



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013  
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

**BUSCA DE GENES DE RESISTÊNCIA A TERPENOS EM BACTÉRIA**

Mariana Massoco **Tarallo**<sup>1,a</sup>; Marco Aurélio **Takita**<sup>1,b</sup>

<sup>1</sup> Instituto Agrônômico (IAC), Centro de Citricultura Sylvio Moreira

**Nº 13150**

**RESUMO** - O Instituto Agrônômico busca realizar trabalhos funcionais visando à caracterização de genes envolvidos na síntese de terpenos. Assim, está sendo verificada a expressão de genes que codificam terpenos sintases em frutos de laranja doce e tangerina. Nesses trabalhos, foi verificada a composição do óleo essencial de citros e em ambos os casos o principal componente destes óleos foi o limoneno, que pode atingir 95% do total de compostos. Como o óleo essencial de laranja doce é um subproduto da produção do suco concentrado, o valor comercial deste é baixo. Conseqüentemente, o valor do limoneno também é baixo. A biotransformação do limoneno em produtos de valor comercial maior tem sido buscada através de diferentes métodos com destaque para a realizada por microrganismos. Anteriormente, foi feita a clonagem de sequências que codificam proteínas do tipo P450 de citros que poderiam atuar sobre limoneno, modificando-o de modo a gerar novos produtos e, posteriormente, isolou uma linhagem bacteriana capaz de sobreviver em presença de óleo essencial de laranja, demonstrando uma possibilidade de que esta linhagem apresente genes que transformem o limoneno, tornando-o menos tóxico para as células. Posteriormente, foi feita a construção de uma biblioteca genômica a partir de DNA isolado de uma bactéria capaz de crescer em presença de óleo essencial de citros. Agora se busca varrer esta biblioteca através de transformação e análise dos transformantes. Os testes de crescimento feitos a partir dessa biblioteca genômica se mostraram negativos. Assim, tenta-se construir uma nova biblioteca usando um novo microrganismo, *Xanthomonas*.

**Palavras-chaves:** Biotransformação, genes, óleo essencial, resistência, terpeno.

<sup>a</sup> Bolsista CNPq: Graduação em Bacharelado em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos/ Campus Araras, marianamassoco@gmail.com <sup>b</sup> Orientador: Pesquisador, takita@centrodecitricultura.br



**ABSTRACT** - *The Instituto Agronômico aims the functional characterization of genes involved in the synthesis of terpenes. Thus it is being evaluated the expression of genes encoding terpene synthases in fruits of sweet orange and mandarin. In these studies we investigated the composition of the essential oil of citrus and in both cases the principal component of these oils is limonene, which can reach 95% of total compounds. As the essential oil of sweet orange is a byproduct of the production of juice concentrate, its commercial value is low. Consequently, the economical value of limonene is also low. The biotransformation of limonene products of greater commercial value has been sought through different methods with emphasis on the biotransformation carried out by microorganisms. Previously, we cloned sequences encoding P450-type proteins that could act on citrus limonene, modifying it to generate new products, and later we isolated a bacterial strain capable of surviving in the presence of the essential oil of orange demonstrating a possibility that this strain carried genes whose products could act on limonene, making it less toxic to the cells. Subsequently, it was constructed a genomic library from the isolated DNA of a bacterium that can grow in the presence of the essential oil of citrus. This library was tested but the attempts to isolates such genes were negative. Thus, a new library using DNA from a citrus pathogen, Xanthomonas citri pv. citri is currently under construction.*

**Key-words:** Biotransformation, genes, essential oil resistance, terpene.

## 1 INTRODUÇÃO

Terpenos constituem a maior e mais diversa classe de produtos naturais. Apesar de alguns terpenos estarem envolvidos no metabolismo primário de plantas, como os hormônios giberilina (Hedden e Kamiya, 1997) e ácido abscísico (Schwartz e col., 1997), a vasta maioria são classificados como metabólitos secundários. Apresentam funções ecológicas (Langenheim, 1994; Dicke, 1994; Bouwmeester e col., 1999, Pichersky e Gershenzon, 2002), mas também são muito utilizados como agentes de sabores e fragrâncias adicionados a alimentos, bebidas, perfumes, sabões, pasta de dente e outros produtos (Verlet, 1993), além de apresentarem importância farmacológica (Crowell e col., 1992; Van Geldre e col., 1997).

Vários trabalhos têm sido publicados mostrando a composição de óleos essenciais de citros (Dellacassa e col., 1992; Verzera e col., 1998; Verzera e col., 2000; Choi e Sawamura, 2000; Lota e col., 2002; Vekiari e col., 2002; Moufida e Marzouk, 2003; Verzera e col., 2003; Sawamura e col., 2004; Frizzo e col., 2004; Statti e col., 2004; Verzera e col., 2005). Além deles, em projetos



## VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013

13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

recentes, também foi avaliada a composição do óleo essencial da laranja doce e tangerina e, foi verificado que o limoneno é o principal componente deste óleo com até 95% de sua composição.

Por ano, aproximadamente 50 mil toneladas de R - (+) - limoneno são recuperados como subproduto da indústria cítrica mundial, sendo geralmente separado do óleo essencial obtido no suco de laranja pela sua baixa solubilidade em água, alta tendência a autooxidação e polimerização, e formação de 'off-flavors', tornando-se um subproduto industrial adequado para bioconversões a compostos de alto valor comercial (Berger e col., 2002). 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 bacterianas 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). A biotransformação de terpenos é de grande importância por possibilitar a produção de compostos enantiomericamente puros sob condições brandas de reação. Além disso, de acordo com os termos das legislações europeia e norte americana, esses compostos obtidos por biotransformação podem ser considerados naturais (Berger, 1995). Estes podem apresentar valor econômico muito superiores aos de seus substratos e, assim, é bastante importante o isolamento de microrganismos capazes de biotransformar terpenos visando aplicações biotecnológicas. 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 de modificação de limoneno. A atual proposta visa à busca de genes de resistência a terpenos em bactérias.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### Preparação de bactérias competentes

Para fazer as células competentes da linhagem DH10B de *Escherichia coli*, pelo método de Inoue (Inoue e col., 1990), transferiu-se uma colônia para 25 mL de meio SOB (2% peptona, 0.5% extrato de levedura, 10mM cloreto de sódio, 2,5mM cloreto de potássio, 10mM cloreto de magnésio, 10mM sulfato de magnésio). A cultura foi incubada por 8 horas a 37°C com uma rotação de 250rpm. Essa cultura incubada foi usada para inocular 3 frascos contendo 250mL de meio SOB. O primeiro recebeu 10 mL da cultura incubada, o segundo recebeu 4 mL e o terceiro recebeu 2 mL. Os 3 frascos foram incubados por 16 horas à 18°C no *shaker* a uma rotação de 200 rpm. No



## VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013

13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

dia seguinte, mediu-se a OD<sub>600</sub> das 3 culturas, monitorando-se o crescimento a cada 45 minutos. Quando a OD<sub>600</sub> de uma das culturas atingiu 0,55, esta era transferida para um banho de gelo-água por 10 minutos. Assim as outras 2 culturas eram descartadas. Centrifugou-se a 2500 g por 10 minutos à 4°C e o meio foi descartado. As células foram ressuspensas em 80 mL do tampão de transformação (55 mM cloreto de manganês, 15 mM cloreto de cálcio, 250 mM cloreto de potássio, 0,01 M PIPES, pH 6,7) com movimentos circulares. Centrifugou-se as células a 2500g por 10 minutos à 4°C. Descartou-se o meio. Para o armazenamento das células competentes, elas eram ressuspensas em 20 mL de do tampão de transformação, adicionando-se 1.5 mL de dimetil-sulfoxido, e misturando-se com movimentos circulares e deixando-se no gelo por 10 minutos. Alicotou-se então 100 µL em microtubos, congelando-se no nitrogênio líquido. As células foram então armazenadas a - 80°C. A eficiência de transformação foi calculada transformando-se 100 µL de células competentes com 0,1 ng de pGEM-3Z e plaqueando-se 100 µL da suspensão diluída serialmente por um fator de 10 x. Os transformantes obtidos foram contados e multiplicados pelo fator de diluição.

### **Transformação bacteriana**

Cinco microlitros das ligações foram usados para transformação misturando-se 100 µL de suspensão de células. O tubo foi incubado em gelo por 30 minutos e foi dado um choque térmico a 42°C por 45 segundos. As células voltaram para o gelo por 2 minutos quando foi adicionado 1 mL de SOC (2% triptona, 0.5% extrato de levedura, 0.05% NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM glicose adicionados após autoclavação) pré-aquecido. Os tubos foram incubados a 37°C por 1 hora com agitação (250rpm) e 100 µL de células foram distribuídos em placas com meio LB contendo 100 µL de ampicilina. As placas foram incubadas durante a noite em estufa a 37°C.

### **Teste de crescimento**

Os transformantes foram crescidos em meio LB contendo ampicilina em presença de óleo essencial (20-50 µL/mL de meio) e deixados no shaker a 37°C (250 rpm) por pelo menos 16 horas. Os transformantes capazes de crescer nesse meio seriam plaqueados no mesmo meio contendo ampicilina, isolando-se colônias.

### **Construção da biblioteca de *Xanthomonas***

O DNA genômico de uma linhagem de *Xanthomonas citri* pv *citri* (306) foi digerido usando a enzima de restrição *Sau3AI* (15 µL de DNA, 0.1 µL da enzima, 2 µL do Buffer React 4 10x, 2.9 µL de água), incubando-se à 37°C por 10 minutos. O resultado da digestão foi verificado em gel de agarose 1%. As bandas do gel foram cortadas usando a luz UV, com o fragmento cortado estando



## VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013

13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

entre 1500 a 5000 pb. Esses fragmentos foram purificados usando o MinElute Gel Extraction Kit (250). Novamente, o resultado dessa purificação foi observado em gel de agarose 1% e as bandas do gel cortadas conforme descrito à cima. Foi feita uma nova purificação da mesma forma como anteriormente e o fragmento obtido foi usado para fazer a ligação no plasmídeo pJET1.2 (Fermentas) usando o Clone Jet PCR Cloning Kit conforme as especificações do fabricante. Essa ligação foi usada para a transformação bacteriana.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foi feita a preparação de bactérias competentes pelo método de Inoue. A eficiência de transformação obtida para estas células competentes foi de aproximadamente  $10^7$  transformantes/ $\mu\text{g}$  DNA.

Estas células foram usadas para transformação com a biblioteca construída no projeto PIBITI anterior, quando foram obtidos 2684 transformantes, dos quais 2400 clones escolhidos para a comporem o universo de trabalho com esta biblioteca. Estes transformantes foram testados individualmente em meio contendo óleo essencial de laranja doce (100  $\mu\text{L}$  em 2 mL de meio), não obtendo-se nenhum crescimento. A partir daí, outra forma de avaliação foi tentada, com o crescimento dos transformantes em meio sem óleo essencial por 16 horas e, no dia seguinte, transferência de 10  $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana para novo meio, agora contendo diferentes concentrações de óleo essencial. O crescimento foi verificado após mais 24 horas de crescimento a 37°C com agitação de 250 rpm, conforme a Tabela 1 e Figura 1.

Tabela 1. Avaliação do crescimento de transformantes, portanto a biblioteca genômica de bactéria capaz de crescer em presença de óleo essencial de citros.

| Amostra                   | Óleo Essencial |        |       |      |      |    |    |     |
|---------------------------|----------------|--------|-------|------|------|----|----|-----|
|                           | 0              | 1,5625 | 3,125 | 6,25 | 12,5 | 25 | 50 | 100 |
| Transformante             | +              | -      | -     | -    | -    | -  | -  | -   |
| Controle não transformado | +              | -      | -     | -    | -    | -  | -  | -   |

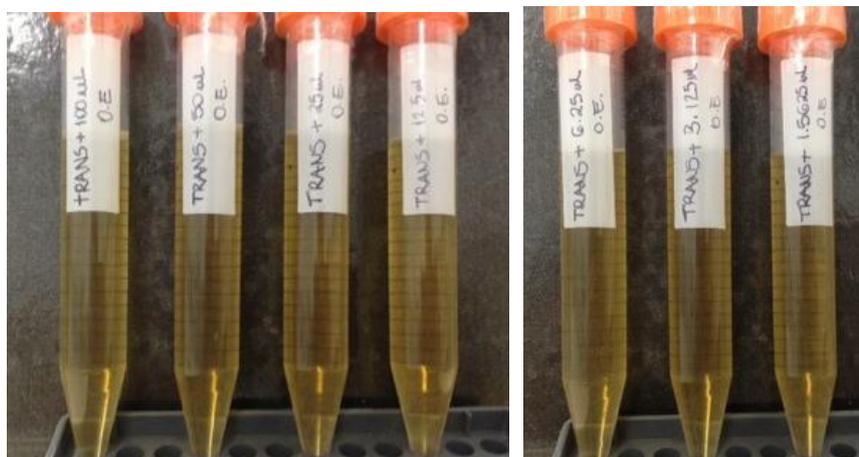


Figura 1: Teste de crescimento dos transformantes em diferentes concentrações do óleo essencial.

Esta ausência de crescimento pode indicar que teríamos que provavelmente varrer muito mais clones, se feito individualmente. Todavia, o fato de não termos obtido sucesso mesmo usando as bactérias crescidas sem seleção pelo óleo, sugere que talvez a expressão do gene não funcione em *E. coli* ou que não tenhamos pego uma unidade transcricional suficientemente grande para permitir a expressão. Diante destes resultados, procurou-se uma outra alternativa para obtenção de genes que codificam proteínas capazes de biotransformar limoneno. O cancro cítrico é uma das principais doenças de citros e é causada pela bactéria *Xanthomonas citri* pv. *citri*. É uma bactéria gram negativa que é dispersa pelo vento e pela ação do homem, e que ataca todas as partes da planta, inclusive os frutos, onde se concentram grandes quantidades de óleo essencial dos citros. Deste modo, esta bactéria poderia ser de fato uma boa alternativa para busca de genes capazes de conferir um fenótipo de resistência ao óleo essencial de citros. Esta nova biblioteca está sendo construída através da purificação de fragmentos de 1,5 a 5 Kb, produtos da digestão parcial com *Sau3AI* (Figura 2).

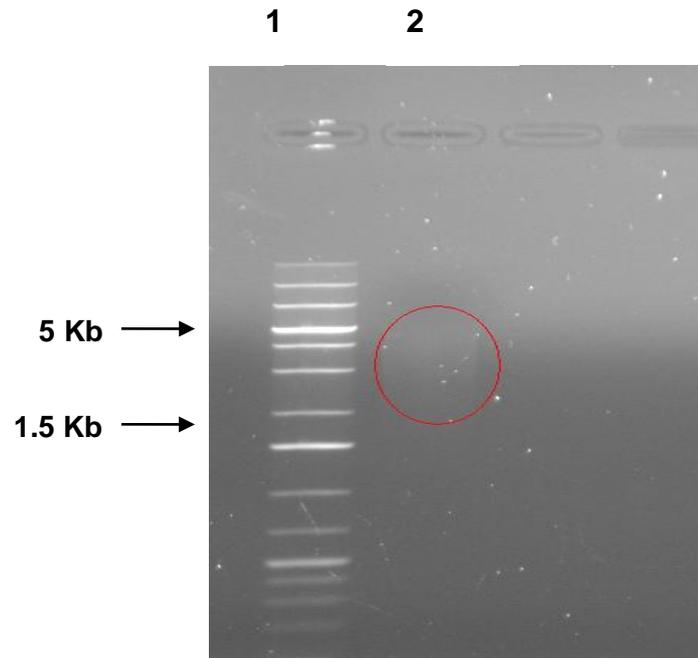


Figura 2: Gel de agarose 0.7% da purificação com os fragmentos de 1.5 a 5 Kb. 1 = Marcador GeneRuler 1Kb Plus DNA (Fermentas); 2 = resultado da purificação

#### 4 CONCLUSÃO

Usou-se uma biblioteca genômica construída a partir de DNA isolado de uma bactéria capaz de crescer em presença de óleo essencial, com o intuito de isolar-se genes que possibilitam a biotransformação de limoneno, principal componente do óleo essencial de citros. Ao varrer-se esta biblioteca através de transformação e análise dos transformantes, constatou-se que não fomos capazes de . Sendo assim, uma nova biblioteca está sendo construída usando um novo microrganismo, *Xanthomonas*.

#### 5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBITI, pela bolsa concedida.

Ao IAC, pela oportunidade de estágio.

#### 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, R. P. 1995. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, p. 469.



## VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013

13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

- Berger, R.G. 1995. *Aroma biotechnology*. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag.
- Berger, R.G., Krings U., Zorn H. 2002. Biotechnological flavour generation, In A.J. Taylor, *Food flavour technology*. Weimar: C.H.I.P.S Press. p. 60-104.
- Bouwmeester, H. J., Verstappen, F. W., Posthumus, M. A., Dicke, M. 1999. Spider mite-induced (3S)-( $\epsilon$ )-nerolidol synthase activity in cucumber and lima bean. The first dedicated step in acyclic C11-homoterpene biosynthesis. *Plant Physiol.*121, 173-180.
- 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.
- Choi, H.-S., Sawamura, M. 2000. Composition of the Essential Oil of *Citrus tamurana* Hort. Ex Tanaka (Hyuganatsu). *J. Agric. Food Chem.* 48, 4868-4873.
- Frizzo, C. D., Lorenzo, D. Dellacassa, E. 2004. Composition and Seasonal Variation of the Essential Oils from Two Mandarin Cultivars of Southern Brazil. *Agric. Food Chem.* 52, 3036-3041.
- Langenheim, J. H. (1994) Higher Plant Terpenoids: A Phyto-centric Overview of Their Ecological Roles. *J.Chem. Ecol.* 20: 1223-1280.
- Lota, M.-L., Serra, D. de R., Tomi, F., Jacquemond, C., Casanova, J. 2002. Volatile Components of Peel and Leaf Oils of Lemon and Lime Species. *J. Agric. Food. Chem.* 50, 796-805.
- Statti, G. A., Conforti, F., Sacchetti, G., Muzzoli, M., Agrimonti, C., Menichini, F. 2004. Chemical and biological diversity of Bergamot (*Citrus bergamia*) in relation to environmental factors. *Fitoterapia* 75: 212–216
- Verzera, A., Trozzi, A., Cotroneo, A., Lorenzo, D., Dellacassa, E. 2000. Uruguayan Essential Oil. Composition of Nova and Satsuma Mandarin Oils. *Agric Food Chem* 48, 2903-2909.
- Vora, J. D., Matthew, R. F., Crandall, P. G., Cook, R. 1983. Preparation and chemical composition of orange oil concentrates. *J.Food Sci.* 48, 1197-1199.
- Weiss, E.A. 1997. *Essential Oil Crops*, CAB International, Wallingford, UK. R.