

CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECA GENÔMICA DE ISOLADO BACTERIANO CAPAZ DE BIOTRANSFORMAR LIMONENO

GABRIELA M. **BARREIROS**¹; MARCO A. **TAKITA**²

Nº 12103

RESUMO

O Brasil é o maior produtor mundial de suco de laranja concentrado. Consequentemente, é o maior produtor de óleo essencial de laranja doce, um dos subprodutos dessa atividade. O limoneno é o maior constituinte do óleo essencial de Citros e, portanto, há grande produção desta substância. Uma das formas de obterem-se compostos diferentes e economicamente interessantes a partir do limoneno é através do processo de biotransformação. De acordo com a legislação americana e europeia, compostos obtidos por biotransformação podem ser considerados naturais, o que aumenta ainda mais o seu valor, pela grande procura de compostos naturais e saudáveis nos dias de hoje. Deste modo, buscou-se isolar linhagens bacterianas capazes de sobreviver em presença de limoneno, uma vez que uma de suas características é sua toxicidade às células dos micro-organismos, obtendo-se assim uma fonte possível para biotransformação desta substância. Uma vez realizado este trabalho, o próximo importante passo é a identificação dos genes responsáveis por essa bioconversão. Assim, o objetivo deste trabalho é a construção de uma biblioteca genômica do isolado bacteriano capaz de crescer na presença de limoneno, contendo pelo menos 2000 clones, para que, posteriormente, os genes responsáveis por essa atividade possam ser identificados.

¹ Bolsista PIBITI: Graduação em Biotecnologia, UFSCar, Araras - SP, gabi_massaro@hotmail.com.

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

ABSTRACT

Brazil is the world's biggest producer of concentrated orange juice. Because of that, it is the largest producer of sweet orange essential oil, a byproduct of this production. Limonene is the major constituent of the essential oil of Citrus, so there is big production of this substance as consequence. One way of getting different compounds that are economically interesting from limonene is through biotransformation. According to the American and European laws, compounds obtained through biotransformation can be considered natural, increasing its value because of the current search for natural and healthy compounds. Therefore we aimed the isolation of bacterial strains that are able to survive in presence of limonene, since one of its characteristics is the toxicity to the cells of microorganisms, obtaining a putative source for biotransforming this substance. As this task was done, the next important step is the identification of genes responsible for this bioconversion. Therefore the objective of this work is the construction of a genomic library of the bacterial isolate able to grow in the presence of limonene, containing at least 2000 genes, so that subsequently the genes responsible for this activity can be identified.

INTRODUÇÃO

No Brasil, a produção de suco concentrado é uma das principais atividades no agronegócio brasileiro. O óleo essencial da laranja é um subproduto da produção de suco, o que torna o Brasil o maior produtor deste tipo de óleo essencial. No caso dos óleos essenciais dos cítricos em geral, o R-(+)-limoneno é seu componente mais expressivo, atingindo concentrações de 90 a 96% (Nonino, 1997; Berger et al, 2002).

Aproximadamente 50 mil t de R-(+)-limoneno são recuperadas ao ano como subproduto da indústria cítrica mundial (Nonino, 1997, Berger et al, 2002). O limoneno é geralmente separado do óleo essencial obtido no suco de laranja pela sua baixa solubilidade em água, alta tendência à auto-oxidação e polimerização, e formação de "off-flavors", tornando-se um subproduto industrial adequado para bioconversões a compostos de alto valor comercial (Berger, 2002).

Uma das formas de recuperação do limoneno é através do processo de biotransformação. Além das inúmeras vantagens comparadas ao processo químico, compostos obtidos por biotransformação podem ser considerados naturais, de acordo com as legislações norte-americana e europeia.

Existem vários relatos de biotransformação de R-(+)-limoneno com obtenção dos compostos perílicos 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). Uma estratégia comum para a seleção de linhagens de bactérias com potencial biotransformador de R-(+)-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).

Um dos limitantes desse processo de biotransformação é a toxidade do limoneno às células dos micro-organismos. A identificação de uma linhagem bacteriana capaz de sobreviver em presença de óleo essencial de citros é um bom indicativo de que este organismo apresenta um sistema para modificação de limoneno, transformando-o em compostos menos tóxicos. Este isolamento foi realizado anteriormente, em projeto PIBIC 2010/2011 (Pilatti e Takita, 2011). Todavia testes com esta linhagem acabaram mostrando que sua capacidade de crescer em meio contendo óleo essencial de laranja doce foi perdida na estocagem em freezer -80°C. Deste modo, no presente projeto um novo isolamento bacteriano foi realizado. A partir daí, a construção de uma biblioteca genômica deste isolado bacteriano é etapa primordial para a identificação de genes responsáveis por este processo de biotransformação.

MATERIAL E MÉTODOS

- Obtenção de linhagens resistentes ao limoneno

Foram colhidos seis frutos em estado de decomposição, tendo a casca com consistência mole. Destes seis frutos, dois eram de laranja seleta branca e quatro de lima ácida tahiti. Os frutos foram lavados com água corrente e foi cortado um pedaço da casca o qual foi inoculado em 4mL de meio LB líquido (Tryptona 10g/L, Extrato de levedura 5g/L e Cloreto de Sódio 10g/L) e crescido durante a noite. Os inóculos tiveram a seguinte denominação: F1 A e B para os dois frutos de seleta branca, e F2 A, B, C e D para os quatro frutos de lima ácida tahiti. As suspensões bacterianas foram então plaqueadas em meio LB sólido.

Para a identificação das linhagens resistentes ao limoneno foram realizados testes de crescimento para cada isolado, com diferentes concentrações de óleo essencial de laranja contendo limoneno: 20µL, 50µL e 100µL.

Este mesmo teste foi feito com uma linhagem de *Escherichia coli*, usado como controle negativo e sem bactéria, para controle de contaminação do meio.

Os inóculos foram incubados por no mínimo 16 horas a 37°C e aqueles que apresentaram resultado positivo (turbidez do meio) foram passados para placas contendo LB sólido.

- Identificação bacteriana

Colônias bacterianas isoladas foram utilizadas para identificação. Para tanto, foi feita uma amplificação de DNA através de reação de polimerização em cadeia (PCR), utilizando primers universais, usando o seguinte programa: fase inicial de 45 segundos a 95°C, 25 ciclos de 45 segundos a 95°C, 45 segundos a 50°C e 3 minutos a 72°C, finalizando com uma etapa de 10 minutos a 72°C. A amplificação foi verificada em gel de agarose 1%.

As bandas requeridas foram purificadas utilizando o kit Geneclean III (Bio101) de acordo com os métodos especificados pelo fabricante. Os fragmentos purificados foram ligados ao vetor pGEM-T com incubação de 2 horas a temperatura ambiente. As ligações foram usadas para transformação de células competentes da linhagem bacteriana DH10B.

Os clones obtidos da transformação foram recuperados por uma minipreparação em placa: os clones foram crescidos em placas de 96 poços, com 1mL de meio Circle Grow (Bio101). As placas foram incubadas a 37°C, overnight, com agitação. Os plasmídeos foram então extraídos por fervura, centrifugando-se as placas por 6 minutos a 3000rpm. As células foram congeladas a -80°C por 15 minutos e descongeladas por 10 minutos sendo ressuspensas em 25µL de água Mili-Q autoclavada. A lise foi feita por adição de 70µL de STET/Tween (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA, pH 8.0, 100mM NaCl, 5% Tween 20, 232µg/mL RNase A, 500µg/mL Lisozima) e fervura em forno micro-ondas. Em seguida foram adicionados 400µL de água Mili-Q autoclavada e a placa foi centrifugada por 45 minutos a 3000rpm após incubação de 15 minutos em gelo. Do sobrenadante foram coletados 50µL para as reações de sequenciamento, que foram feitas utilizando-se BigDye 3.1 (Applied Biosystems), segundo as especificações do fabricante. As reações foram corridas em sequenciador automático ABI3730 (Applied Biosystems) e as sequências geradas foram processadas no programa Seqman do pacote Lasergene99 (DNASTAR). As sequências dos contíguos obtidos foram comparadas com sequências disponíveis em

bancos de dados públicos através do uso da ferramenta Blast para a identificação da linhagem.

- Preparação de DNA genômico bacteriano

O isolado bacteriano capaz de crescer em presença de limoneno foi crescido em 1mL de meio LB líquido (Tryptona 10g/L, Extrato de levedura 5g/L e Cloreto de Sódio 10g/L), durante a noite a 37°C e 250 rpm.

As células foram concentradas por meio de centrifugação, ressuspensas em 100µL de tampão TE (Tris-HCl 10mM, pH 8, EDTA 1mM) e tratadas com lisozima (2mg/mL), para a quebra da parede celular da bactéria, por 1 hora a 37°C.

As células foram concentradas novamente por centrifugação. O precipitado foi dissolvido em 1mL de tampão TNE (Tris-HCl 10mM pH 8, NaCl 10 mM, Na₂EDTA 10mM pH 8). Foi centrifugado novamente a 14000rpm, por 1 minuto, e o precipitado foi dissolvido em 135µL de tampão TNE. Em seguida foram adicionados 135µL de tampão TNE com 2% de Triton X-100, 30µL de lisozima e 3µL de RNase (10mg/mL). A solução foi incubada a 37°C por 30 minutos para a ação das enzimas. Foi adicionado então 15µL de Proteinase K (20mg/mL) e incubado a 65°C por 2 horas. Foi adicionado então 600µL de solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico na proporção de 25:24:1. Após a centrifugação, a parte aquosa contendo o DNA foi recuperada. Foram adicionados 600µL de isopropanol gelado e incubados a -20°C por 20 minutos. O DNA foi concentrado por centrifugação a 13000rpm por 5 minutos. O precipitado foi lavado duas vezes com 1mL de etanol 70% gelado. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o DNA permaneceu em repouso para a secagem. Este então foi ressuspensado em 100µL de tampão TE. O DNA extraído foi quantificado em Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) e verificado em gel de agarose 1%.

- Purificação e digestão do vetor

Os vetores pUC18, pUC19, pGEM3Z e pBluesCrie (pBC) foram usados para transformação de células competentes da linhagem DH10B. pBC foi plaqueado em meio LB sólido com cloranfenicol (34µg/mL de etanol absoluto) e pUC18, pUC19 e pGEM3Z foram plaqueados em meio LB sólido com ampicilina (100µg/mL). Os vetores transformados foram inoculados em LB líquido com os respectivos antibióticos para a

realização de uma minipreparação alcalina. As minipreparações foram verificadas em gel de agarose 1%. Os vetores que apresentaram resultado positivo nas minipreparações foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI (FERMENTAS). As digestões foram feitas com 30 U da enzima, por 1 hora a 37°C. As digestões foram precipitadas com 0,3M acetato de sódio e 3 volumes de etanol, sendo posteriormente tratadas com 1 U de fosfatase alcalina, incubada a 37°C por 1 hora.

- Digestão do DNA Genômico

O DNA extraído da bactéria foi digerido pela enzima de restrição *Sau*3AI (PROMEGA). As digestões foram feitas com 12 U da enzima, por 1 minuto a 37°C. Um gel de agarose 1% foi feito para verificar a digestão e para posterior purificação do fragmento com o kit GeneClean III (Bio101).

- Ligação dos fragmentos e clonagem

O DNA genômico digerido e o vetor tratado foram quantificados. De acordo com as quantificações, foi realizada a ligação do vetor com o fragmento, com reação a 4°C, durante a noite. As construções foram transformadas em células competentes DH10B.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

- Obtenção de linhagens resistentes ao limoneno

Os testes de resistência ao limoneno realizados com os inóculos da casca do fruto em decomposição apresentaram os seguintes resultados: todos os inóculos na ausência do óleo essencial contendo limoneno apresentaram crescimento (turbidez do meio). F1A, F2A1 e F2C2 apresentaram crescimento na presença de 20µL de óleo essencial. F1A foi o que apresentou melhores resultados, pois também houve crescimento com 50µL de óleo.

As culturas positivas foram plaqueadas e usadas para identificação bacteriana através de amplificação de DNA por PCR e apresentaram resultados de acordo com a Figura 1.



FIGURA 1. Amplificações dos inóculos positivos ao teste de limoneno.

Para F1A 20, F1A 50 e F2C2 20 os resultados foram melhores, apresentando maior amplificação.

Os três amplificons foram ligados ao vetor pGEM-T e clonadas em células competentes DH10B. Foram obtidos 50 transformantes, destes, 48 foram selecionados para a realização da minipreparação em placa para a extração dos plasmídeos para a realização do sequenciamento. As sequências obtidas foram comparadas ao banco de dados disponível, com o auxílio da ferramenta Blast, e a bactéria foi identificada como do gênero *Staphylococcus*, sendo gram-positiva.

- Preparação de DNA genômico bacteriano

O DNA genômico dos isolados foi extraído e separado em gel de agarose como pode ser observado na Figura 2.

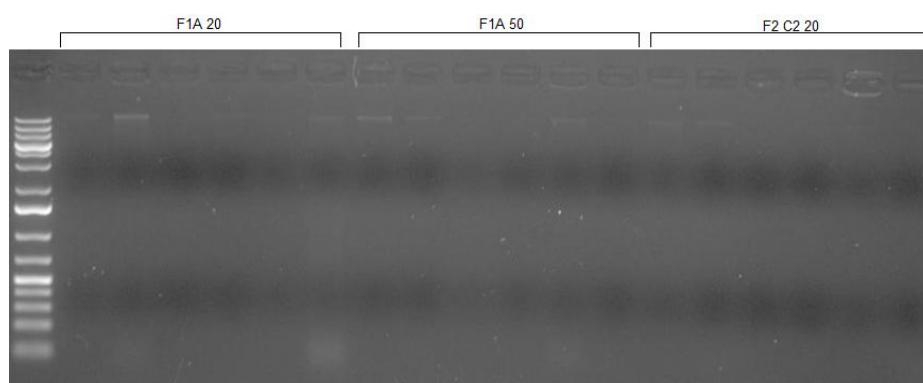


FIGURA 2. Extração do DNA genômico das bactérias resistentes ao limoneno.

As quantidades totais de DNA obtidas foram: F1A 20: 32,06 µg; F1A 50: 16,4 µg; F2 C2 20: 11,64 µg.

As quantidades obtidas permitiram a continuação do trabalho, já que o mínimo proposto para tal fim era de 10 µg.

- Seleção, purificação e digestão do vetor

As minipreparações dos transformantes dos vetores podem ser observados na Figura 3.

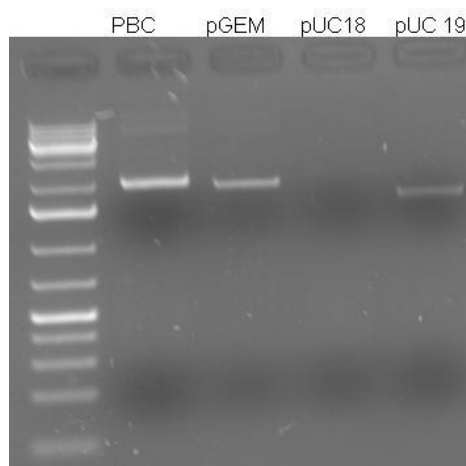


FIGURA 3. Extração de DNA plasmidial dos vetores pBC, pGEM3Z, pUC18.

Como observado os vetores pBC e pGEM foram os que apresentaram melhores resultados. Estes então foram digeridos com a enzima de restrição *Bam*HI (FERMENTAS), como observado na Figura 4:

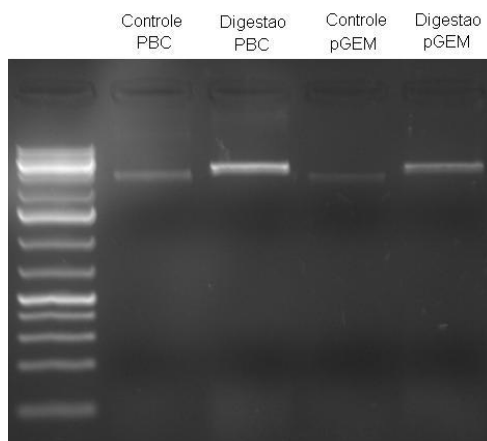


FIGURA 4. Digestão dos vetores pBC e pGEM com a enzima de restrição *Bam*HI, e separados em gel de agarose 1%.

As digestões foram purificadas e tratadas com fosfatase alcalina. Foram feitos testes para verificar a eficácia do tratamento. Para tanto, foram feitas ligações com os vetores tratados e não com fosfatase alcalina, as quais foram usadas para transformação de bactéria competente. O tratamento com fosfatase alcalina levou a incapacidade de obter-se transformantes, mostrando que o tratamento foi eficaz. O vetor pBC apresentou os melhores resultados por levar à obtenção de um maior número de colônias transformadas, sem o tratamento. Este então foi escolhido para a continuação dos trabalhos.

- Digestão do DNA Genômico

A digestão do DNA genômico por *Sau3AI* pode ser observada na Figura 5.

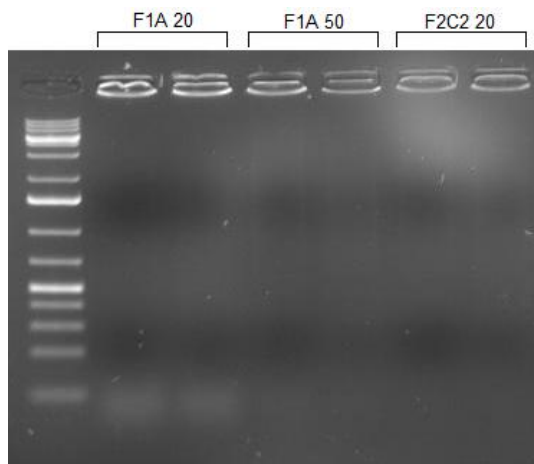


FIGURA 5. Digestão de DNA genômico da bactéria com *Sau3AI*.

O fragmento indicado foi purificado e quantificado, obtendo-se aproximadamente 20ng/uL.

- Ligação dos fragmentos e clonagem

Os fragmentos purificados e o vetor tratado foram ligados, sendo usados para transformação de DH10B, obtendo-se 715 clones em 8 placas de cada (F1A 20, F1A 50 e F2C2 20).

CONCLUSÃO

A bactéria isolada apresentou as características esperadas, sendo classificada como sendo pertencente ao gênero *Staphylococcus* uma bactéria Gram-Positiva. Até o momento foram obtidos 715 clones na biblioteca genômica do isolado bacteriano, um número menor do que a meta desejada. Novas clonagens estão sendo realizadas para obtermos o número de clones necessários.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBITI, pela bolsa concedida.

Ao Centro de Citricultura – IAC, pela oportunidade de estágio.

REFERÊNCIAS

- Berger, R. G.; Krings, U.; Zorn, H. Em Food Flavour Technology; Taylor A. J., ed.; 2002, cap. 3.
- 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, P.K. 1966. Microbiological transformations of terpenes. VIII. Fermentation of limonene in a soil pseudomonad. *Indian Journal of Biochemistry* 3,144-157.
- Dhavalikar, R.S., Rangachari, P.N., Bhattacharyya, P.K. 1966. Microbiological transformations of terpenes. IX. Pathways of degradation of limonene in a soil pseudomonad. *Indian Journal of Biochemistry*, 3,158–164.
- Nonino, E. A.; Perf. Flav. 1997, 22, 53.
- Silva, L. P. M., Takita, M. A. Isolamento e caracterização de linhagem bacteriana capaz de biotransformar limoneno. In: 5º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica - CIIC 2011, 2011, Campinas. Anais do 5º Congresso



Interinstitucional de Iniciação Científica - CIIC 2011. Campinas: Embrapa Monitoramento por Satélite, Campinas, 2011. CD-ROM.

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.