosphate are consistent with the result of phylogenetic analysis, which actually leads to the belief that this protein is a phytase. It is interesting to note that PhyRC001 demonstrated high phytic acid-specific activity when compared to

other substrates, indicating that PhyRC001 is probably a true phytase, rather than an acid phosphatase having a contingent activity for phytic acid.

**Table 1.** Substrate specificity of PhyRC001, shown by the relative activity of PhyRC001 for different substrates.

Substrate	Relative Activity (%)
Phytic acid	100
AMP	0
ADP	0
ATP	0
GTP	0
NADP	0
para-Nitrophenyl phosphate	19
Glucose 1-phosphate	1
Glucose 6-phosphate	1

The activity for each tested substrate was determined at pH 7.0, 35 °C, and is expressed as a percentage (average of three replicates) of the activity level for phytic acid. AMP: Adenosine monophosphate; ADP: Adenosine diphosphate; ATP: Adenosine triphosphate; GTP: Guanosine-5'-triphosphate; NADP: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate.

Phytase activity was also verified as a function of the presence of metal ions in the reaction media for the PhyRC001 activity, which was defined with 100% activity. The results showed that the metal ions evaluated are able to inhibit phytase activity of PhyRC001 at higher concentrations (Table 2). Among them, Al<sup>3+</sup> demonstrated a more pronounced inhibitory effect at all concentrations evaluated. The inhibitory effect of Mg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup> ions showed a direct increase in the concentration of these ions.

**Table 2.** Effects of metal ions on the relative phytase activity of PhyRC001.

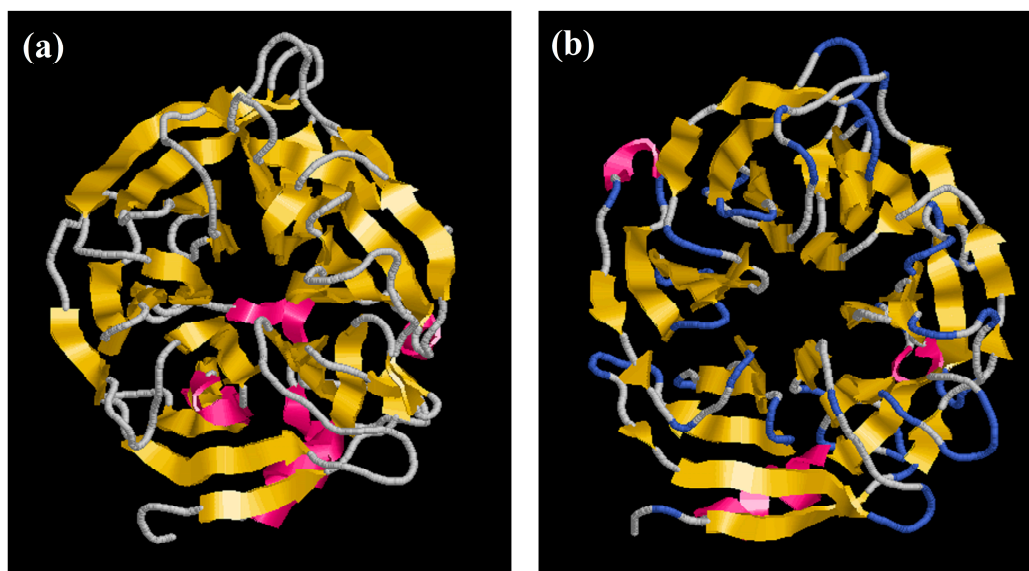
Metal Ions	Relative Phytase Activity, %			
	1 mM	5 mM	10 mM	50 mM
Ca <sup>2+</sup>	100	100	98	75
Mg <sup>2+</sup>	96	73	23	5
Al <sup>3+</sup>	6	0	0	0
Cu <sup>2+</sup>	80	66	13	0
Co <sup>2+</sup>	88	66	40	7
Mn <sup>2+</sup>	100	95	45	15
Zn <sup>2+</sup>	87	90	35	0
Fe <sup>2+</sup>	60	30	10	n/a*
Ni <sup>2+</sup>	55	60	20	10

n/a\*: Fe<sup>2+</sup> at high concentration interferes with the colorimetric assay reagents. The phytase activity was measured at pH 7.0, 35 °C, and is expressed as a percentage (average of three replicates) of the activity level in the absence of the metal ions. For all the metal ions in the table, the anion of the chemical used is Cl<sup>-</sup>. Relative average standard deviation (±1.24).

## 2.5. Protein Modeling

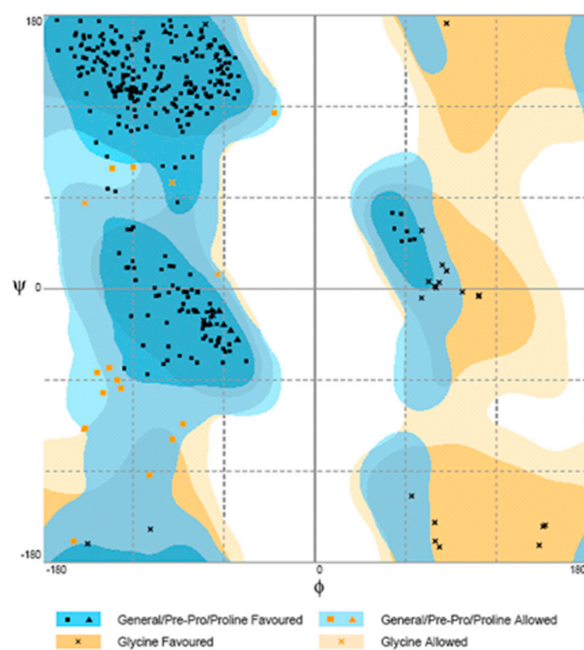
Here, we report the structure of PhyRC001 (phytase). The initial structure was obtained by Comparative/Homology Modeling, performed using the MODELLER 9.13 program [18,19]. Each asymmetric unit of the structure unit cell contains one phytase monomer. The refined model contains one continuous polypeptide chain starting at residue 4 and terminating at residue 376. PhyRC001 shares 37% sequence identity with that of *Bacillus subtilis* (Figure 6a). The overall phytase complex model, just like the *B. subtilis* phytase model solved earlier, had a  $\beta$ -propeller consisting of five four-stranded and one five-stranded antiparallel  $\beta$  sheets. In the beta-sheet motif of PhyRC001,

the enzyme's active site is often found in the cleft formed in the center of the propeller by loops connecting the successive five-sheet motifs (Figure 6b).



**Figure 6.** Homology modeling of phytase enzyme PhyRC001. (a) *B. subtilis* phytase model (3AMR, chain A); and (b) PhyRC001 phytase model.

The suitability of the generated model was assessed by using the general stereo chemical parameters using PROCHECK server. A Ramachandran plot of energy minimized the models of phytase structure that had been generated. The x axis of the Ramachandran plot corresponds to the Phi angles and the y axis represents Psi angles. The plots split into four quadrants which includes low energy region, allowed region, generously allowed region and disallowed region. The phytase showed 81.1% of the residues within the most favorable region, 14.9% within the moreover allowed region, 2.5% in the generously allowed region, and 1.5% in the disallowed region (Figure 7).



**Figure 7.** Ramachandran plot for modeled phytase obtained by PROCHECK.

### 3. Discussion

New enzymatic activities have been explored through metagenomic approach in several studies, demonstrating that the diversity of environments has potential for proteins with biotechnological interest [13]. In this research, a metagenomic library was built successfully using DNA extracted from crop residues of red rice with castor bean cake, and functional screening allowed discovery of a novel phytase enzyme, which is closely related to the  $\beta$ -propeller phytase classes.  $\beta$ -propeller phytase is the only phytase that hydrolyzes phytate and liberates inorganic phosphate, when phytic acid forms an insoluble complex under neutral conditions in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  [20]. Therefore, because most terrestrial and aquatic environments have a neutral pH, we suggest that  $\beta$ -propeller phytase might be the major (and most widespread) phytate-degrading enzyme in nature and that it may play a major role in phytate–phosphorus cycling. The same hypothesis has been proposed by Lim et al. [21] based on an analysis of all the microbial and environmental sequence databases available online.

The metagenomic approach employed in this study could also be employed for the isolation of 3-phytase (EC 3.1.3.8), which can release hydrolyzes phytate and liberates inorganic phosphate. The PhyRC 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 phytases can vary over a wide size range. However, the molecular masses of the majority of previously reported phytases are from 40–100 kDa [22]. Phytases from *Aspergillus* sp., *Candida krusei* and *Schwanniomyces castellii* were reported to have a larger molecular mass: 214 kDa (a homo-hexamer) in *Aspergillus terreus*, 200 kDa in *Aspergillus niger*, 330 kDa in *C. krusei* and 490 kDa in *S. castellii* (a tetramer) [23]. The PhyRC001 protein purified in this study was about 45 kDa in mass, consistent with the size of proteins found in this group, which range from 38–500 kDa [23].

PhyRC001 was active over a wide pH range, maintaining 90% of its optimum activity at pH 7.0 and was stable between pH 4.0 to 8.0. On the basis of substrate specificity, two classes of phytases could be identified: phytases with broad substrate specificity and phytases which are specific for phytic acid. The phytases with broad substrate specificity exhibit significant levels of activity with a range of phosphate compounds such as  $\beta$ -glycerophosphate, *p*-nitrophenylphosphate and D-fructose phosphates, and degrade phytic acid to myo-inositol monophosphate or myo-inositol. In contrast, the phytases with narrow substrate specific activity are specific for myo-inositol phosphates, exhibit much lower levels of activity with myo-inositol 1-monophosphate, and result in myo-inositol tris- and bisphosphate accumulation during phytate degradation. PhyRC001 phytases belong to the latter category because phytases have high specific activity. The substrate specificity of the PhyRC001 on several phosphates was tested in 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.0). Controls were included for determining initial phosphorus in each substrate. As summarized in Table 1, the enzyme had high activity for Na-IHP, but no activity on other phosphorylated compounds including sodium para-nitrophenyl phosphate, a general substrate for acid phosphatase. These results imply that the PhyRC001 is specific for inositol polyphosphate.

The need for a host to promote heterologous expression and the inability to recognize regulatory elements and the presence of different codon biases are some of the difficulties that limit success of functional metagenomics. The overall phylogenetic distribution of genes Actinobacteria (46.1%), Proteobacteria (16.7%), Firmicutes (14.2%), Chloroflexi (7.7%), and Bacteroides (6.1%) in rice straw compost enriched with manure and a microbial community involved in the diverse processes of decomposition were evaluated [24]. 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 and castor bean cake was expressed in this model. We were one order of magnitude more efficient and only had to screen 50,000 clones to find one target gene. Our relatively high success rate could be, in part, explained by the wealth of phytase gene diversity or the large Gram-negative bacterial population in red rice crop residues and castor bean cake.

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

Not only functional mining of metagenomic libraries will provide the discovery of novel enzymes, but combined with other screening strategies including sequence-driven screening and high-throughput sequencing, insights into enzymatic hierarchy structure and catalytic mechanisms in specific environmental niches will be possible, as suggested by the present results.

The molecular homology structure of PhyRC001 revealed a six-bladed  $\beta$ -propeller in which each blade consists of a four-stranded antiparallel  $\beta$ -sheet (Figure 6B).  $\beta$ -Propeller phytases, also known as alkaline phytases, have been considered mainly identified in *Bacillus* species. More recent bioinformatics studies conducted on microbial genomes and environmental metagenomes suggested that the  $\beta$ -propeller phytases are distributed more widely than previously believed and may play a role in phytate–phosphorus cycling in soil and aquatic environment [25].

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Extraction and Purification of DNA from Environmental Samples

Cultural remains of red rice (leaves, stem, spikelets and straw in the ratio of 15:10:6:5 (wt. %)) and castor bean cake were submitted to temperatures from 55 to 70 °C and humidity from 80 to 90% in composting cells for 60 days at de Universidade Estadual da Paraíba (Campina Grande, Brazil). For the DNA extraction the direct lysis method [26] was used with minor modifications.

Briefly, 1 g of vegetable sample was shaken and vortexed in 2.6 mL of extraction buffer (100 mM Tris-HCl at 8.0 pH; 100 mM sodium EDTA at 8.0 pH; 100 mM sodium phosphate at 8.0 pH; 1.5 M NaCl, 1% hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB)). Three freeze–defrosting cycle were performed in liquid nitrogen and put at 65 °C in a water bath. After the addition of 50  $\mu$ L of proteinase K (20 mg/mL), the samples were incubated at 37 °C for 30 minutes with continuous shaking at 120 rpm. Subsequently, 300  $\mu$ L of 20% (*w/v*) SDS was added and incubated at 65 °C for 2 h with gentle shaking every 15–20 min. The supernatants were collected after centrifugation at 4000  $\times$  *g* for 10 min and the resulting pellets were submitted to a re-extraction in 2 mL of extraction buffer, at 65 °C for 10 min. The combined supernatants were then admixed with 1/10 volume of 10% (*w/v*) CTAB [27] and centrifuged again. The resulting supernatants were extracted with chloroform-isoamyl alcohol (24:1, *v/v*), and the DNA was precipitated with isopropanol, washed with 70% (*v/v*) ethanol, dried and resuspended in 100  $\mu$ L of 10 mM Tris-HCl at 8.5 pH. For DNA purification, crude DNA extracts were purified by size exclusion chromatography with CHROMA SPIN+TE-100 (BD Biosciences Clontech, Heidelberg, Germany) columns, equilibrated in 10 mM Tris-HCl at 8.5 pH, according to the manufacturer's recommendations.

### 4.2. Construction of Genomic DNA Library and Screening

A metagenomic library was constructed using the pWEB::TNC Cosmid Cloning Kit (Epicenter, 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. For this purpose, 1.5  $\mu$ g of metagenomic DNA, 1  $\times$  NEB2 buffer (Biolabs), 0.5 mM dNTPs, 2 U of T4 DNA Polymerase enzyme (Biolabs) and ultrapure water were added to the final volume of 80  $\mu$ L. The reaction was maintained at 12 °C for 30 min and soon after at 75 °C for 20 min in a thermocycler for inactivation of the enzyme. In the phosphorylation reaction, 1  $\times$  kinase buffer (Biolabs), 2 mM ATP, 10 U T4 Polynucleotide kinase (Biolabs) and ultrapure water were added to the same tube from the previous reaction to the final volume of 90  $\mu$ L. The reaction was incubated for 10 min at 37 °C and, for inactivation of the enzyme, it was kept at 65 °C for another 10 min. The DNA with the repaired ends was separated on agarose gel. DNA fragments between 20 and 60 kb were recovered from



the gel and ligated to a cosmid vector pWEB::TNC which was linearized at the single *Sma*I site and dephosphorylated. Bound products (pPhytRCN01) were packaged and *E. coli* EPI100 were infected. Colonies from the library, called PhyRC, were screened for phytasic activity according to described protocols [28]. The positive clone for phytasic activity (PhyRC001) was sequenced.

#### 4.3. Sequence and Phylogenetic Analyses

The possible open reading frames (ORFs) were identified with the ORF Finder at the National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Closely related candidate sequences in phytase databases were identified with BlastN and BlastP by NCBI (Bethesda, MD, USA). The cloned phytase sequence and its highest scores were selected from BLAST analyses (NCBI, Bethesda, MD, USA), as well as some phytases selected from  $\beta$ -propeller phytases classes were also aligned for phylogenetic analyses. The histidine acid phosphatases (HAPs) phytase of *Yersinia mollaretii* ATCC 43969 (JF911533.1) was included as an outgroup. The phylogenetic tree was generated with ClustalW 1.81 [29] and MEGA 6.0 [30] using the neighbor-joining method.

#### 4.4. Expression and Purification of Recombinant Phytase

The PhyRC001 sequence, excluding the sequence encoding the N-terminal signal peptide, was amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) using pPhytRCN01 as template and the following primers: forward primer 5'-ATAGCATGCCCGCAGCTGCGAAGATCC-3' (containing a *Sph*I site at the 5' end) and reverse primer 5'-ATAGTCGACCTACTCCCGCAATGCCGC-3' (containing an *Sal*I site at the 5' end). The amplified DNA was digested with *Sph*I and *Sal*I prior to binding to the pQE31 vector digested with the same enzymes (Qiagen, Valencia, CA, USA), resulting in the plasmid pPhytRC01ex. The recombinant plasmid, pPhytRC01ex, was used to transform *E. coli* M15 (Qiagen, Hilden, NRW, Germany). His-tagged PhyRC001 was expressed and purified using nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) agarose resin (Qiagen) according to the manufacturer's instruction. Protein concentrations were determined by the Bradford method [31] 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. A Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) – polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gel analysis [32] was performed to detect the presence of expressed and purified phytase.

#### 4.5. Na-IHP-Zymogram Analysis

Sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) [30] was performed with some modifications to detect phytasic activity using zymogram, native-PAGE [33].

For the Na-IHP zymogram, an SDS-PAGE 12% gel was prepared containing 0.4% Na-IHP. The enzyme extracts were put into half of the gel at a concentration of 40  $\mu$ g 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 native gel was incubated at 35 °C for 16 h in Na-IHP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) solution prepared in activity sodium acetate buffer. Activity bands were visualized by immersing the gel in a 2% (*w/v*) aqueous cobalt chloride solution. After a 5 min incubation at room temperature, the cobalt chloride solution was replaced with a freshly prepared solution containing equal volumes of a 6.25% (*w/v*) aqueous ammonium molybdate solution and 0.42% (*w/v*) ammonium vanadate solution.

Phytase activity was evident as zones of clearing in an opaque background. The gel was imaged under ultraviolet light and aligned with colloidal blue stained gels.

#### 4.6. Biochemical Characterization of Phytase PhyRC001

The optimum temperature for PhyRC001 activity was determined by measuring phytase activity with 1% Na-IHP (*w/v*) in 50 mM sodium acetate buffer, 5.0 pH, from 25 to 70 °C in increments of 5 degrees. Thermostability was examined by incubating the enzyme from 30 to 70 °C in 10 degrees increments over 60 min. The residual enzyme activity was, again, determined with 1% (*w/v*) phytate in 50 mM sodium acetate buffer, 6.0 pH, at 65 °C.

Likewise, the optimum pH for enzymatic activity of PhytRC01 was determined by measuring enzyme activity with 1% (*w/v*) Na-IHP in 50 mM buffers, pH values ranging from 4.0 to 8.0, at 35 °C. The sodium acetate buffer was used in the pH range of 4.0 to 6.0. Sodium phosphate buffer was used for pH range between 6.0 and 8.0. To determine the stability of the enzymatic pH, the extract containing the enzyme was incubated at different pHs, as mentioned above, at 4 °C for 16 h. The residual enzyme activity was measured under standard assay procedure (1% phytate in 50 mM sodium acetate buffer, pH 6.0, at 35 °C).

To investigate the substrate specificity, the enzymatic activities were tested under optimal conditions for 30 min with 1% (*w/v*) organic phosphate such as Phytic acid (Fluka, St. Louis, MO, USA), para-Nitrophenyl phosphate (Sigma, St. Louis, MO, USA), AMP (Sigma), ADP (Sigma), ATP (Sigma), GTP (Sigma), NADP (Sigma), Glucose 1-phosphate (Sigma) and Glucose 6-phosphate (Sigma).

To inspect the influence of metal ions, the enzymatic activities were tested under optimal conditions for 30 min with (1, 5, 10 and 50 mM) metal ions such as Ca<sup>2+</sup> (Sigma), Mg<sup>2+</sup> (Sigma), Al<sup>3+</sup> (Sigma), Cu<sup>2+</sup> (Sigma), Zn<sup>2+</sup> (Sigma), Fe<sup>2+</sup> (Sigma), Ni<sup>2+</sup> (Sigma), Mn<sup>2+</sup> (Sigma) and Co<sup>2+</sup> (Sigma).

#### 4.7. Protein Modeling of Phytase PhyRC001

The homology molecular modeling methodology involved four successive steps: identification and selection of the template protein; aligning the target and template sequences; construction and optimization of the model and validation of the model.

The amino acid sequence of the PhyRC001 protein was subjected to a comparative analysis through the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, NCBI, Bethesda, MD, USA) program ([www.ncbi.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nih.gov/BLAST)) [34] in the PDB database. The amino acid sequences from some of the microorganisms found in the search result were submitted to the multiple sequence alignment program (CLUSTALX). In this first step, a protein related to the amino acid sequence of PhyRC001 (target protein) was identified, taking into account during the process of choosing the template protein, aspects such as: structural knowledge, sequence similarity, function similarity, expression by the same group of genes and evolutionary correlation between the proteins, 3AMR: chain A [35].

Identified to the protein template, overall alignment methods between the sequences were applied, which consisted of the second step of comparative modeling. The alignment between sequences was performed using the CLUSTALW program (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>). The aim of this alignment was to recognize structurally conserved regions and variable regions, observing the structurally equivalent residues in the primary sequence.

The third step of the modeling was the construction of the model, which was based on the information contained in the alignment generated between the sequences. The model was constructed using the MODELLER program [18]. The modeling used satisfied all spatial constraints, using geometric distances and optimization techniques. The visualization of the three-dimensional structure was performed with the RASMOL program [36].

The quality of the generated 3D model was validated by the Ramachandran plot [37] with the PROCHECK program [38], which evaluated the three-dimensional structure of the protein indicating its stereochemical quality. The quality of the model was linked to the choice of the mold and the construction of the alignment that serves as a reference for the construction of the atoms that compose the protein.

## 5. Conclusions

In conclusion, an enzyme belonging to the  $\beta$ -propeller phytase family was isolated successfully using a functional approach to screen a metagenomic library built from DNA isolated from red rice crop residues with castor bean cake. The screen involved looking for phytasic activity in a heterologous expression system in *E. coli* PhyRC001 and subsequent purification and characterization of the recombinant protein.

**Acknowledgments:** This work was supported by the project UNIVERSAL—National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq) no. 483547/2013-1. Nathálya Farias and Isabela Almeida thank Coordination of development of senior staff (CAPES) and CNPq for the fellowships. We thank Mr. Luc Marie Felicianus Rouws for critical reviews and native speaker advice.

**Author Contributions:** N.F., I.A. and C.M. conceived and designed the experiments; N.F., I.A. and C.M. performed the experiments; N.F., I.A. and C.M. analyzed the data; C.M. contributed reagents/materials/analysis tools; N.F., I.A. and C.M. wrote the paper.

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

## References

1. Brindraban, P.S.; Dimkpa, C.O.; Nagarajan, L.; Roy, A.; Rabbinge, R. Revisiting fertilisers and fertilisation strategies for improved nutrient uptake by plants. *Biol. Fertil. Soils* **2015**, *51*, 897–911. [[CrossRef](#)]
2. Alori, E.T.; Glick, B.R.; Babalola, O.O. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 971. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Menezes-Blackburn, D.; Giles, C.; Darch, T.; George, T.S.; Blackwell, M.; Stutter, M.; Shand, C.; Lumsdon, D.; Cooper, P.; Wendler, R.; et al. Opportunities for mobilizing recalcitrant phosphorus from agricultural soils: A review. *Plant Soil* **2017**, 1–12. [[CrossRef](#)]
4. Secco, D.; Bouain, N.; Rouached, A.; Prom-u-thai, C.; Hanin, M.; Pandey, A.K.; Rouached, H. Phosphate, phytate and phytases in plants: from fundamental knowledge gained in *Arabidopsis* to potential biotechnological applications in wheat. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2017**, *12*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Vogel, C.; Rivard, C.; Wilken, V.; Muskolus, A.; Adam, C. Performance of secondary P-fertilizers in pot experiments analyzed by phosphorus X-ray absorption near-edge structure (XANES) spectroscopy. *Ambio* **2018**, *47*, 62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Prosser, J.I. Dispersing misconceptions and identifying opportunities for the use of ‘omics’ in soil microbial ecology. *Nat. Rev. Microbiol.* **2015**, *13*, 439–446. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Méndez-García, C.; Peláez, A.I.; Mesa, V.; Sánchez, J.; Golyshina, O.V.; Ferrer, M. Microbial diversity and metabolic networks in acid mine drainage habitats. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Escobar-Zepeda, A.; Vera-Ponce de León, A.; Sanchez-Flores, A. The road to metagenomics: From microbiology to dna sequencing technologies and bioinformatics. *Front. Genet.* **2015**, *6*, 348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Ofaim, S.; Ofek-Lalzar, M.; Sela, N.; Jinag, J.; Kashi, Y.; Minz, D.; Freilich, S. Analysis of microbial functions in the rhizosphere using a metabolic-network based framework for metagenomics interpretation. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1606. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Handelsman, J. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2004**, *68*, 669–685. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Suenaga, H. Targeted metagenomics unveils the molecular basis for adaptive evolution of enzymes to their environment. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1018. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Pal Roy, M.; Mazumdar, D.; Dutta, S.; Saha, S.P.; Ghosh, S. Cloning and expression of phytase appA gene from *Shigella* sp. CD2 in *Pichia pastoris* and comparison of properties with recombinant enzyme expressed in *E. coli*. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0145745. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Meneses, C.; Silva, B.; Medeiros, B.; Serrato, R.; Johnston-Monje, D. A Metagenomic advance for the cloning and characterization of a cellulase from red rice crop residues. *Molecules* **2016**, *21*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Patel, V.R.; Dumancas, G.G.; Kasi Viswanath, L.C.; Maples, R.; Subong, B.J.J. Castor oil: Properties, uses, and optimization of processing parameters in commercial production. *Lipid Insights* **2016**, *9*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

15. Deller, M.C.; Kong, L.; Rupp, B. Protein stability: a crystallographer's perspective. *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.* **2016**, *72*, 72–95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Rocky-Salimi, K.; Hashemi, M.; Safari, M.; Mousivand, M. A novel phytase characterized by thermostability and high pH tolerance from rice phyllosphere isolated *Bacillus subtilis* B.S.46. *J. Adv. Res.* **2016**, *7*, 381–390. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Yanke, L.J.; Bae, H.D.; Selinger, L.B.; Cheng, K.J. Phytase activity of anaerobic ruminal bacteria. *Microbiology* **1998**, *144*, 1565–1573. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Šali, A.; Blundell, T.L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* **1993**, *234*, 779–815. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Fiser, A.; Do, R.K.; Šali, A. Modeling of loops in protein structures. *Protein Sci.* **2000**, *9*, 1753–1773. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Kim, O.H.; Kim, Y.O.; Shim, J.H.; Jung, Y.S.; Jung, W.J.; Choi, W.C.; Lee, H.; Lee, S.J.; Kim, K.K.; Auh, J.H.; et al.  $\beta$ -propeller phytase hydrolyzes insoluble Ca(2+)-phytate salts and completely abrogates the ability of phytate to chelate metal ions. *Biochemistry* **2010**, *49*, 10216–10227. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Huang, H.; Shi, P.; Wang, Y.; Luo, H.; Shao, N.; Wang, G.; Yang, P.; Yao, B. Diversity of beta-propeller phytase genes in the intestinal contents of grass carp provides insight into the release of major phosphorus from phytate in nature. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 1508–1516. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Monteiro, P.S.; Guimarães, V.M.; de Melo, R.R.; de Rezende, S.T. Isolation of a thermostable acid phytase from *Aspergillus niger* UFV-1 with strong proteolysis resistance. *Braz. J. Microbiol.* **2015**, *46*, 251–260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Quan, C.S.; Fan, S.D.; Zhang, L.H.; Wang, Y.J.; Ohta, Y. Purification and properties of a phytase from *Candida krusei* WZ-001. *J. Biosci. Bioeng.* **2002**, *94*, 419–425. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. 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*, 22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Chen, C.C.; Cheng, K.J.; Ko, T.P.; Guo, R.T. Current progresses in phytase research: Three-dimensional structure and protein engineering. *ChemBioEng Rev.* **2015**, *2*, 76–86. [[CrossRef](#)]
26. Zhou, J.; Bruns, M.A.; Tiedje, J.M. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 316–322. [[PubMed](#)]
27. Murray, M.G.; Thompson, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* **1980**, *8*, 4321–4325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Unno, Y.; Okubo, K.; Wasaki, J.; Shinano, T.; Osaki, M. Plant growth promotion abilities and microscale bacterial dynamics in the rhizosphere of Lupin analysed by phytate utilization ability. *Environ. Microbiol.* **2005**, *7*, 396–404. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 4673–4680. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipinski, A.; Kumar, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **2013**, *30*, 2725–2729. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. 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](#)]
32. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Bae, H.D.; Yanke, L.J.; Cheng, K.J.; Selinger, L.B. A novel staining method for detecting phytase activity. *J. Microbiol. Methods* **1999**, *39*, 17–22. [[CrossRef](#)]
34. Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403–410. [[CrossRef](#)]
35. Zeng, Y.F.; Ko, T.P.; Lai, H.L.; Cheng, Y.S.; Wu, T.H.; Ma, Y.; Chen, C.C.; Yang, C.S.; Cheng, K.J.; Huang, C.H.; et al. Crystal structures of *Bacillus* alkaline phytase in complex with divalent metal ions and inositol hexasulfate. *J. Mol. Biol.* **2011**, *409*, 214–224. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Sayle, R.A.; Milner-White, E.J. RasMol: Biomolecular graphics for all. *Trends Biochem. Sci.* **1995**, *20*, 374–376. [[CrossRef](#)]

37. Ramachandran, G.N.; Sasisekharan, V. Conformation of polypeptides and proteins. *Adv. Protein Chem.* **1968**, *23*, 283–437.
38. Laskowski, R.A.; MacArthur, M.W.; Moss, D.S.; Thornton, J.M. PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **1993**, *26*, 283–291. [[CrossRef](#)]

**Sample Availability:** Samples of the purified PhyRC001 phytase are available from the authors.



© 2018 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/>).