

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGEM BACTERIANA CAPAZ DE BIOTRANSFORMAR LIMONENO

LIVIA PILATTI MENDES DA SILVA¹; MARCO AURÉLIO TAKITA²

Nº 11120

RESUMO

O Instituto Agronômico de Campinas foi responsável pela formação do maior banco de seqüências de citros do mundo através do Programa Institutos do Milênio, do Ministério de Ciência e Tecnologia/ CNPq. Esta base de dados apresenta grande parte dos genes expressos de citros e dão uma ampla visão do genoma expresso deste gênero e outros correlatos. Nos últimos anos, tem-se buscado realizar trabalhos funcionais visando à caracterização de genes envolvidos com a síntese de terpenos. Assim, foi verificada a expressão de genes que codificam terpeno sintases em frutos de laranja doce (projeto FAPESP) bem como está sendo verificada a expressão destes mesmos genes em frutos de tangerinas (projeto CNPq - Universal). Em ambos os projetos foi verificada a composição do óleo essencial de citros, laranja doce e tangerina, e verificou-se que o principal componente destes óleos é o limoneno, que pode atingir 95% do total de compostos. Como o óleo essencial de laranja doce é um sub-produto da produção de suco concentrado, o valor comercial deste é baixo. Consequentemente, o valor do limoneno também é baixo. A biotransformação do limoneno em produtos de valor comercial maior tem sido buscada de através de diferentes métodos, destacando-se a biotransformação por microorganismos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi a busca por linhagens bacterianas capazes de transformar este limoneno e sua identificação através de sequenciamento.

ABSTRACT

The Instituto Agronômico de Campinas was responsible for the construction of the largest citrus DNA sequence database of the world, through the Programa Institutos do Milênio, of Ministério de Ciência e Tecnologia/ CNPq. This database shows most of the citrus expressed genes and a wide picture of the expressed genome

¹ Bolsista CNPq: Graduação em Bacharelado em Biotecnologia, UFSCar, Araras-SP, lipilatti@gmail.com.

² Orientador: Pesquisador, Centro APTA de Citricultura Sylvio Moreira/IAC, Cordeirópolis-SP.

of this genus. In recent years, researchers have tried to carry out work aiming the characterization of genes involved in synthesis of terpenes. Thus, the expression of genes involved in terpenes synthesis in sweet oranges fruits was verified (FAPESP) as well as is being checked the expression of these same genes in tangerines fruits (project CNPq –Universal). In both projects it was verified the composition of essential oil of citrus, sweet orange and tangerine, respectively, and it was found that the main component of these oils is limonene, which can reach 95% of total compounds. As the sweet orange essential oil is a byproduct of the production of concentrated juice, the commercial value of this is low. Consequently, the amount of limonene is also low. Biotransformation of limonene in products of higher commercial value has been pursued through different methods, especially for the biotransformation by microorganisms. Thus, the objective of this work was the search for bacterial strains able to transform this limonene and its identification by sequencing.

INTRODUÇÃO

A citricultura apresenta um papel fundamental no agronegócio brasileiro, tendo a produção de suco concentrado congelado como a principal atividade e sendo o Estado de São Paulo o principal produtor, processador e exportador. O óleo essencial de laranja é um subproduto da produção de suco, o que torna o Brasil o maior produtor mundial deste tipo de óleo essencial.

O limoneno é o principal componente deste óleo essencial, respondendo por quase 95% de seu total. Em virtude disto, seu valor comercial é muito baixo. Uma das principais formas de se obter outras substâncias de maior valor é através da utilização de microorganismos capazes de biotransformar o limoneno. Assim é importante isolar microrganismos capazes de fazer este processo e identificá-los, com o primeiro passo visando aplicações biotecnológicas mais complexas.

Existem vários relatos de biotransformação de limoneno com obtenção dos compostos perfílicos por linhagens bacterianas (Chatterjee e Bhattacharyya 2001; Speelmans e col., 1998; Dhavalikar e Bhattacharyya, 1966; Cadwallader e col., 1989; Chang e Oriel, 1994; Cheong e Oriel, 2000). De acordo com os termos das legislações européias e norte americanas, esses compostos obtidos por biotransformação podem ser considerados naturais (Berger, 1995). Estes podem apresentar valor econômico muito superior aos de seus substratos.

Uma estratégia comum para a seleção de linhagens de bactérias com potencial biotransformador de limoneno é a utilização de técnicas de enriquecimento de cultura utilizando o substrato limoneno como única fonte de carbono (Speelmans e col., 1998; Dhavalikar e Bhattacharyya, 1966; Cadwallader e col., 1989; Chang e Oriel, 1994; Dhavalikar e col., 1966).

O trabalho tem como objetivos específicos o isolamento de linhagem bacteriana a partir de frutos de laranja doce capaz de crescer em presença de limoneno e identificá-la através de amplificação, clonagem e sequenciamento de fragmento específico do genoma da bactéria.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de linhagens resistentes ao limoneno:

Dois mililitros de extrato contendo óleo essencial de laranja doce, obtido através de maceração da casca de frutos maduros com água Milli-Q, foi adicionado a tubos de ensaio contendo 6mL de meio contendo: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 37.83mM; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 12.34mM; NaCl 8.55mM; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.62mM; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4.08mM; KCl 28.83mM; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03mM; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03mM; e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.04mM, e incubado por até 2 dias a 37°C, com rotação (150 rpm). As culturas que turvaram foram utilizadas para plaqueamento no mesmo meio sem o óleo essencial para isolamento de colônias.

Amplificação da região intergênica 16S-23S:

Estas colônias foram utilizadas para amplificação da região intergênica 16S-23S, utilizando primers universais em reação de polimerização em cadeia com Taq DNA polimerase nas seguintes condições: 1x tampão, 0,2mM de cada dNTP, 1 μL DNA obtido pela fervura de 10 μL de uma suspensão da bactéria em água, 250ng de cada primer, 5U de Taq DNA polimerase em um volume total de 50 μL . As condições de ciclagem foram: 45 seg a 95°C, 25 ciclos de 45 seg a 95°C, 45 seg a 50°C, 3 minutos a 72°C, e um passo final de incubação a 72°C por 10 min. Os amplicons foram verificados em gel de agarose 1%.

Purificação dos Amplicons e clonagem:

Os amplicons obtidos foram posteriormente clonados em pJet1.2 (vetor comercial da Fermentas) após purificação dos fragmentos utilizando-se o kit GeneClean (Bio101). A clonagem foi feita seguindo o protocolo de fabricante com transformação em células de *E. coli* competentes (DH10B).

Sequenciamento de DNA:

Clones foram crescidos em placas de 96 poços, em 1 mL de meio Circle Grow (Bio 101) contendo 100 µg/mL de meio. As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas com agitação e, então, os plasmídeos foram extraídos por fervura, centrifugando-se as placas por 6 minutos a 3000 rpm. As células foram congeladas a -80°C por 15 minutos e descongeladas por 10 minutos sendo ressuspensas em 25 mL de água Milli-Q. A lise foi feita por adição de 70 mL de STET/Tween (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0, 100 mM NaCl, 5 % Tween 20, 232 µg/mL RNase A, 500 µg/mL Lisozima) e fervura em forno de microondas. Em seguida foram adicionados 700 mL de água e a placa foi centrifugada por 45 minutos a 3000 rpm após incubação de 15 minutos em gelo. Foram coletados 50 mL do sobrenadante para as reações de sequenciamento, que foi feito utilizando-se BigDye 3.1 (Applied Biosystems), segundo as especificações do fabricante.

Identificação da bactéria:

As sequências obtidas foram utilizadas para comparações com sequências disponíveis em banco de dados públicos através do uso da ferramenta Blast.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Células de cinco colônias obtidas pelo plaqueamento foram crescidas no meio contendo o extrato a fim de confirmar seu crescimento. A cultura com maior crescimento foi escolhida para plaqueamento em meio sólido com a mesma composição (figura 1).

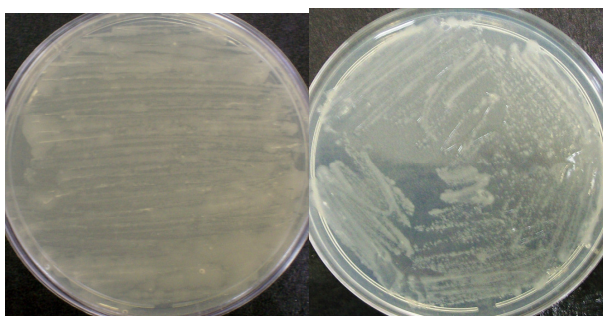


FIGURA 1. Bactérias isoladas em meio sólido contendo: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 37.83mM; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 12.34mM; NaCl 8.55mM; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.62mM; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4.08mM; KCl 28.83mM; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03mM; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03mM; e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.04mM.

Doze colônias foram selecionadas para a amplificação da região intergênica 16S-23S, com primers universais, afim de identificar a espécie bacteriana. Os amplicons foram verificados em gel de agarose 1% (Figura 2).

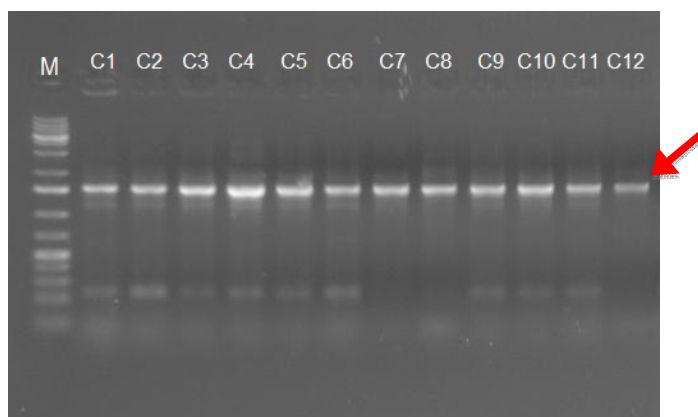


FIGURA 2. Gel de agarose 1% da amplificação da região 16S-23S das bactérias. M = marcador Gene Ruler 1Kb Plus DNA (Fermentas) ; C1 a C12 = colônias de 1 a 12. A seta marca o amplicon esperado de 1500 pb.

Os amplicons (1500 pb) foram purificados utilizando-se o kit GeneClean (Bio101), clonados em pJet1.2 (Fermentas), seguindo o protocolo do fabricante. As construções foram utilizadas para transformação de *E. coli* DH10B. Centenas de transformantes foram obtidas, dos quais doze foram selecionados para extração do DNA plasmidial. Essa preparação foi verificada em gel de agarose 1% (Figura 3).

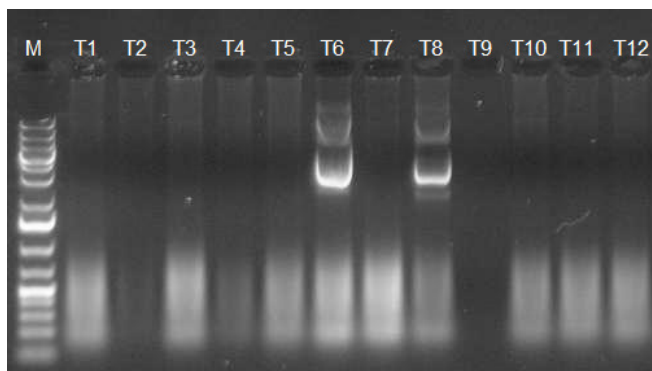


FIGURA 3. Gel de agarose 1% da mini preparação alcalina do DNA plasmidial dos transformantes. M= marcador Gene Ruler 1Kb Plus DNA (Fermentas) ; T1 a T12 = transformantes 1 a 12.

Dos doze transformantes, em apenas dois foram obtidos plasmídeos em quantidade significativa. As duas preparações foram utilizadas para amplificação de DNA, utilizando os mesmo primers universais, do DNA plasmidial dos transformantes

T6 e T8, que foram positivos na extração, para verificar a clonagem do fragmento no vetor. A verificação foi feita em gel de agarose 1% (Figura 4).

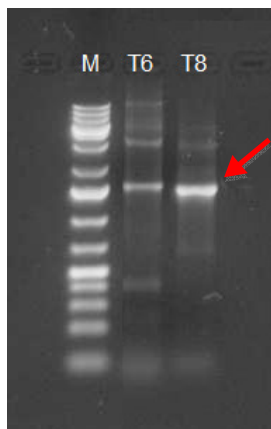


FIGURA 4. Gel de agarose 1% mostrando a amplificação do fragmento na mini preparação alcalina do DNA plasmidial. M = marcador Gene Ruler 1Kb Plus DNA (Fermentas) ; T6= transformante 6 e T8 = transformante 8. A seta indica os amplicons de 1500 pb.

O DNA dos transformantes 6 e 8 foi utilizado para as reações de sequenciamento. Ambas as extremidades foram sequenciadas e, interessante, uma das sequências mostrou similaridade com DNA de cloroplasto de citros ao passo que a outra apresentou similaridade com sequências de bactérias não cultiváveis. Apesar de inconclusivo, este resultado mostrou que este organismo parece ser algo previamente não caracterizado.

Na tentativa de caracterizar esta bactéria, fez-se inicialmente Coloração de Gram para verificar as características da parede celular. Isto seria importante posteriormente, para escolher um bom protocolo para a extração de DNA total da bactéria. O resultado, mostrado na figura 5, é que a bactéria é Gram-negativa.

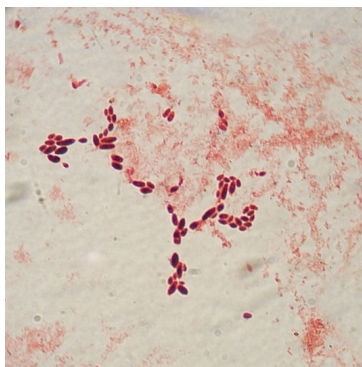


FIGURA 5. Coloração de Gram das bactérias isoladas.

Com esse resultado, o protocolo de Dunningan (1997) foi utilizado para a extração do DNA total. O DNA foi verificado em gel de agarose 1% (figura 6).

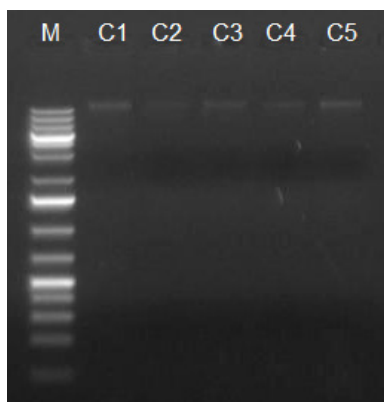


FIGURA 6. Gel de agarose 1% da extração do DNA total das colônias. M= marcador Gene Ruler 1Kb Plus DNA (Fermentas) ; C1 a C5 = colônias 1 a 5.

O DNA obtido foi tratado com RNase (5 µg) por 30 minutos à 37°C, precipitado com 1/10 de volume de Acetato de Sódio 3M e 3 volumes de etanol absoluto (por 30 minutos a -80°C), afim de retirar a enzima. Após a centrifugação por 15 minutos, foi feita lavagem do pellet com etanol 70% e ressuspendido em 50 µL de água. O DNA (10 µL) preparado das cinco colônias foi digerido por um minuto, com 1 µL da enzima *Sau3AI* (Fermentas), em um volume total de 15 µL. A digestão foi confirmada em gel de agarose, e o DNA com tamanho entre 1000pb e 2000pb foi purificado do gel.

Para a clonagem, o vetor PGEM3Z (Promega) foi digerido com *Bam*HI (Fermentas) e tratado com 1 µL de fosfatase alcalina. A ligação foi feita com 2 µL vetor, 1 µL T4 DNA ligase, 1 µL tampão 10x, 5 µL fragmentos, 1 µL H₂O). A linhagem bacteriana DH10B foi transformada, sendo a seleção feita em meio LB sólido contendo além de 100 µg/mL de ampicilina, 4 µL de IPTG e 40 µL de X-GAL. Poucas colônias que não apresentaram coloração azul cresceram e foram utilizadas para extração de DNA plasmidial, que posteriormente será usado em seqüenciamento.

CONCLUSÃO

No presente trabalho foi isolada uma espécie bacteriana Gram-negativa capaz de crescer em presença de óleo essencial de citros, denotando um provável mecanismo de resistência à ação de limoneno. A caracterização através do sequenciamento do DNA ribossomal mostrou que a bactéria parece ser um organismo não caracterizado anteriormente. Caracterização posterior com outras seqüências

genômicas deve ser realizada de modo a possibilitar a identificação total deste organismo.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida, e ao Centro APTA de Citricultura Sylvio Moreira/IAC, pela oportunidade de estágio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Berger, R.G. 1995. **Aroma biotechnology**. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag.
- Cadwallader, K.R., Braddock, R.J., Parish, M.E., Higgins, D.P. 1989. Bioconversion of d-limonene by *Pseudomonas gladioli*. **Journal of Food Science**, 54, 1241-1245.
- Chang, H.C., Oriel, P. 1994. Bioproduction of perillyl alcohol and related monoterpenes by isolates of *Bacillus stearothermophilus*. **Journal of Food Science**, 59, 660-662.
- Chatterjee, T., Bhattacharyya, D.K. 2001. Biotransformation of limonene by *Pseudomonas putida*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 55, 541-546
- Cheong, T.K., Oriel, P.J. 2000. Cloning and expression of the limonene hydroxylase of *Bacillus stearothermophilus* BR388 and utilization in two-phase limonene conversions. **Applied Biochemistry Biotechnology**, 84, 903-915.
- Dhavalikar, R.S., Bhattacharyya, PK. 1966. Microbiological transformations of terpenes. VIII. Fermentation of limonene in a soil pseudomonad. **Indian Journal of Biochemistry** 3,144-157.
- Dunigan, D. D. 1997. Preparations of genomic DNA from bacteria. **Current Prot Molec Biol** 241-242.
- Speelmans, G., Bijlsma, A., Eggink, G. 1998. Limonene bioconversion to high concentrations of a single and stable product, perillic acid, by a solvent-resistant *Pseudomonas putida* strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 50, 538–544.