

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos
Filipe Augusto Teixeira

ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS RESISTENTES A LIMONENO E
CARACTERIZAÇÃO DO MECANISMO MOLECULAR

Diamantina
2019

Filipe Augusto Teixeira

**ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS RESISTENTES A LIMONENO E
CARACTERIZAÇÃO DO MECANISMO MOLECULAR**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Molina

Co-orientador: Prof. Dr. Tiago Antônio de Oliveira Mendes

Diamantina

2019

Elaborado com os dados fornecidos pelo autor.

T266i Teixeira, Filipe Augusto
 Isolamento de microrganismos resistentes a limoneno e caracterização
 do mecanismo molecular / Filipe Augusto Teixeira, 2019.
 55 p. : il.

Orientador: Gustavo Molina
Coorientador: Tiago Antônio de Oliveira Mendes

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Vales do
Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2019.

1. Monoterpenos. 2. Limoneno. 3. Bioprocesso. 4. Bioconversão. 5.
Genômica comparativa. I. Molina, Gustavo. II. Mendes, Tiago Antônio
de Oliveira. III. Título IV. Universidade Federal dos Vales do
Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 664

FILIFE AUGUSTO TEIXEIRA

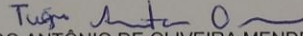
**Isolamento de microrganismos resistentes a limoneno e
caracterização do mecanismo molecular**

Dissertação apresentada ao
MESTRADO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, nível
de MESTRADO como parte dos
requisitos para obtenção do título de
MESTRE EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

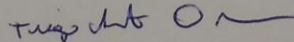
Orientador (a): Prof. Dr. Gustavo
Molina

Co-orientador: Prof. Dr. Tiago Antônio
de Oliveira Mendes

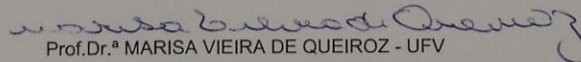
Data da aprovação : 09/08/2019



Prof.Dr. TIAGO ANTÔNIO DE OLIVEIRA MENDES - UFV



Prof.Dr.ª CINTIA LACERDA RAMOS - UFVJM



Prof.Dr.ª MARISA VIEIRA DE QUEIROZ - UFV

DIAMANTINA

À Rosa mais amada, mulher forte e corajosa, quem me deu a vida e me ensinou a vivê-la.

Sempre presente, nas ações, pensamentos e conquistas, dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser meu refúgio e amigo bem presente. Sempre disposto a ensinar com paciência, amor e uma gentileza que excede qualquer merecimento. Obrigado por ter me dado força e condições para concluir cada etapa desta jornada.

Ao meu orientador Gustavo Molina, pela oportunidade de trabalharmos juntos neste projeto, por seus conselhos e ideias oportunas, pela paciência e gentileza dignas de um monge, dedicação e generosidade em compartilhar suas experiências. Com certeza, ter sido seu aluno foi uma das melhores oportunidades profissionais que pude ter.

Ao meu Coorientador Tiago Mendes, que de forma animadora nos deu suporte sem igual e de uma maneira espetacular. Muito obrigado por me receber em Viçosa, por suas ideias e incrível disposição para com o projeto. A nossa profissão carece de profissionais tão dedicados, competentes e que sirvam de fonte de inspiração como você.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA), pela ajuda, motivação e disponibilidade sem medidas. Vocês são exemplo de competência.

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

À UFVJM pela oportunidade de cursar este programa de pós-graduação e por proporcionar um dos melhores períodos de minha carreira.

À UFV pela parceria firmada e colaboração na estruturação des trabalho.

À banca examinadora, pela dedicação e disposição em nos ajudar a aperfeiçoar este trabalho.

À minha eterna senhora, musa, grande amor e mãe, Rosa. Mesmo separados fisicamente, estamos unidos eternamente pela herança de amor, ensinamentos, exemplo de caráter e vida. Saudades eternas.

Ao meu pai Edson, que é exemplo de competência, dedicação e trabalho. Obrigado por ser o homem que em todos os gestos me ensina e inspira a ser melhor.

Às minhas irmãs, pela amizade e carinho, pelos abraços e brigas. Vocês são de longe, a melhor parte e o resumo do amor de nossos pais.

Às minhas primas/irmãs, Nina e Chá, que mesmo distantes fisicamente estiveram presentes me fazendo lembrar da família e amigos.

À minha amada amiga/irmã Patrícia, por ser instrumento de Deus em minha vida, pelo incondicional amor e refúgio para sorrir e chorar.

À minha mãe na ciência, amiga e eterna professora Christiane Contigli, fonte de inspiração, dedicação e comprometimento.

Ao meu tio Romero, que foi meu suporte por um longo tempo e conselheiro em vários momentos da vida.

Às minhas queridas amigas Josi e Renata, por cada momento de descontração e também de desespero causados pelo mestrado.

Aos meus amigos do Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, Josi, Renata, Kele, Bibi, Carlos e Dayane, pelo apoio, amizade, risadas e lanches compartilhados.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Sintética e Modelagem de Sistemas Biológicos e também do Laboratório de Biologia Molecular, em especial Lis, Alexandre, Bruno e Raquel. A estadia em Viçosa com certeza foi melhor com vocês.

Ao Walyson e ao professor Sérgio pela imensa ajuda e disposição sem igual para a realização das dosagens de cromatografia.

Ao professor Luciano pela doação de linhagens de leveduras utilizadas neste trabalho e também à professora Marisa pela doação de linhagens de *Bacillus*.

Aos docentes e colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) pelos ensinamentos compartilhados e pela amizade.

Meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma contribuiriam para a realização des trabalho, sem vocês eu não teria alcançado esta conquista.

RESUMO

Os compostos de aroma são um dos ingredientes mais utilizados nas indústrias de alimentos e bebidas, e têm recebido grande atenção por parte dos consumidores por produtos naturais e obtidos com menor impacto ao meio ambiente. Desta forma, a alternativa mais apropriada para a substituição dos tradicionais processos de formulação química para obtenção destes compostos é pela produção biotecnológica. Além do apelo ambiental, esta estratégia se destaca pelas vantagens na especificidade de produção e condições brandas de processo. O limoneno, monoterpeneo muito abundante no Brasil obtido a partir do processamento de laranja, além do seu baixo custo e disponibilidade, é muito estudado em processos de bioconversão, tornando-se um candidato promissor para a obtenção de compostos de maior valor agregado. Entretanto, sua toxicidade para microrganismos é um fator limitante para o desenvolvimento de novos bioprocessos. Com a finalidade de viabilizar o emprego desta estratégia, a bioprospecção por microrganismos robustos e que sejam capazes de tolerar a toxicidade de solventes orgânicos, como a dos terpenos, tem sido colocada em prática de forma corriqueira. Neste enfoque, este trabalho teve como objetivos principais, isolar microrganismos com perfil de resistência ao limoneno, identificá-los por marcadores genéticos e investigar os potenciais mecanismos moleculares relacionados a este fenótipo. A partir de fontes vegetais, foram isolados e selecionados 29 microrganismos com tolerância a 2% de limoneno. Com o uso de marcadores moleculares (16S rRNA e região ITS), sete isolados puderam ser identificados, sendo seis bactérias e uma levedura. Todos os representantes bacterianos pertencem ao gênero *Bacillus*, sendo dois deles identificados a nível de espécie, como *B. cereus* e *B. mycoides*. A levedura isolada foi identificada como *Meyerozyma caribbica*. Uma comparação do perfil de crescimento e posterior teste de viabilidade celular revelou indícios de que o limoneno possa exercer efeito bacteriostático em representantes do gênero *Bacillus*. Através de abordagem computacional, os genomas de cinco leveduras utilizadas pela indústria de alimentos foram comparados ao genoma de *M. caribbica*. Esta genômica comparativa resultou na identificação de 58 agrupamentos de genes exclusivos de *M. caribbica* e que contém 26 genes relacionados a transportadores do tipo MFS. Após dosar limoneno intracelular de quatro leveduras expostas ao terpeno, foi possível observar que os níveis presentes em *M. caribbica* são menores do que aqueles encontrados nas outras leveduras submetidas ao processo. Desta forma, foi possível inferir que o mecanismo de resistência pode estar relacionado aos genes codificantes de proteínas transportadoras. Os resultados deste trabalho representam importante avanços na busca de

potenciais microrganismos capazes de tolerar o limoneno e que sejam passíveis de serem utilizados para viabilizar a produção de compostos de valor agregado a partir deste terpeno.

Palavras chave: Monoterpenos. Limoneno. Bioprocesso. Bioconversão. Genômica comparativa.

ABSTRACT

Aroma compounds are one of the most widely used ingredients in the food and beverage industries, and have received widespread attention from consumers for natural and environmentally friendly products. Thus, the most appropriate alternative to replace traditional chemical formulation processes to obtain these compounds is by biotechnological production. In addition to the environmental appeal, this strategy stands out for its advantages in production specificity and soft process conditions. Limonene, a very abundant monoterpene obtained from orange processing in Brazil, in addition to its low cost and availability, is widely studied in bioconversion processes, making it a promising candidate for obtaining higher added value compounds. However, its toxicity to microorganisms is a limiting factor for the development of new bioprocesses. In order to make the use of this strategy feasible, bioprospecting by robust microorganisms that are able to tolerate the toxicity of organic solvents, such as terpenes, has been routinely practiced. In this approach, the main objectives of this work were to isolate microorganisms with limonene resistance profile, to identify them by genetic markers and to investigate the potential molecular mechanisms related to this phenotype. From plant sources, 29 microorganisms with 2% tolerance of limonene were isolated and selected. Using molecular markers (16S rRNA and ITS region), seven isolates could be identified, six bacteria and one yeast. All bacterial representatives belong to the genus *Bacillus*, two of which are identified at species level, such as *B. cereus* and *B. mycoides*. Isolated yeast was identified as *Meyerozyma caribbica*. A comparison of the growth profile and subsequent cell viability test revealed evidence that limonene may exert bacteriostatic effect on representatives of the genus *Bacillus*. Through a computational approach, the five yeast genomes used by the food industry were compared to the *M. caribbica* genome. This comparative genomics resulted in the identification of 58 unique *M. caribbica* gene clusters containing 26 genes related to MFS transporters. After dosing intracellular limonene of four yeasts exposed to the terpene, it was observed that the levels present in *M. caribbica* are lower than those found in other yeasts submitted to the process. Thus, it was possible to infer that the mechanism of resistance may be related to the genes encoding transporter proteins. The results of this work represent important advances in the search for potential microorganisms that can tolerate limonene and that can be used to enable the production of value-added compounds from this terpene.

Keywords: Monoterpenes. Limonene. Bioprocess. Bioconversion. Comparative genomics.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	15
REFERÊNCIAS	18
CAPÍTULO 1 - ISOLAMENTO, SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROORGANISMOS RESISTENTES AO LIMONENO	21
RESUMO.....	21
ABSTRACT	21
<i>1.1 Introdução.....</i>	<i>22</i>
<i>1.2 Materiais e Métodos.....</i>	<i>23</i>
<i>1.2.1 Isolamento de microrganismos a partir de espécies vegetais</i>	<i>23</i>
<i>1.2.2 Seleção de microrganismos com perfil de resistência ao limoneno.....</i>	<i>24</i>
<i>1.2.3 Caracterização por genes constitutivos</i>	<i>24</i>
<i>1.2.4 Teste de resistência ao limoneno de espécies do gênero Bacillus</i>	<i>26</i>
<i>1.3 Resultados e Discussão.....</i>	<i>27</i>
<i>1.3.1 Isolamento e seleção de microrganismos a partir de espécies vegetais</i>	<i>27</i>
<i>1.3.2 Caracterização por genes constitutivos</i>	<i>28</i>
<i>1.3.3 Teste de resistência ao limoneno de espécies do gênero Bacillus</i>	<i>30</i>
<i>1.4 Conclusão.....</i>	<i>35</i>
REFERÊNCIAS	35
CAPÍTULO 2 – IDENTIFICAÇÃO DOS POTENCIAIS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DE <i>Meyerozyma caribbica</i> AO LIMONENO POR GENÔMICA COMPARATIVA	39
RESUMO.....	39
ABSTRACT	39
<i>2.1 Introdução.....</i>	<i>40</i>
<i>2.2 Materiais e Métodos.....</i>	<i>41</i>
<i>2.2.1 Microrganismos e meio de cultura.....</i>	<i>41</i>
<i>2.2.2 Teste de resistência ao limoneno.....</i>	<i>42</i>
<i>2.2.3 Genômica comparativa</i>	<i>42</i>
<i>2.2.4 Doseamento de limoneno.....</i>	<i>43</i>
<i>2.2.5 Análise estatística.....</i>	<i>45</i>
<i>2.3 Resultados e Discussão.....</i>	<i>45</i>
<i>2.3.1 Teste de resistência ao limoneno.....</i>	<i>45</i>
<i>2.3.2 Genômica comparativa</i>	<i>49</i>

<i>2.3.3 Doseamento de limoneno</i>	51
<i>2.4 Conclusão</i>	52
REFERÊNCIAS	53
CONSIDERAÇÕES FINAIS	55

INTRODUÇÃO GERAL

As indústrias de aromas e fragrâncias fornecem compostos para a produção de perfumes, produtos de limpeza e higiene bucal, detergentes e principalmente aditivos para setores alimentícios e de bebidas (CARROLL; DESAI; ATSUMI, 2016). Este setor industrial apresentou mercado avaliado em cerca de US\$ 28,2 bilhões em 2017 (IAL CONSULTANTS, 2018) e taxa de crescimento anual predita de 6,2% de 2016 a 2024 (“Transparency Market Research: Aroma Chemicals Market - Global Industry Analysis, Size, Growth, Trends, and Forecast 2016-2024”, 2017). Além disso, a expectativa de crescimento para o mercado de aromas também está relacionada às recentes aplicações destes compostos na síntese de combustíveis de alta energia, solventes e precursores farmacêuticos (PERALTA-YAHYA *et al.*, 2012).

Dentre as diversas classes químicas usadas por esta indústria, os terpenos são os representantes dos compostos supracitados mais notórios em razão de sua abundância (SALES *et al.*, 2018) e, dentre eles, destaca-se o limoneno (JONGEDIJK *et al.*, 2016).

O limoneno é um monoterpreno cíclico presente em óleos essenciais de frutas cítricas, como limão, lima, e especialmente laranjas, além de hortelã e em abetos, árvores coníferas do gênero *Abies* (JONGEDIJK *et al.*, 2016; PÉREZ-MOSQUEDA *et al.*, 2015). Pode ser encontrado em mais de 300 espécies vegetais e em duas formas enantioméricas, D- ou R-(+)-limoneno e L- ou S(-)-limoneno, e são os monoterprenos mais abundantes na natureza (MARÓSTICA JÚNIOR; PASTORE, 2007).

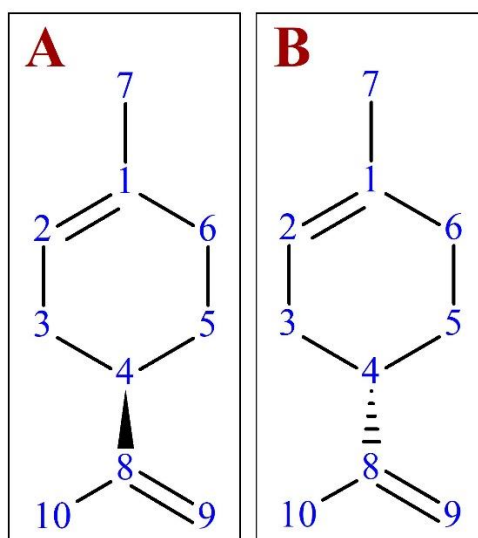
Este composto é recuperado majoritariamente como subproduto da indústria de processamento de suco de laranja (atingindo 60-70 mil toneladas por ano) (JONGEDIJK *et al.*, 2016; KERTON, 2009; LAWRENCE, 2009). O R-(+)-limoneno é frequentemente utilizado como aditivo na produção de cosméticos, perfumes e produtos de limpeza devido ao seu agradável aroma cítrico de laranja, enquanto o S(-)-limoneno é encontrado em ervas, por exemplo, *Mentha* spp (DUETZ *et al.*, 2003) e apresenta odor áspero de terebintina com notas de limão (CARROLL; DESAI; ATSUMI, 2016; DUETZ *et al.*, 2003; FRIEDMAN; MILLER, 1971). Ademais, o limoneno pode ser utilizado como inseticida (CIRIMINNA *et al.*, 2014), substituto de solventes orgânicos (FISCHER, 2013), suplemento de combustíveis de jato (RENNINGER; RYDER; FISHER, 2008), e em aplicações na área médica em virtude de suas propriedades antimicrobianas e anticarcinogênicas (INOUE; TAKIZAWA; YAMAGUCHI, 2001; MILLER *et al.*, 2011).

A ação antimicrobiana do limoneno pode ser bastante eficaz, principalmente no que concerne à quantidade de terpeno empregada. Em um trabalho utilizando óleo essencial de limão (*Citrus lemon* L.) foi possível observar que mesmo em baixas concentrações houve inibição do crescimento de três espécies de fungo que afetam videiras (Ammad et al., 2018). Outro exemplo interessante do uso de limoneno foi alcançado por Shao e colaboradores, 2018, ao utilizar este terpeno como um dos ingredientes para desenvolver um revestimento para frutas visando aumentar a vida de prateleira.

A estrutura do limoneno (Figura 1) é susceptível a modificações químicas graças a duas ligações duplas insaturadas presentes na molécula, uma interna (C1-C2) e outra terminal (C8-C9), e a possibilidade de hidroxialquilação (adição de grupo hidroxila) (WILBON; CHU; TANG, 2013). Importantes derivados obtidos a partir do limoneno, como, α -terpineol, carveol, carvona e mentol são amplamente utilizados, especialmente os dois últimos, como compostos de aroma (MARÓSTICA JÚNIOR; PASTORE, 2007).

As modificações químicas geralmente aumentam o valor do produto. Por exemplo, o preço médio do limoneno é de aproximadamente 9-10 dólares o quilo, enquanto o (-)-mentol é vendido a 15-40 dólares o quilo conforme apresentado por Lange (2015). Em outra comparação, utilizando como fonte o banco de dados Molbase (www.molbase.com), Felipe e colaboradores (2017) evidenciam que os valores de derivados oxigenados podem atingir de 10 a 30 vezes o valor do substrato. Neste caso, o valor de referência do (+)-limoneno é de 34 dólares o litro e seus derivados carvona, álcool perfílico e carveol possuem valores de 350, 405 e 529 dólares o litro, respectivamente.

Figura 1: Estrutura química do limoneno. Representação das formas enantiômeras do limoneno (fórmula empírica: C₁₀H₁₆). Em A: D-/R-/(+)-limoneno e B: (L-/S-/(-)-limoneno. (BURDOCK, 2010; DUETZ *et al.*, 2003). A numeração em azul configura os 10 carbonos presentes nas moléculas (propriedade de monoterpene)



A elevada produtividade anual e, conseqüentemente, o preço acessível, associado a possibilidade de produção de compostos de alto valor agregado e de ser um dos terpenos mais estudados em processos de biotransformações (SALES *et al.*, 2018), contribuem para que o limoneno seja um excelente substrato utilizado em processos biotecnológicos.

De forma geral, existem duas formas de obtenção de compostos de aroma por processos biotecnológicos: a síntese “*de novo*”, na qual substratos simples como a glicose, por exemplo, são convertidos em compostos de aroma (GUPTA; PRAKASH; GUPTA, 2015); e a bioconversão/biotransformação emprega substratos bem específicos para a obtenção de cada tipo de produto, como por exemplo o uso de limoneno para a produção de α -terpineol (PESSÔA *et al.*, 2019).

Em última instância do uso da biotecnologia em bioprocessos, existe a utilização de técnicas de manipulação genética com a finalidade de direcionar o metabolismo de organismos vivos. Esta é uma refinada estratégia para a obtenção de compostos de difícil síntese química ou baixa disponibilidade na natureza, como por exemplo, a produção de álcool perfílico a partir de limoneno (ALONSO-GUTIERREZ *et al.*, 2013a).

Embora os processos biotecnológicos apresentem vantagens ao processo químico, existem fatores limitantes envolvendo o uso do limoneno como precursor naquele tipo de abordagem. A baixa estabilidade química permite a auto-oxidação do limoneno em meios aquosos (VAN DER WERF; DE BONT; LEAK, 1997), mas a principal limitação no uso do limoneno como substrato está relacionada a sua toxicidade para os microrganismos empregados nos processos biotecnológicos (GRIFFIN, S.; WYLLIE; MARKHAM, 1999).

Dessa forma, este trabalho teve como principais objetivos prospectar microrganismos que apresentassem fenótipo de resistência ao limoneno e investigar tais mecanismos por meio de genômica comparativa visando a possibilidade de manipular geneticamente potenciais isolados para a produção de compostos de valor agregado a partir do limoneno.

O trabalho está dividido em dois capítulos, nos quais são apresentados desde o isolamento de linhagens resistentes ao limoneno, seleção e identificação destes microrganismos e uma breve comparação do perfil de resistência entre bactérias do gênero *Bacillus*. Posteriormente é apresentada a genômica comparativa de leveduras, com a qual foi tangível postular um possível mecanismo biológico relacionado ao perfil de resistência observado em uma levedura isolada.

REFERÊNCIAS

ALONSO-GUTIERREZ, Jorge *et al.* Metabolic engineering of *Escherichia coli* for limonene and perillyl alcohol production. *Metabolic Engineering*, v. 19, p. 33–41, 2013.

BURDOCK, George A. *Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients*. 6th. ed. [S.l.]: Taylor & Francis Group, 2010.

CARROLL, Austin L.; DESAI, Shuchi H.; ATSUMI, Shota. Microbial production of scent and flavor compounds. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 37, p. 8–15, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2015.09.003>>.

CIRIMINNA, Rosaria *et al.* Limonene: a versatile chemical of the bioeconomy. *Chem. Commun.*, v. 50, n. 97, p. 15288–15296, 2014. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C4CC06147K>>.

DUETZ, W. A. *et al.* Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts, and plants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 61, n. 4, p. 269–277, 2003.

FELIPE, Lorena de Oliveira; OLIVEIRA, Ana Maria De; BICAS, Juliano Lemos. Bioaromas – Perspectives for sustainable development. *Trends in Food Science and Technology*, v. 62, p. 141–153, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2017.02.005>>.

FISCHER, K. Terpenes replacing BTEX in oil field. 2013. Disponível em: <<http://www.aogr.com/magazine/editors-choice/terpenes-replacing-btex-in-oil-field>>.

FRIEDMAN, L; MILLER, J G. Odor incongruity and chirality. *Science*, v. 172, n. 987, p. 1044–1046, 1971. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=5573954>.

GRIFFIN, S.; WYLLIE, S. Grant; MARKHAM, J. Determination of octanol-water partition coefficient for terpenoids using reversed-phase high-performance liquid chromatography.

Journal of Chromatography A, v. 864, n. 2, p. 221–228, 1999.

GUPTA, Charu; PRAKASH, Dhan; GUPTA, Sneha. A Biotechnological Approach to Microbial Based Perfumes and Flavours. *Journal of Microbiology & Experimentation*, v. 2, n. 1, p. 1–8, 2015.

IAL CONSULTANTS. *An Overview of the Global Flavours & Fragrances Market, 11th Edition*. [S.l.: s.n.], 2018.

INOUE, S.; TAKIZAWA, T.; YAMAGUCHI, H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 47, n. 5, p. 565–573, 1 maio 2001. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12156-010-0066-8>>.

JONGEDIJK, Esmer *et al.* Biotechnological production of limonene in microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 100, n. 7, p. 2927–2938, 2016.

KERTON, F. M. *Alternative Solvents for Green Chemistry*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2009. Disponível em: <<http://ebook.rsc.org/?DOI=10.1039/9781849736824>>. (Green Chemistry Series).

LANGE, Bernd Markus. Biosynthesis and Biotechnology of High-Value p-Menthane Monoterpenes, Including Menthol, Carvone, and Limonene. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. [S.l.: s.n.], 2015. v. 123. p. 319–353. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/10_2014_289>.

LAWRENCE, B. M. A preliminary report on the world production of some selected essential oils and countries. *Perfumer & Flavorist*, v. 34, p. 38–44, 2009.

MARÓSTICA JÚNIOR, Mário Roberto; PASTORE, Gláucia Maria. Biotransformação de limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 382–387, abr. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000200027&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

MILLER, Jessica A. *et al.* d-Limonene: a bioactive food component from citrus and evidence for a potential role in breast cancer prevention and treatment. *Oncology Reviews*, v. 5, n. 1, p. 31–42, 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12156-010-0066-8>>.

PERALTA-YAHYA, Pamela P. *et al.* Microbial engineering for the production of advanced biofuels. *Nature*, v. 488, n. 7411, p. 320–328, 2012.

PÉREZ-MOSQUEDA, Luis M. *et al.* Formulation and optimization by experimental design of eco-friendly emulsions based on d-limonene. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 128, p. 127–131, 2015.

PESSÔA, Marina G. *et al.* Newly isolated microorganisms with potential application in biotechnology. *Biotechnology Advances*, v. 37, n. 2, p. 319–339, mar. 2019.

RENNINGER, Neil Stephen; RYDER, Jason A.; FISHER, Karl J. *Jet fuel compositions and*

methods of making and use same US Patent WO2008133658. . [S.l: s.n.]. , 2008

SALES, Adones *et al.* Biogeneration of aroma compounds. *Current Opinion in Food Science*, v. 19, p. 77–84, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.03.005>>.

Transparency Market Research: Aroma Chemicals Market - Global Industry Analysis, Size, Growth, Trends, and Forecast 2016-2024. . Albany, NY: [s.n.], 2017. Disponível em: <<https://www.transparencymarketresearch.com>>.

VAN DER WERF, Mariët; DE BONT, Jan; LEAK, David. Opportunities in microbial biotransformation of monoterpenes. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, v. 55, p. 147–177, 1997.

WILBON, Perry A.; CHU, Fuxiang; TANG, Chuanbing. Progress in renewable polymers from natural terpenes, terpenoids, and rosin. *Macromolecular Rapid Communications*, v. 34, n. 1, p. 8–37, 2013.

CAPÍTULO 1 - ISOLAMENTO, SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROORGANISMOS RESISTENTES AO LIMONENO

RESUMO

A demanda do mercado consumidor por produtos ambientalmente favoráveis tem impulsionado os setores de produção industrial como, por exemplo, a indústria de aromas, a buscarem alternativas biotecnológicas para a obtenção dos compostos de interesse. Além do apelo ambiental, esta estratégia se destaca pelas vantagens na especificidade de produção e condições brandas de processo. A utilização de substratos alternativos para a produção de compostos de valor agregado e com capacidade de gerar diferentes derivados aumenta muito o potencial desta área. O limoneno, monoterpene utilizado como solvente industrial, aromatizante e substrato para síntese de outros compostos, é um candidato promissor para processos de bioconversões devido a sua abundância, baixo custo e potencial aplicabilidade. Entretanto, sua toxicidade para microrganismos é um fator limitante para o desenvolvimento de novos processos. O emprego de microrganismos resistentes como biocatalisadores robustos capazes de sobrepujar tal característica pode tornar esse processo ainda mais interessantes do ponto vista econômico e industrial. A obtenção de microrganismos por meio de bioprospecção é uma ferramenta bastante eficaz e barata para a descoberta de novas características ou funções biológicas que possam ser aplicadas aos processos industriais. Portanto, este trabalho teve por objetivo isolar microrganismos com perfil de resistência ao limoneno a partir de fontes vegetais presentes em ambientes naturais brasileiros e identificá-los através de marcadores genéticos universais. Foram isolados 29 microorganismos com perfil de resistência a 2% de limoneno (v/v), dos quais seis puderam ser identificados por meio de marcadores moleculares.

Palavras-chave: Isolamento. Limoneno. Bioprospecção. Processo Biotecnológico.

ABSTRACT

Consumer demand for environmentally friendly products has driven industrial production sectors, such as the flavoring industry, to seek biotechnological alternatives to obtain the compounds of interest. In addition to the environmental appeal, this strategy stands out for its advantages in production specificity and soft process conditions. The use of alternative substrates for the production of value-added compounds capable of generating different derivatives greatly increases the potential of this area. Limonene, a monoterpene

used as an industrial solvent, flavoring and substrate for the synthesis of other compounds, is a promising candidate for bioconversion processes due to its abundance, low cost and potential applicability. However, its toxicity to microorganisms is a limiting factor for the development of new processes. The use of resistant microorganisms as robust biocatalysts capable of overcoming this trait can make this process even more economically and industrially interesting. Obtaining microorganisms by bioprospecting is a very effective and inexpensive tool for the discovery of new biological characteristics or functions that can be applied to industrial processes. Therefore, this study aimed to isolate microorganisms with limonene resistance profile from plant sources present in Brazilian natural environments and identify them through universal genetic markers. Twenty-nine microorganisms with 2% limonene resistance profile (v / v) were isolated, of which six could be identified by molecular markers.

Keywords: Isolation. Limonene. Bioprospecting. Biotechnological Process.

1.1 Introdução

A produção de compostos de aroma por via biotecnológica representa uma alternativa interessante do ponto de vista ambiental e industrial pois está atrelada a diversas vantagens em relação à produção tradicional (processo químico). Os processos mediados por sistemas biológicos podem utilizar subprodutos da indústria como substrato, não estão sujeitos à possível flutuação sazonal da oferta de matéria-prima e seus produtos podem ser rotulados como “naturais”, o que pode ser comercialmente interessante devido ao crescente interesse do mercado em tais tipos de produtos (FELIPE; OLIVEIRA; BICAS, 2017). A especificidade enantiomérica, que proporciona produtos com maior grau de pureza, e as condições brandas de processo, geralmente conduzidos a temperaturas e pressões próximas à ambiente, são vantagens industriais comumente presentes em bioprocessos (BEN AKACHA; GARGOURI, 2015; BERGER, 2015). O limoneno é um monoterpene cíclico (fórmula empírica: $C_{10}H_{16}$) bastante utilizado pela indústria de aromas e amplamente estudado como substrato em processos de bioconversão para produção de compostos de valor agregado (JONGEDIJK *et al.*, 2016).

Entretanto, características intrínsecas ao sistema de biotransformação do limoneno envolvem instabilidade química e volatilidade tanto do precursor quanto dos produtos, reduzida solubilidade do limoneno em meios aquosos, citotoxicidade e baixas taxas de

rendimento (BERGER, 2015; BICAS; PASTORE, 2007; KRINGS; BERGER, 1998). A concentração mínima inibitória do limoneno é de menos de 2% para grande parte dos microrganismos (GRIFFIN, SHANE G. *et al.*, 1999), ainda que exceções já tenham sido observadas, especialmente em trabalhos voltados à bioconversão, como por exemplo a tolerância de 4 a 8% relatada em *Penicillium digitatum* (TAN; DAY; CADWALLADER, 1998). Embora seja difícil sobrepujar as três primeiras propriedades, devido à natureza físico-química relacionada à instabilidade, volatilidade e solubilidade, a baixa tolerância ao limoneno pode ser superada, ou ao menos reduzida, através do uso de organismos com perfil de resistência natural e capaz de tolerar os mecanismos bioquímicos relacionados à sua toxicidade celular (BICAS; PASTORE, 2007).

A bioprospecção é uma das metodologias de baixo custo amplamente empregadas para a busca sistemática de fenótipos ou características biológicas de interesse econômico. Microrganismos isolados de ambientes naturais, em especial, representam um grupo de grande importância neste tipo de exploração devido a imensa diversidade de processos metabólicos e enzimas que podem apresentar (ROTTAVA *et al.*, 2010).

Portanto, isolar microrganismos capazes de se desenvolver na presença do limoneno é de crucial importância para o desenvolvimento de um processo biotecnológico visando a produção de compostos de valor agregado a partir deste terpeno. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi isolar microrganismos com perfil de resistência ao limoneno e identificá-los através de marcadores genéticos.

1.2 Materiais e Métodos

1.2.1 Isolamento de microrganismos a partir de espécies vegetais

O isolamento dos microrganismos foi realizado a partir das fontes vegetais: abiu (*Pouteria caimito*), cajá manga (*Spondias dulcis*), gravatá (*Bromelia pinguan*), jabuticaba (*Plinia cauliflora*), lobeira (*Solanum lycocarpum*) e o subarbusto *Polygala fimbriata*. Os vegetais utilizados como fonte para o isolamento dos microrganismos foram obtidos no mercado Central de Belo Horizonte, Minas Gerais.

Para o isolamento dos microrganismos epifíticos presentes, os vegetais foram utilizados logo após o recebimento e não sofreram nenhum tipo de tratamento para estelização ou assepsia. Enquanto que, para o isolamento de microrganismos endofíticos, diferentes partes de cada fruto (casca, polpa, sementes e talo) e do subarbusto *Polygala fimbriata* (folhas, flores, raiz e caule) foram esterilizados externamente por imersão em hipoclorito de

sódio por 2 minutos, lavados com água estéril, imersos em etanol 70% por 2 minutos e novamente lavados em água destilada estéril (AZEVEDO, 1998).

Após este processo, os fragmentos foram dispostos em placas de Petri contendo *Yeast Malt Medium* adaptado (YM, peptona bacteriológica 0,5%; glicose 1%; extrato de levedura 0,3%; ágar 2%; água destilada). Decorridas 48 h de incubação a 30°C em estufa bacteriológica (Thelga, TE64CB), as colônias isoladas foram transferidas pelo método de esgotamento de inóculo para outra placa contendo YM. O processo foi repetido até a obtenção de colônias puras.

Os microrganismos isolados foram depositados no banco de microrganismos do Laboratório de Biotecnologia de Alimentos (LBA) do Instituto de Ciências e Tecnologia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Foram codificadas conforme o sistema de estoque do referido banco de microrganismos, onde os 2 primeiros dígitos indicam a fonte de isolamento (1 - Abiu; 2 – Cajá manga; 3- Gravatá; 5 – Jabuticaba; 6 – Lobeira; 12 - *Polygala fimbriata*), o 3º dígito indica se o microrganismo é endofítico (1) ou epifítico (2) e os números finais indicam o número da colônia do isolado. Os microrganismos foram armazenados em tubos inclinados contendo YM e vaselina. Também foram congelados em meio YM e glicerol 20% a -20°C.

1.2.2 Seleção de microrganismos com perfil de resistência ao limoneno

A partir da biblioteca de isolados do LBA foram selecionados os microrganismos que apresentaram perfil de resistência ao limoneno por meio de cultura de enriquecimento. Os microrganismos foram cultivados em meio YM líquido (peptona bacteriológica 0,5%; glicose 1%; extrato de levedura 0,3%; água destilada) contendo 2% de (R)-(+)-limoneno (v/v)(16,84g/L), sob agitação de 150 rpm e 30°C, por 48 horas, em incubadora com agitação orbital (Tecnal, modelo TE-421) conforme descrito por Bicas & Pastore, (2007). Decorridas as 48 horas, 100 µL do caldo fermentado foi inoculado em meio Ágar YM contido em placas de Petri, seguido de espalhamento em superfície com auxílio de alça de *Drigalski* e incubação a 30°C por 48 horas em estufa bacteriológica (Thelga, TE64CB). As culturas foram observadas e os microrganismos que apresentaram crescimento igual ou superior a 30 UFC (Unidades Formadoras de Colônias) foram considerados resistentes à 2% de limoneno.

1.2.3 Caracterização por genes constitutivos

O material genético total foi extraído com uso do reagente fenólico Trizol (Ludwig Biotecnologia Ltda, Rio Grande do Sul, Brasil) conforme as especificações do

fabricante. Após a extração, foi realizada eletroforese em gel de agarose 0,8% corado por brometo de etídio e a verificação dos produtos obtidos realizada em transiluminador de luz ultravioleta (UV) (Transiluminador UVB LTB-20X20HE, Loccus do Brasil, Cotia, São Paulo, Brasil). A quantificação do material extraído foi feita através de leitura de absorbância em espectrofotômetro colorimétrico (Qubit 4 Fluometer, Thermo Fisher Scientific). Foi realizada a amplificação de uma região dos genes 16S rRNA e região ITS, através da reação em cadeia da polimerase (PCR) (SAIKI *et al.*, 1988). Os *primers* utilizados estão descritos na Tabela 1. As reações foram realizadas em tampão contendo: Tris-HCl (200 mM), KCl (500 mM), MgCl₂ (20 mM), pH 8.5 (25 °C); *dntp's* (0,4 mM); par de *primers* (0,5 μM); Taq DNA polimerase (0,6U; Cellco Biotec, São Carlos, São Paulo, Brasil) e os ácidos nucleicos dos microrganismos como moldes (aproximadamente 10 ng) em volume final de 25 μL. As reações foram conduzidas em termociclador (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems, Califórnia, Estados Unidos da América) com ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos; 35 ciclos a 95°C por 45 segundos, 45°C por 45 segundos e 72°C por 1,5 minutos; e ciclo final a 72°C por 10 minutos. Após amplificação, foi conduzida eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e os resultados visualizados em transiluminador UV. Os produtos foram submetidos à purificação com isopropanol e etanol e, posteriormente, à eletroforese para constatar a remoção de possíveis bandas inespecíficas. O sequenciamento genético dos *amplicons* foi realizado pelo método de Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977; VAN DIJK *et al.*, 2018) de forma terceirizada através da empresa sul coreana Macrogen (Seul, República da Coreia).

Tabela 1: Primers universais utilizados para amplificação das regiões 16S rRNA e ITS. Os primers 27F e 1492R foram utilizados para a amplificação a partir do gene 16S rRNA das bactérias e os primers ITS1 e ITS4 a região ITS da levedura.

Primer	Orientação 5' - 3'	Referência
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	(LANE, 1991)
1492R	ACCTTGTTACGACTT	
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	(WHITE <i>et al.</i> ,
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	1990)

As sequências de nucleotídeos resultantes do sequenciamento foram tratadas com o uso do *software* Chromas 2.6.5 (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Austrália - <https://technelysium.com.au/wp/chromas/>) para remoção das bases de baixa qualidade utilizando o parâmetro de *phred* em 30. Posteriormente, as leituras das fitas senso e anti-senso foram sobrepostas para formar a sequência consenso através do *software* CAP3 (CAP3 Sequence Assembly Program, PRABI-Doua - <http://doua.prabi.fr/software/cap3>) (HUANG;

MADAN, 1999)). Finalmente, as sequências consenso foram submetidas ao algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, National Center for Biotechnology Information (NCBI)) para averiguação de similaridade entre sequências depositadas no banco de dados do NCBI. A atribuição a qual organismo cada sequência consenso mais se relaciona foi baseada nos índices de similaridade entre a sequência testada e seu correspondente mais próximo.

1.2.4 Teste de resistência ao limoneno de espécies do gênero *Bacillus*

Com a finalidade de investigar o fenótipo de resistência ao limoneno em comparação aos representantes bacterianos isolados neste trabalho, três cepas de diferentes espécies de *Bacillus* (*B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* e *B. thuringiensis*), cedidas gentilmente pela Doutora Marisa Vieira de Queiroz do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, foram cultivadas paralelamente aos isolados bacterianos 1151, 1213 e 12111.

Os microrganismos foram ativados em meio Ágar YM contido em placas de Petri por 48 horas em estufa bacteriológica e posteriormente cultivados em YM líquido sob agitação de 150 rpm e 30°C, por 48 horas em incubadora. Decorrido este tempo, a taxa de crescimento microbiano foi avaliada de forma indireta pela leitura da absorbância a 600 nm em alíquotas de 200 µL de meio contendo biomassa através de espectrofotômetro digital (Versa Max Microplate Reader, Molecular Devices). Os valores encontrados nesta aferição foram utilizados como parâmetro de crescimento máximo dos microrganismos empregados neste teste de resistência. Posteriormente, os todos os microrganismos foram cultivados em YM líquido contendo 0, 2, 4 e 6% de limoneno (v/v) com inóculo inicial ajustado entre 0,2 a 0,6 de Unidade de Absorbância (UA). Foram realizadas três leituras em diferentes tempos (0, 24 e 48 horas de cultivo) para se estabelecer uma curva de crescimento para cada uma das concentrações de terpeno. A curva construída na ausência de limoneno foi adotada como curva padrão para a taxa de crescimento dos microrganismos sob as condições testadas. Estes cultivos foram conduzidos em triplicata técnica.

Após 48 horas de experimento em diferentes concentrações de terpeno em meio líquido, uma alíquota de 100 µL de cada um dos cultivos em 2, 4 e 6% foi utilizada para a preparação de diluição seriada em meio YM estéril e posterior plaqueamento em placas de Petri contendo meio YM na forma de microgotas (10 µL). Tais placas foram incubadas por 48 horas em estufa a 30°C e fotografadas com o auxílio de fotodocumentador (Transiluminador UVB LTB-20X20HE, Loccus do Brasil, Cotia, São Paulo, Brasil).

1.3 Resultados e Discussão

1.3.1 Isolamento e seleção de microrganismos a partir de espécies vegetais

Utilizando fontes vegetais encontradas na Mata Atlântica e no bioma do Cerrado brasileiro, foram isolados e selecionados 29 microrganismos que apresentaram perfil de resistência ao limoneno em 2% (v/v). O **Quadro 1** apresenta o resumo dos microrganismos isolados.

Microrganismo	Identificador	Quantificação (ng/μL)
111	AB-EN-C1	54,9
112	AB-EN-C2	43
1141	AB-EN-C41	30,7
1151	AB-EN-C51	54,1
1152	AB-EN-C52	27,9
116	AB-EN-C61	27,4
211	CA-EN-C1	37
212	CA-EN-C2	46,5
213	CA-EN-C3	6,8
311	G-EN-C1	87,3
313	G-EN-C3	112,1
314	G-EN-C4	10,2
316	G-EN-C6	6,2
318	G-EN-C8	130,3
3121	G-EN-C21	88,3
3152	G-EN-C52	51,4
512	JA-EN-C2	158,6
514	JA-EN-C4	93,3
6262	L-EP-C62	11
1212	PO-EN-C2	80,3
1213	PO-EN-C3	38,7
1214	PO-EN-C4	101,6
1215	PO-EN-C6	131,9
1217	PO-EN-C8	135,6
1218	PO-EN-C9	111,7
1219	PO-EN-C10	5,3
12110	PO-EN-C12	107,8
12111	PO-EN-C13	96,1
12112	PO-EN-C14	5,3

Quadro 1: Microrganismos selecionados através de cultura de enriquecimento em limoneno a 2% (v/v). Na primeira coluna estão listados os números atribuídos para cada MO conforme codificação do catálogo de MO isolados do LBA. Esta codificação está expressa pelo identificador na segunda coluna e é configurada pela fonte de isolamento: AB (Abiu, *Pouteria caimito*), CA (Cajá manga, *Spondias dulcis*), G (Gravatá, *Bromelia pinguan*), JA (Jabuticaba, *Plinia cauliflora*), L (Lobeira, *Solanum lycocarpum*) ou PO (subarbusto *Polygala fimbriata*); EN (endofítico) ou EP (epifítico) e finalmente pelo número da colônia resgatada do meio sólido. A quarta coluna apresenta os valores quantitativos em nanogramas por microlitro (ng/μL) da extração do material genético de

cada MO realizada através do reagente fenólico Trizol.

A identificação de microrganismos pode ser realizada por uma série de métodos envolvendo o cultivo em meios seletivos e coloração de GRAM. Também por inúmeros testes bioquímicos para avaliar características fisiológicas e verificação da morfologia de colônias isoladas cultiváveis. Entretanto, tais métodos geralmente acompanham erros técnicos pois demandam tempo e experiência por parte dos profissionais envolvidos (DAS *et al.*, 2014). Para realizar a identificação dos isolados deste trabalho foi adotada a estratégia de similaridade de genes constitutivos, que será detalhada o próximo item.

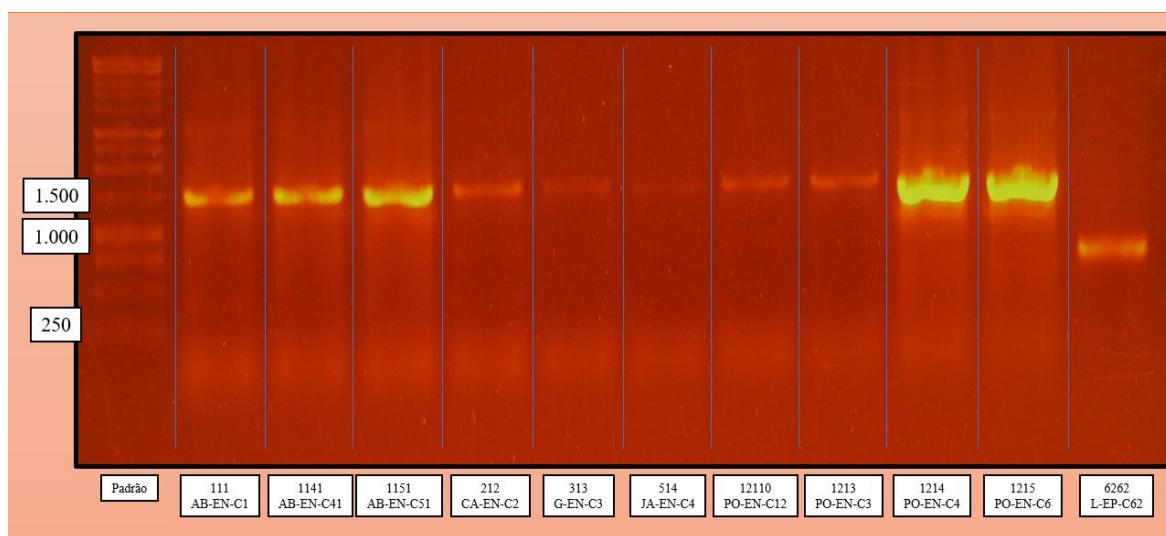
1.3.2 Caracterização por genes constitutivos

Para a caracterização por genes constitutivos, a abordagem molecular foi utilizada, através do uso de sequências de nucleotídeos relacionadas a genes constitutivos visando a identificação dos isolados com perfil de resistência ao limoneno a 2% (v/v). Esta estratégia apresenta claras vantagens em relação ao tempo consumido, acurácia dos resultados e menores chances de erro em relação às tradicionais técnicas utilizadas em microbiologia (AHMAD; AHMAD; PICHTEL, 2011; RASHID; STINGL, 2015). Especificamente no caso dos procariotos, o uso de sequências do gene 16S rRNA é uma das práticas mais convenientes atualmente utilizadas para identificação de bactérias. Isso se deve ao fato de este gene estar presente em todos os organismos procariotos que compartilham uma determinada função ambiental; as sequências resultantes da amplificação de uma parte do gene possuem regiões altamente conservadas e regiões variáveis de forma interespecífica; o tamanho aproximado destes amplicons, cerca de 1.500 pares de base (pb), é de fácil sequenciamento e análise (CLARRIDGE, 2004). No caso de fungos, a região *internal transcribed spacer* (ITS) é considerada como marcador universal para identificação (SCHOCH; SEIFERT, 2012). Porém, para alguns gêneros, ela pode não ser suficiente para diferenciação a nível de espécie (HOUBRAKEN; SAMSON, 2017).

Após as amplificações e purificações das regiões correspondentes aos genes constitutivos para cada isolado, 16S rRNA para bactérias e região ITS para a levedura, foram obtidos onze *amplicons*, correspondendo aos isolados: 111, 1141, 1151, 212, 313, 514, 12110, 1213, 1214, 1215 e 6262, conforme pode ser observado na eletroforese ilustrada pela **Figura 2**. Os demais *amplicons* relativos ao restante dos isolados não puderam ser observados, após amplificação e purificação, em eletroforese e, portanto, não foram enviados para o sequenciamento. O tamanho aproximado dos *amplicons* produzidos neste trabalho, 1.500 pb

(16S rRNA) e 600 pb (região ITS), está de acordo com o esperado e em conformidade com a literatura.

Figura 2: Eletroforese em gel de agarose dos amplicons purificados. Resultado da eletroforese para averiguação dos amplicons a partir dos gene 16S rRNA e região ITS dos isolados. Na primeira canaleta foi utilizado padrão de peso molecular de 1kb (Promega Corporation, Madison, Estados Unidos). Estão representados nesta figura os amplicons para os isolados 111, 1141, 1151, 212, 313, 514, 12110, 1213, 1214 e 1215 com tamanho aproximado de 1.500 pb nas canaletas de 2 a 11; e, na canaleta 12, o amplicon do isolado 6262 com tamanho aproximado de 600 pb.



Realizado o sequenciamento dos onze *amplicons*, as sequências de nucleotídeos obtidas foram filtradas com o uso do *software* Chromas para remoção de leituras de baixa qualidade. Somente as correspondentes ao isolado 514 não apresentaram qualidade suficiente para prosseguir para a próxima etapa. De um modo geral, as duas leituras para este *amplicon* tiveram baixíssima qualidade e foram eliminadas nesta etapa.

Seis *contig's* representando os isolados 111, 1141, 1151, 12110, 1213 e 6262 foram montados com sucesso, enquanto não foi possível realizar a montagem para os isolados 212, 313, 1214 e 1215. Esta montagem é realizada de modo a sobrepor as leituras senso e anti-senso da fita de DNA de cada isolado e a partir da região sobreposta é obtida a região consenso. Durante a montagem da região consenso para os isolados 212, 313, 1214 e 1215 não houve uma sobreposição que resultasse em uma sequência contígua que representasse em ambos os sentidos de leitura o *amplicon* produzido.

Finalmente, dos 11 isolados enviados para o sequenciamento, foi possível montar as sequências codificantes de 6 microrganismos. A Tabela 2 apresenta os resultados dos alinhamentos realizados com os seis *contig's* dos isolados que foram montados com sucesso e sua respectiva correspondência a nível de grupo taxonômico.

Tabela 2: Identificação dos isolados por alinhamento local. Correspondentes taxonômicos dos seis *contig's* submetidos ao algoritmo BLAST do NCBI. (*) Não foi possível distinguir entre *Bacillus cereus* e *Bacillus thuringiensis*.

Isolado	Identificação	Identidade (%)
111	<i>Bacillus</i> sp. *	100
1141	<i>Bacillus</i> sp.	100
1151	<i>Bacillus cereus</i>	99
12110	<i>Bacillus</i> sp. *	99
1213	<i>Bacillus mycoides</i>	99
6262	<i>Meyerozyma caribbica</i>	100

Todos os representantes bacterianos tiveram correspondência com o gênero *Bacillus*. Destes, dois puderam ser distinguidos a nível de espécie, o isolado 1151 foi identificado como *Bacillus cereus* e o isolado 1213 como *Bacillus mycoides*. A levedura foi identificada como *Meyerozyma caribbica*.

O gênero *Bacillus* é comumente utilizado por diversos segmentos industriais devido ao seu potencial para a produção de biopolímeros, proteínas e isoprenóides (metabólitos envolvidos nas rotas de síntese de terpenos), especialmente a espécie *Bacillus subtilis* (GU *et al.*, 2018; GUAN *et al.*, 2015). Frente aos resultados da identificação, propusemos avaliar o fenótipo de resistência ao limoneno presente nos microrganismos isolados neste trabalho em relação a outros representantes do gênero *Bacillus*.

1.3.3 Teste de resistência ao limoneno de espécies do gênero *Bacillus*

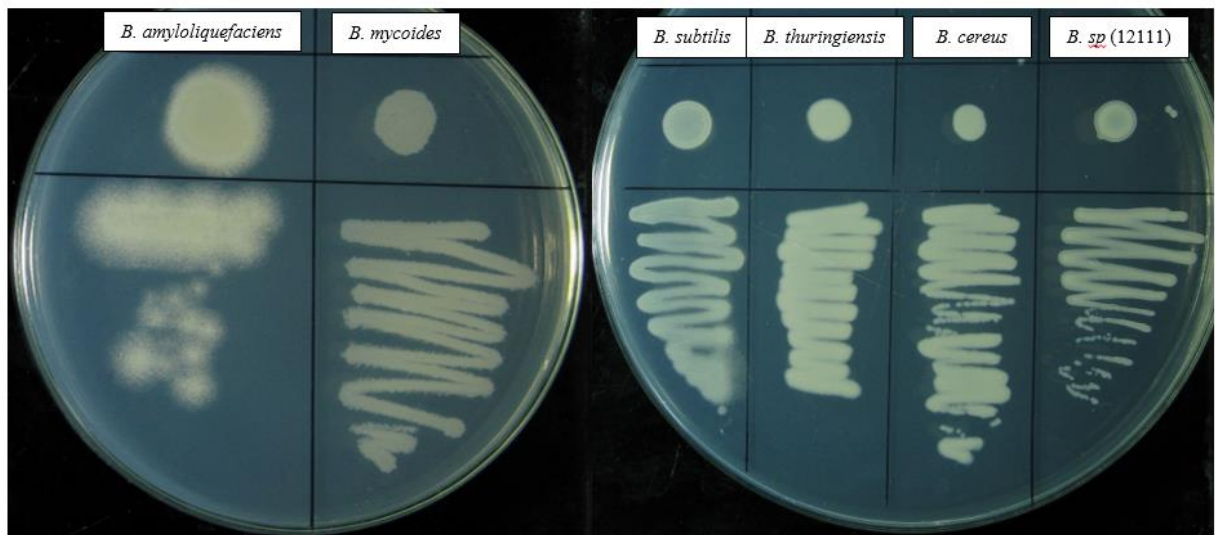
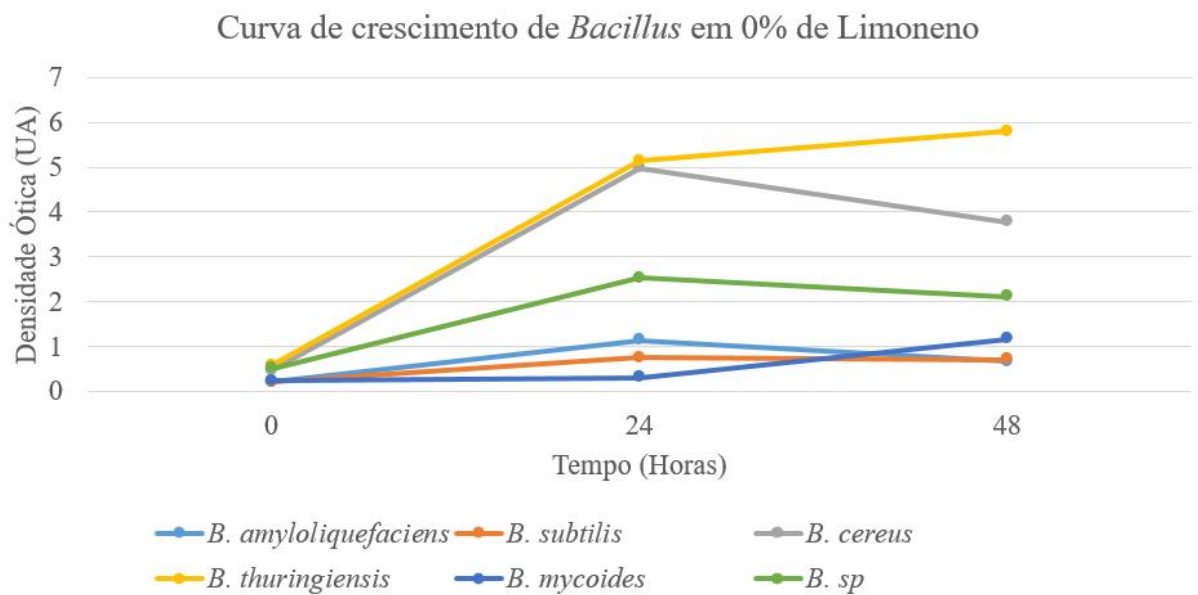
Os resultados da identificação dos isolados bacterianos se restringiram ao gênero taxonômico *Bacillus*. Este grupo possui um representante, *B. subtilis*, bem elucidado no que diz respeito ao seu potencial para diversos bioprocessos (GUAN *et al.*, 2015). Desta forma, nossos resultados apontaram para um grupo de grande potencial na área industrial. Tais resultados nos motivaram a investigar se a resistência ao limoneno poderia ser uma característica dos isolados encontrados neste trabalho ou se poderia ser um fator comum a outras espécies de *Bacillus*.

Para tal, foram cultivados seis diferentes representantes de *Bacillus* em contato com o limoneno. Um destes representantes, o isolado 12111, apresentou uma ligeira vantagem nos valores de medição de crescimento indireto (Unidades de absorbância) em relação aos demais microrganismos em testes realizados no LBA da UFVJM (dados não apresentados). Este microrganismo provém da mesma fonte de isolamento que o isolado 12110 (identificado como *Bacillus* sp), que também apresentou o mesmo padrão de bandas do *amplicon* do gene 16S rRNA. Além deste, foram escolhidos dois isolados oriundos deste trabalho em que a

identificação foi possível a nível de espécie (1151 - *B. cereus* e 1213 - *B. mycooides*). Também foram incluídos três representantes do gênero *Bacillus*, a saber, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* e *B. thuringiensis*.

As Figuras 3, 4, 5 e 6 apresentam os valores medidos de densidade ótica em UA para os cultivos dos isolados 1151 (*B. cereus*), 1213 (*B. mycooides*), 12111 (*Bacillus sp*) e as cepas de *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* e *B. thuringiensis* em diferentes concentrações (2, 4, e 6% (v/v)) de limoneno na forma de curvas de crescimento.

Figura 3: Curva de crescimento de *Bacillus* na ausência de Limoneno e placas de cultivo.



Todas as espécies de *Bacillus* utilizadas nesta etapa apresentaram crescimento celular perceptível e, notoriamente, a temperatura 30°C, a agitação (150 rpm) e a composição do meio de cultivo empregadas na metodologia foram suficientes para proporcionar o

desenvolvimento celular destas bactérias na ausência do limoneno, conforme observado na Figura 3.

Figura 4: Curva de crescimento de Bacillus na presença de 2% de Limoneno. Evidencia-se a baixa densidade celular alcançada por grande parte dos microrganismos, em exceção ao isolado *B. sp* (12111), que manteve um crescimento relativamente estável em comparação à curva padrão (sem limoneno). Após 48 horas de cultivo em contato com o limoneno e semeadura em placas de Petri contendo meio YM, percebe-se que não houve crescimento celular visível para o isolado 1213 (*B. mycooides*), nem para o *B. thuringiensis* em diluição de 1:100 depois de 48 horas em estufa bacteriológica.

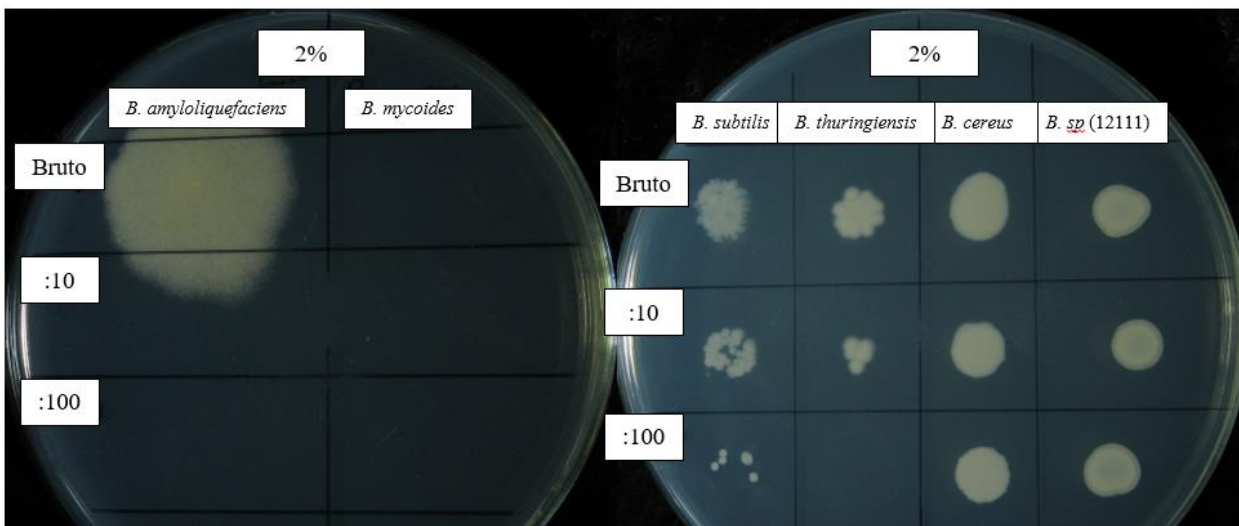
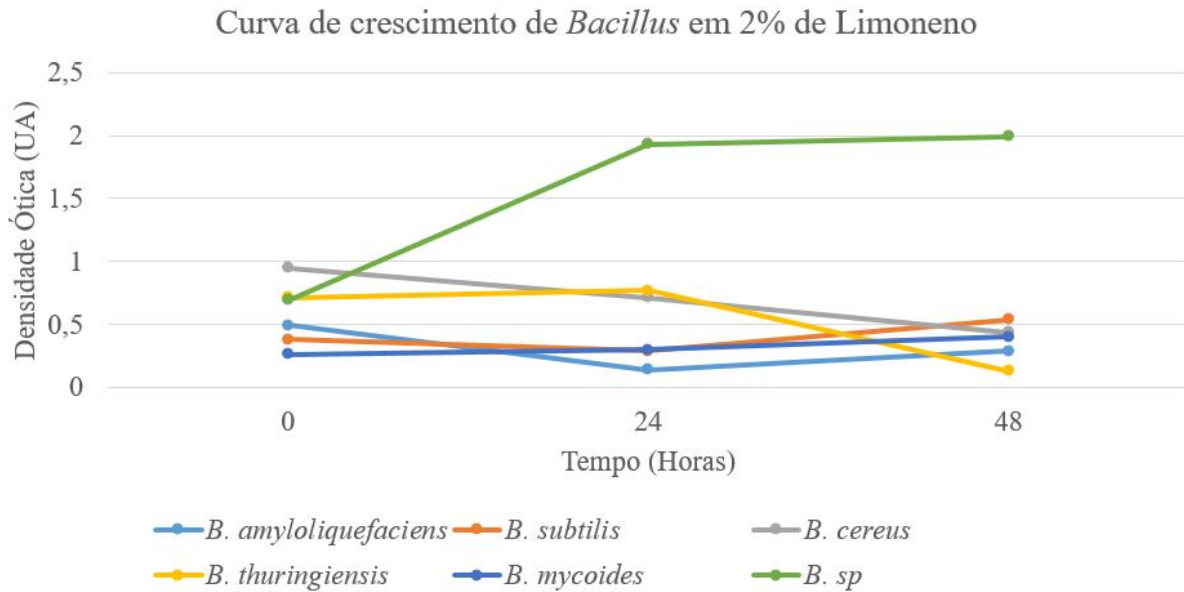


Figura 5: Curva de crescimento de Bacillus na presença de 4% de Limoneno. Sob estas condições, a densidade celular da maioria das bactérias tende a diminuir ainda mais, exceto para *B. subtilis* e *B. sp* (12111). *B. subtilis* apresentou um ligeiro aumento na densidade celular em relação ao cultivo com 2% de limoneno (v/v) e até mesmo ultrapassando os valores encontrados na curva padrão (sem limoneno). Com relação ao desenvolvimento em meio Ágar YM, *B. amyloliquefaciens*, *B. mycooides* e *B. thuringiensis* em diluição 1:100 não apresentaram crescimento perceptível.

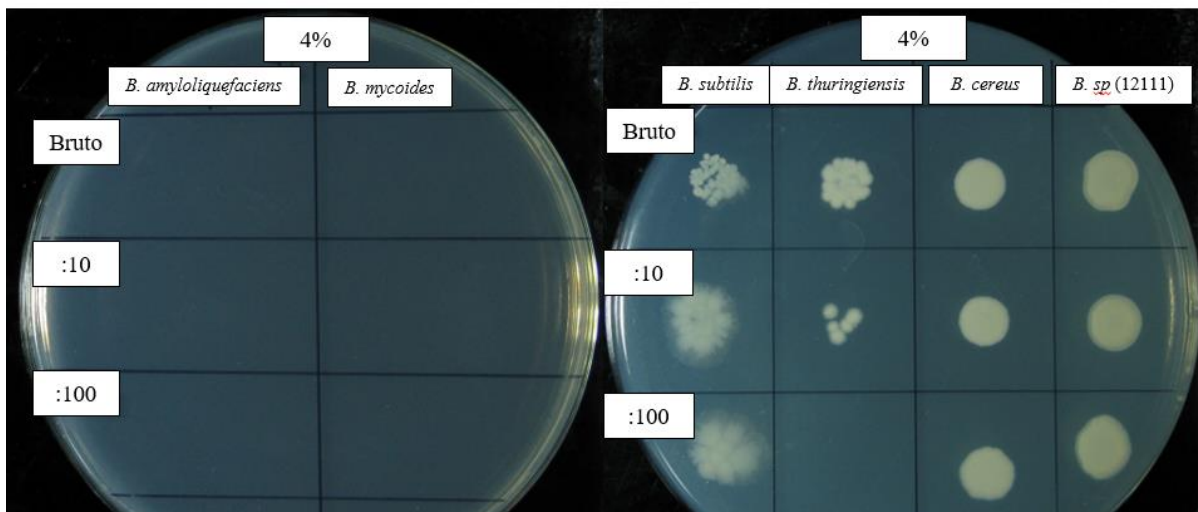
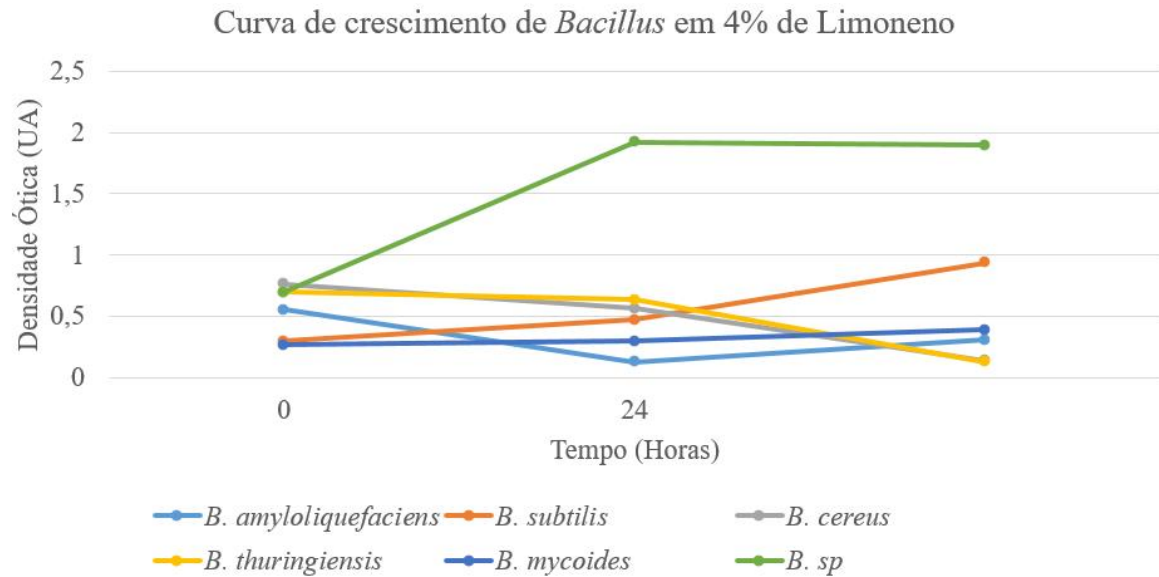
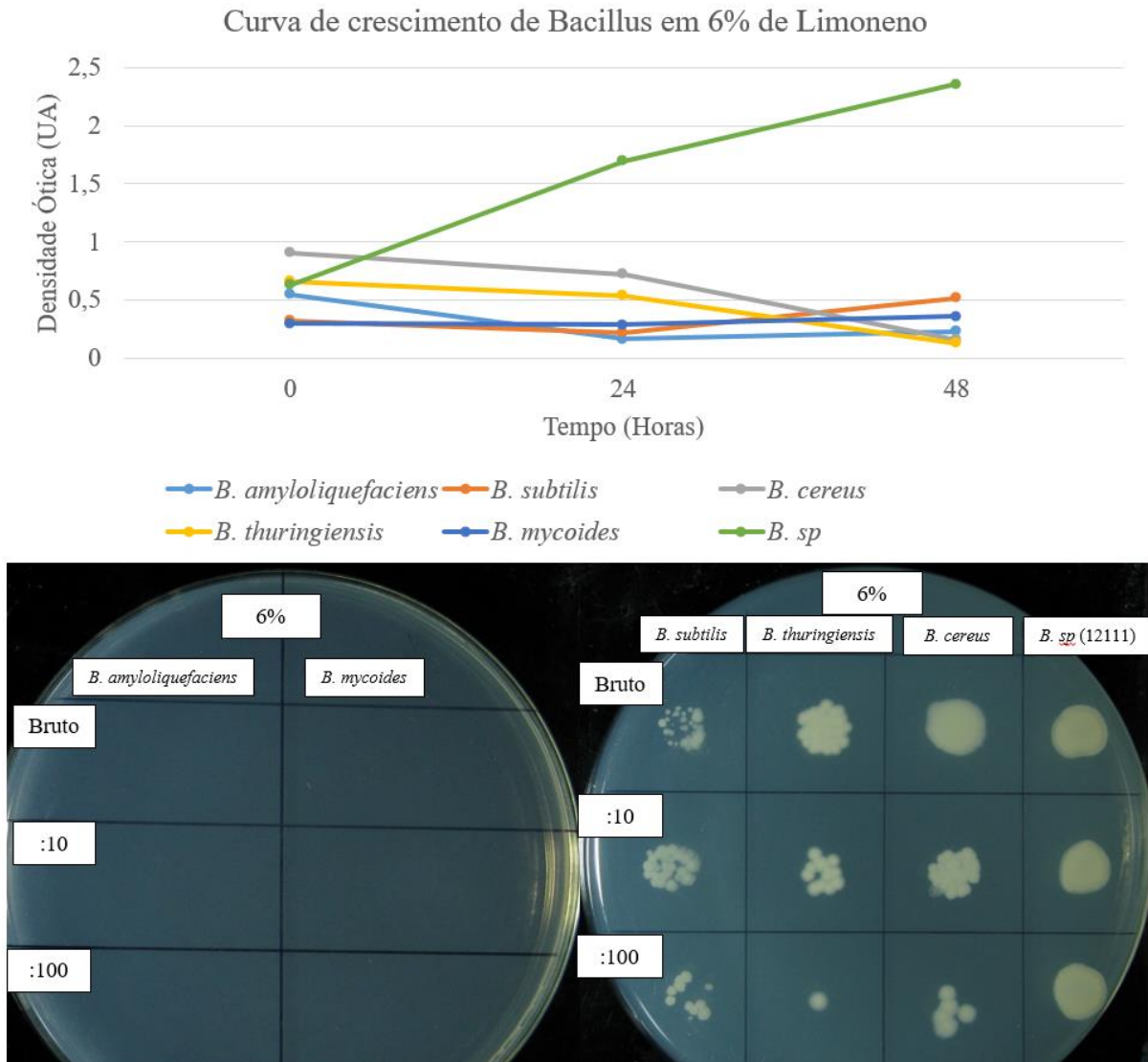


Figura 6: Curva de crescimento de Bacillus na presença de 6% de Limoneno. A densidade celular de um modo geral é baixa para todas as bactérias, exceto para *B. sp* (12111), que atinge valores de densidade acima daqueles observados até então. Não é possível observar crescimento celular em meio Ágar YM para *B. subtilis* e *B. mycooides* nesta concentração, entretanto, de forma inesperada, *B. thuringiensis* apresenta crescimento perceptível na diluição de 1:100. Todos os outros representantes se desenvolveram em meio sólido após o cultivo com 6% de limoneno.



Após o cultivo das linhagens de *Bacillus* em diferentes concentrações de limoneno, pode-se perceber que houve uma tendência para diminuição na densidade celular observada, salvo nos casos de cultivo em 4% para *B. subtilis* (Figura 5) e em todas as concentrações testadas para *B. sp* (12111) (Figuras 4, 5 e 6). Com relação ao cultivo em meio Ágar YM, após a exposição ao limoneno, houve crescimento perceptível para todas as bactérias, exceto para a *B. mycooides* (Figuras. 4, 5 e 6). A bactéria *B. amyloliquefaciens* apresentou crescimento restrito após o contato com limoneno, sendo possível observar seu crescimento em meio sólido somente depois de cultivo na concentração de 2% e sem diluição

do inóculo (Figura 4). Diante de tais resultados, acreditamos que seja possível que o limoneno possua efeito bacteriostático para os *Bacillus* testados, exceto para o isolado 12111.

1.4 Conclusão

A atual demanda do mercado consumidor por produtos naturais e obtidos por processos ambientalmente favoráveis impulsiona o desenvolvimento de bioprocessos mediados por microrganismos e representam uma das estratégias mais promissoras para a substituição dos tradicionais processos químicos. Além disso, a utilização de matérias-primas de baixo custo e que ao mesmo tempo sejam subprodutos da indústria, como é o caso do limoneno, configura uma forma promissora de aplicação biotecnológica. Parte importante do desenvolvimento do bioprocessos está na concepção e adequação da máquina biológica às condições de produção. Para o uso do limoneno como substrato, um chassi biológico que seja capaz de sobrepujar a toxicidade do composto e de seus possíveis derivados é fundamental. Neste enfoque, este trabalho teve por objetivo principal prospectar microrganismos que apresentassem fatores de resistência ao limoneno para que possam ser utilizados como fábricas celulares na bioconversão deste terpeno. A partir de fontes vegetais, foram isolados com sucesso 29 microrganismos com tal característica, sendo que cinco isolados foram identificados como representantes do gênero *Bacillus*, dos quais dois foram identificados a nível de espécie, como *Bacillus mycoides* e *Bacillus cereus*, e uma levedura foi identificada como *Meyerozyma caribbica*. A identificação de tais isolados representa um importante achado para a área de bioprocessos pois geralmente a caracterização dos isolados com algum potencial biotecnológico é limitada a características morfológicas e coloração de GRAM. Por fim, este trabalho representa um importante avanço na busca do desenvolvimento de estratégias para a produção de compostos de valor agregado a partir da bioconversão do limoneno.

REFERÊNCIAS

AHMAD, Iqbal; AHMAD, Farah; PICHTEL, John. Microbes and microbial technology: Agricultural and environmental applications. *Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications*, p. 1–516, 2011.

AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. *Microrganismos Endofíticos*. [S.l.]: Embrapa-CNPMA, 1998. p. 488.

BEN AKACHA, Najla; GARGOURI, Mohamed. Microbial and enzymatic technologies used for the production of natural aroma compounds: Synthesis, recovery modeling, and bioprocesses. *Food and Bioproducts Processing*, v. 94, n. September, p. 675–706, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2014.09.011>>.

BERGER, Ralf G. Biotechnology as a source of natural volatile flavours. *Current Opinion in Food Science*, v. 1, n. 1, p. 38–43, 2015.

BICAS, Juliano Lemos; PASTORE, Gláucia Maria. Isolation and screening of D-limonene-resistant microorganisms. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, n. 3, p. 563–567, 2007.

CLARRIDGE, J. E. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 17, n. 4, p. 840–862, 1 out. 2004. Disponível em: <<http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.17.4.840-862.2004>>.

DAS, Surajit *et al.* Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, v. 103, p. 80–100, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2014.05.013>>.

FELIPE, Lorena de Oliveira; OLIVEIRA, Ana Maria De; BICAS, Juliano Lemos. Bioaromas – Perspectives for sustainable development. *Trends in Food Science and Technology*, v. 62, p. 141–153, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2017.02.005>>.

GRIFFIN, Shane G. *et al.* The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 14, n. 5, p. 322–332, 1999.

GU, Yang *et al.* Advances and prospects of *Bacillus subtilis* cellular factories: From rational design to industrial applications. *Metabolic Engineering*, v. 50, n. December 2017, p. 109–121, 2018.

GUAN, Zheng *et al.* Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for terpenoid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 99, n. 22, p. 9395–9406, 2015.

HOUBRAKEN, Jos; SAMSON, Robert A. *Current taxonomy and identification of foodborne fungi. Current Opinion in Food Science*. [S.l.: s.n.], 2017

HUANG, Xiaoqiu; MADAN, Anup. {CAP3:} A {DNA} Sequence Assembly Program. *Genome Research*, v. 9, n. 9, p. 868–877, 1999. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1101/gr.9.9.868>>.

JONGEDIJK, Esmer *et al.* Biotechnological production of limonene in microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 100, n. 7, p. 2927–2938, 2016.

KRINGS, U.; BERGER, R. G. Biotechnological production of flavours and fragrances. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 49, n. 1, p. 1–8, 26 jan. 1998. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s002530051129>>.

LANE, D.J. *16S/23S rRNA sequencing*. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons. [S.l.: s.n.], 1991

RASHID, Mamoon; STINGL, Ulrich. Contemporary molecular tools in microbial ecology and their application to advancing biotechnology. *Biotechnology Advances*, v. 33, n. 8, p. 1755–1773, 2015.

ROTTAVA, Ieda *et al.* Screening of microorganisms for bioconversion of (-) β -pinene and R-(+)-limonene to α -terpineol. *LWT - Food Science and Technology*, v. 43, n. 7, p. 1128–1131, 2010.

SAIKI, Randall K. *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988.

SANGER, F; NICKLEN, S; COULSON, A R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 74, n. 12, p. 5463–7, dez. 1977. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0025344207&partnerID=40&md5=bd7cfb5473943512f50c47a6f32e8d2a>>.

SCHOCH, C. L.; SEIFERT, K. A. Reply to Kiss: Internal transcribed spacer (ITS) remains the best candidate as a universal DNA barcode marker for Fungi despite imperfections. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 109, n. 27, p. E1812–E1812, 2012. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1207508109>>.

TAN, Q.; DAY, D. F.; CADWALLADER, K. R. Bioconversion of (R)-(+)-limonene by *P. digitatum* (NRRL 1202). *Process Biochemistry*, v. 33, n. 1, p. 29–37, 1998.

VAN DIJK, Erwin L. *et al.* The Third Revolution in Sequencing Technology. *Trends in Genetics*, v. 34, n. 9, p. 666–681, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.05.008>>.

WHITE, T.J. *et al.* AMPLIFICATION AND DIRECT SEQUENCING OF FUNGAL RIBOSOMAL RNA GENES FOR PHYLOGENETICS. *PCR Protocols*. [S.l.]: Elsevier, 1990. p. 315–322. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123721808500421>>.

**CAPÍTULO 2 – IDENTIFICAÇÃO DOS POTENCIAIS MECANISMOS DE
RESISTÊNCIA DE *Meyerozyma caribbica* AO LIMONENO POR GENÔMICA
COMPARATIVA
RESUMO**

Os processos de bioconversão de terpenos representam uma alternativa aos processos de síntese química para obtenção de compostos de valor agregado. Dentre os principais fatores limitantes para a implementação desta metodologia, estão a instabilidade química do substrato e a volatilidade dos produtos, além da elevada toxicidade dos terpenos frente aos microrganismos empregados nos processos biotecnológicos. Visando contornar esta dificuldade, a bioprospecção de microrganismos robustos é uma alternativa barata e eficaz a ser colocada em prática. Por meio desta abordagem, foi isolada uma cepa de *Meyerozyma caribbica* a partir de lobeira (*Solanum lycocarpum*). Deste modo, o objetivo deste trabalho foi investigar potenciais mecanismos de resistência ao limoneno através de genômica comparativa de *M. caribbica*. Foram identificados 58 clusters exclusivos de *M. caribbica* em comparação a outras cinco leveduras e 26 proteínas relacionadas a MFS *transporter superfamily*. Através do doseamento por cromatografia gasosa, foi possível verificar que os níveis de limoneno intracelular em *M. caribbica* estavam menores em relação a *S. cerevisiae*, *K. marxianus* e *S. passalidarum* após a exposição a 4% de limoneno (v/v). Estes achados sugerem que o mecanismo de resistência pode estar envolvido ao efluxo de limoneno realizado por proteínas transportadoras do tipo MFS em *M. caribbica* e abrem potencial para a exploração deste microrganismo como chassi biológico para bioconversão de limoneno a produtos de valor agregado, como álcool perílico e ácido perílico, por exemplo.

Palavras-chave: Genômica comparativa. *Meyerozyma caribbica*. Limoneno. MFS transporter superfamily.

ABSTRACT

Terpene bioconversion processes represent an alternative to chemical synthesis processes for obtaining value-added compounds. Among the main limiting factors for the implementation of this methodology are the chemical instability of the substrate and the volatility of the products, as well as the high toxicity of terpenes against the microorganisms employed in biotechnological processes. To circumvent this difficulty, bioprospecting robust microorganisms is a cheap and effective alternative to put into practice. By this approach, a strain of *Meyerozyma caribbica* was isolated from *Solanum lycocarpum*. Thus, the objective of this work was to investigate potential limonene resistance mechanisms through

comparative genomics of *M. caribbica*. 58 unique *M. caribbica* clusters were identified compared to five other yeast and 26 MFS transporter superfamily-related proteins. Gas chromatographic assay showed that intracellular limonene levels in *M. caribbica* were lower than *S. cerevisiae*, *K. marxianus* and *S. passalidarum* after exposure to 4% limonene (v / v). These findings suggest that the mechanism of resistance may be involved in limonene efflux carried out by MFS-type carrier proteins in *M. caribbica* and open potential for the exploitation of this microorganism as a biological framework for limonene bioconversion to value-added products such as peryl alcohol and perylic acid, for example.

Keywords: Comparative genomics. *Meyerozyma caribbica*. Limonene. MFS transporter superfamily.

2.1 Introdução

A produção de compostos de aroma é tradicionalmente realizada por extração natural ou síntese química e estas estratégias geralmente estão associadas a fatores limitantes como, por exemplo, baixa produtividade, dependência de fatores climáticos, extremas condições de processo e obtenção de misturas racêmicas de produtos (FELIPE *et al.*, 2017). Os processos biotecnológicos representam uma alternativa na obtenção dos compostos de aroma pois não dependem de oferta de matérias-primas sazonais, podem ser conduzidos em condições brandas, apresentam alta especificidade e seus produtos podem ser considerados ambientalmente favoráveis (VESPERMANN *et al.*, 2017).

Dentre os substratos amplamente estudados e empregados em bioprocessos, os monoterpenos ocupam lugar de destaque (BEN AKACHA; GARGOURI, 2015). Destes, o limoneno (fórmula empírica: $C_{10}H_{16}$) possui um interessante potencial industrial por ser de fácil obtenção, de baixo custo e precursor para vários compostos de valor agregado (JONGEDIJK *et al.*, 2016). Entretanto, a bioconversão de limoneno e de outros terpenos é limitada, dentre outros fatores, devido a toxicidade apresentada por estes compostos aos microrganismos quando utilizados como substratos em processos biotecnológicos (ALONSO-GUTIERREZ *et al.*, 2013b).

Uma das alternativas para minimizar as dificuldades inerentes às características físico-químicas do limoneno, para que este possa ser utilizado como substrato em processos de bioconversão, seria o emprego de microrganismos robustos que apresentem fenótipos de resistência à toxicidade dos terpenos e outros solventes orgânicos (WANG *et al.*, 2013). Como resultado do trabalho de bioprospecção, uma cepa de *Meyerozyma caribbica* com perfil

de resistência ao limoneno foi isolada de fonte vegetal e identificada por marcadores genéticos (dados não publicados) pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Biotecnologia de Alimentos da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri em colaboração com o Laboratório de Biologia Sintética e Modelagem de Sistemas Biológicos da Universidade Federal de Viçosa.

A levedura *M. caribbica* apresenta um real potencial para a área biotecnológica visto que recentemente foi demonstrado que isolados desta espécie são capazes de realizar biorremediação de meios aquosos contendo íons de manganês (AMORIM *et al.*, 2018). Além disso, possui potencial para a produção de etanol a partir de diferentes fontes de carboidratos (SUKPIPAT *et al.*, 2017).

As ferramentas de bioinformática proporcionam uma abordagem refinada para a descoberta de novas informações biológicas, bem como correlações entre os seres vivos ou suas características fenotípicas (HAFT, 2015) e utilizar o conhecimento disponível nos inúmeros bancos de dados é imprescindível nos dias atuais.

Desta forma, este trabalho teve como principal objetivo investigar os possíveis mecanismos biológicos envolvidos no fenótipo de resistência ao limoneno observado em *M. caribbica* através de genômica comparativa, visando a possível identificação de genes relacionados ao fenótipo de resistência observado nesta levedura.

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Microrganismos e meio de cultura

A levedura *M. caribbica* utilizada neste trabalho provém de isolamento realizado pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Biotecnologia de Alimentos (LBA) do Instituto de Ciências e Tecnologia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) a partir da fruta da lobeira (*Solanum lycocarpum*).

As cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Spathaspora passalidarum*, *Spathaspora arborariae* e *Scheffersomyces stipitis* foram cedidos gentilmente pelo Dr. Luciano Gomes Fietto, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa.

Para os experimentos de cultivo foi utilizado o meio *Yeast Malt Medium* adaptado (YM, peptona bacteriológica 0,5%; glicose 1%; extrato de levedura 0,3% e água destilada). Nos casos em que foi necessário o uso de meio sólido, foram adicionados 2% de ágar bacteriológico na formulação.

2.2.2 Teste de resistência ao limoneno

As estratégias de cultivo empregadas neste trabalho tiveram como referência a metodologia utilizada nas etapas de isolamento e seleção de *M. caribbica* realizadas pelo grupo do LBA e conforme descrito por Bicas & Pastore (2007). Os microrganismos foram ativados em meio YM contido em placas de Petri por 48 horas a 30°C em estufa bacteriológica (Thelga, TE64CB). Decorrido o período de ativação uma alíquota de 1 mL de cada cultivo foi transferida para tubos de ensaio com tampa de rosca de 16 por 100 mm (13,5 mL) contendo 6 mL de meio YM estéril. Os tubos foram acondicionados em incubadora com agitação orbital (Tecnal, modelo TE-421) e mantidos por 48 horas a 30°C sob 150 rpm de agitação. Após as 48 horas de cultivo a taxa de crescimento microbiano foi avaliada de forma indireta pela leitura da absorbância a 600 nm (UA) em alíquotas de 200 µL de meio contendo a biomassa em espectrofotômetro digital (Versa Max Microplate Reader, Molecular Devices). Os valores encontrados nesta aferição foram utilizados para a normalização dos inóculos iniciais para o cultivo das leveduras na presença de limoneno. Finalmente, os microrganismos foram cultivados em YM líquido em tubos de ensaio de 13,5 mL contendo 0, 2, 4 e 6% de limoneno ((R)-(+)-limoneno (Sigma-Aldrich, ≥93% de pureza)) (v/v) com inóculo inicial ajustado para 0,6 UA a 30°C e 150 rpm de agitação em incubadora orbital. Além de tais concentrações, também foram conduzidos experimentos utilizando 8 e 10% de limoneno (v/v) para a levedura *M. caribbica*. Leituras de absorbância foram realizadas a cada 24 horas de cultivo até o período máximo de 72 horas. Estes ensaios foram realizados em triplicata técnica.

2.2.3 Genômica comparativa

Os genomas utilizados neste trabalho estão disponíveis no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) e os números de acesso de cada montagem estão listados na Tabela 1. De forma geral, a metodologia da genômica comparativa pode ser resumida em três grandes etapas: a predição de todos os genes a partir da montagem de um dos genomas de referência para cada microrganismo; identificação e agrupamento de genes ortólogos; e, finalmente, a anotação das possíveis proteínas codificadas pelos genes de interesse. Estas etapas foram realizadas em ambiente virtual Linux e tanto os programas quanto os dados resultantes das análises foram hospedados no servidor Júpiter da Diretoria da Tecnologia da Informação da UFV.

Tabela 3: Genomas e números de acesso. Números de acesso para cada genoma utilizado neste trabalho.

Microorganismo	Número de acesso
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GCF_000146045.2
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	GCF_001417885.1
<i>Spathaspora passalidarum</i>	GCF_000223485.1
<i>Spathaspora arborariae</i>	GCA_000497715.1
<i>Scheffersomyces stipitis</i>	GCF_000209165.1
<i>Meyerozyma caribbica</i>	GCA_000755205.1

A predição dos genes para cada genoma selecionado foi realizada com o uso do *software* Augustus (versão 3.2.2, disponível em: <http://augustus.gobics.de/>) (STANKE *et al.*, 2008) com os parâmetros para recuperação de proteínas e *cds* ligados. O agrupamento dos genes ortólogos foi realizado conforme metodologia descrita por Mendes e colaboradores, (2013) através do *software* OrthoMCL (LI; STOECKERT; ROOS, 2003). Os agrupamentos de genes exclusivos de cada genoma foram recuperados com a função GREP (função do terminal Linux) a partir dos resultados do OrthoMCL. Posteriormente, foi feita a anotação das proteínas agrupadas e classificadas como ortólogas exclusivas de *M. caribbica* com o uso do *software* InterProScan 5.30 (JONES *et al.*, 2014) que realiza a predição de domínios e famílias proteicas a partir das sequências de *cds* resultantes do *software* Augustus correlacionando-as ao banco de dados do InterPro (MITCHELL *et al.*, 2019).

2.2.4 Doseamento de limoneno

O doseamento de limoneno intracelular foi realizado através de leituras em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas. A metodologia foi realizada em colaboração técnica com o Dr. Sérgio Antônio Fernandes do Departamento de Química da UFV.

Primeiramente, foram cultivadas em tubos de ensaio de 13,5 mL as leveduras *S. cerevisiae*, *K. marxianus*, *S. passalidarum* e *M. caribbica* em 5,79 mL de meio YM a 30°C e 150 rpm de agitação em incubadora orbital até que os meios de cultivo atingissem densidade ótica de 1 UA. Uma alíquota de 300 µL de cada cultivo foi reservada para se realizar o teste de viabilidade celular por diluição seriada e plaqueamento em microgotas. Em seguida, foram adicionados 240 µL de limoneno (totalizando 4% (v/v)) em cada tubo e estes foram vortexados por 1 minuto. Os tubos foram dispostos novamente na incubadora a 30°C e 150 rpm de agitação. Após 15 minutos, 300 µL de cada cultivo foram reservados para se realizar um segundo teste de viabilidade celular. Posteriormente, duas alíquotas de 600 µL de cada

cultura em contato com limoneno foram utilizadas para a extração dos compostos voláteis em solvente orgânico adaptando-se a metodologia de (MOLINA *et al.*, 2015).

O teste de viabilidade celular foi realizado, portanto, em dois momentos: células recém cultivadas em meio YM e estas mesmas culturas após contato com limoneno em 4% (v/v) por 15 minutos. A partir de 300 μ L reservados de cada cultivo foram preparadas sucessivas alíquotas por meio de diluição seriada nas escalas de 1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000 e 1: 20.000 que finalmente foram dispostas em placas de Petri contendo meio YM na forma de microgotas (em volume de 10 μ L) e acondicionadas em estufa bacteriológica a 30°C por 48 horas. As placas foram fotografadas com uso de fotodocumentador (Transiluminador UVB LTB-20X20HE, Loccus do Brasil, Cotia, São Paulo, Brasil) após o período de incubação.

Para a extração dos compostos voláteis, 600 μ L dos meios de cultura que sofreram exposição de 15 minutos ao limoneno foram dispostos em tubos de microcentrifuga de 1,5 mL e centrifugados a 3.000 rpm por 5 minutos (Nova Instrument, NI1802). O sobrenadante foi separado do precipitado em novos tubos de 1,5 mL. Como solvente foi usado acetato de etila e este foi adicionado na proporção de 1:1 para o volume inicial de amostra (600 μ L) em cada tubo (sobrenadante e precipitado) que então foram vortexados por 1 minuto. Nova etapa de centrifugação foi realizada seguindo as configurações previamente citadas e a fase orgânica (transparente) de cada tubo transferida para novos tubos de 1,5 mL contendo 100 mg de sulfato de sódio anidro. O processo de adição de solvente, mistura em vórtex, centrifugação e transferência da fase orgânica para o tubo final foi repetido três vezes. O volume final de amostra extraída em aceto de etila foi de aproximadamente 1,8 mL. Uma curva de calibração para correlacionar as áreas de pico de dosagem do limoneno em relação às amostras biológicas foi desenhada com 8 pontos (0; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 3 e 4 μ L de limoneno por mL de acetato de etila).

Para o doseamento do limoneno foi empregado um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (SHIMADZU, GCMS-QP2010 Ultra) equipado com uma coluna sílica fundida Restek Rtx-5MS (30 m comprimento, 0,25mm de diâmetro interno e 0,25 μ m de espessura de filme), 5% difenil e 95% dimetil polisiloxano. Hélio foi usado como gás de arraste a uma vazão constante de 1,8 mL/minuto. O injetor do tipo *split-splitless* permaneceu a 220°C e foi usado no modo *split* com razão de *split* de 40:1, o detector foi mantido a uma temperatura de 240°C na linha de transferência, energia de impacto de +70 eV e faixa de massas de 35-400 m/z. A temperatura do forno do cromatógrafo a gás foi mantida a 40°C por

2 minutos, elevada a 200°C a uma taxa de 10°C/minuto, permanecendo nessa temperatura por mais 5 minutos.

2.2.5 Análise estatística

Com o intuito de avaliar e identificar se houve diferença significativa entre os valores do doseamento de limoneno, foi realizada a Análise de Variância (ANOVA) com teste de Bonferroni para correção de múltipla hipótese utilizando o *software* GraphPad Prism versão 8.0.1, ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Teste de resistência ao limoneno

Para avaliar o crescimento dos microrganismos sob as condições de cultivo empregadas neste trabalho, todas as leveduras foram cultivadas em meio YM sem a adição do limoneno e posteriormente na presença de 2, 4 e 6% (v/v) deste monoterpene. Além disso, a levedura *M. caribbica* também foi cultivada em 8 e 10% de limoneno (v/v) por apresentar um fenótipo de resistência bem diferenciado em relação às demais leveduras utilizadas. Até onde sabemos, este pode ser o primeiro relato científico correlacionando fenótipo de resistência a terpeno a esta espécie de levedura.

A Figura 7 apresenta as curvas de crescimento padrão observadas a partir da leitura indireta de crescimento microbiano por densidade ótica, medida em unidades de absorvância. A levedura *S. cerevisiae* apresentou um crescimento bem discreto em relação às outras leveduras na curva padrão. No cultivo na presença de 2% de limoneno (Figura 8) é perceptível que, de uma maneira geral, todas as leveduras apresentaram um leve crescimento após 48 horas de cultivo. Tratando-se da linhagem *M. caribbica*, o crescimento foi bastante pronunciado, deixando nítido sua robustez quanto à resistência ao limoneno em relação às demais leveduras. Este padrão de crescimento diferenciado se mantém na concentração de 4% de limoneno (v/v) (Figura 9), porém com um platô entre o período de 24 a 48 horas de cultivo. Enquanto isso, no cultivo contendo 6% (Figura 10) de limoneno, a curva de crescimento é bem acentuada desde o início da fase exponencial (24 horas). Analisando as tendências observadas nestas curvas, pode-se perceber que *M. caribbica* apresenta um potencial de crescimento singular em comparação às demais leveduras utilizadas, nas condições de cultivo testadas.

Com a finalidade de observar se este fenótipo se manteria em concentrações mais altas de limoneno, o crescimento de *M. caribbica* foi testado em cultivo contendo 8 e 10% do terpeno. Neste caso, foi possível observar que mesmo nestas concentrações o crescimento desta levedura não foi inibido (Figura 11).

Figura 7: Curvas padrão de crescimento microbiano na ausência de limoneo. É possível observar que a maioria das leveduras atingiu suas respectivas fases de crescimento exponencial nas condições de cultivo empregadas. A exceção foi a levedura *S. cerevisiae*, que apresentou crescimento bem discreto.

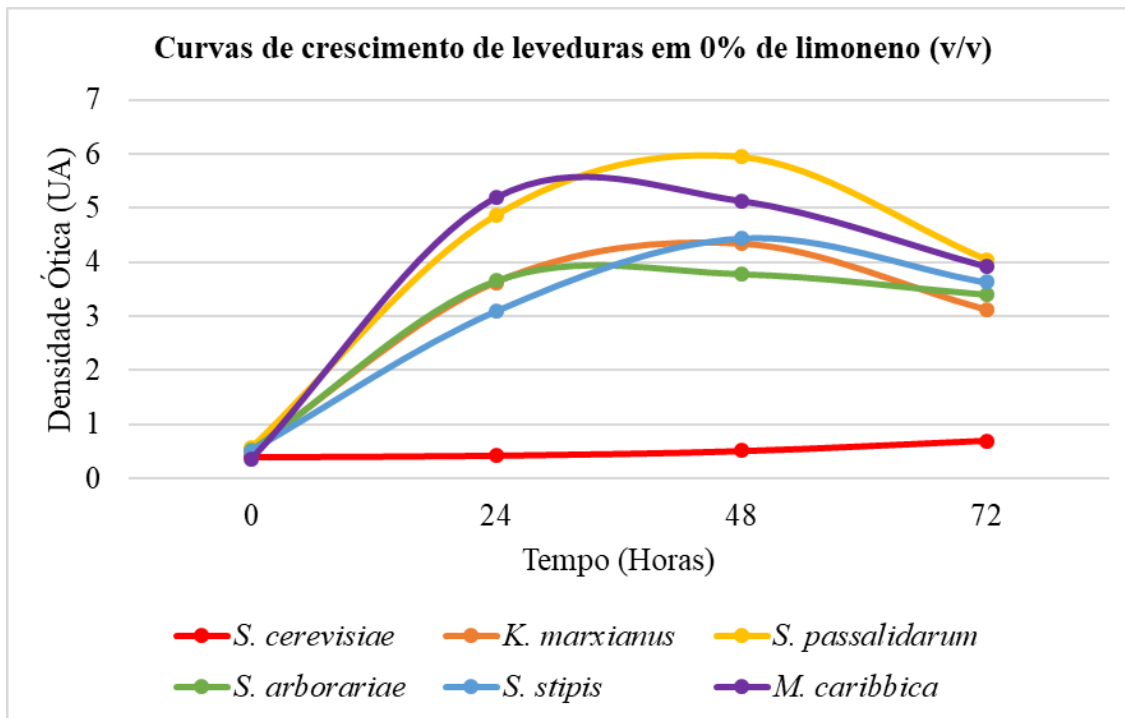


Figura 8: Curvas de crescimento de leveduras na presença de 2% de limoneno (v/v). Apesar de ser possível observar um leve aumento nas densidades celulares de todas as leveduras no período de 48 horas de cultivo, *M. caribbica* apresenta perfil de crescimento superior às demais

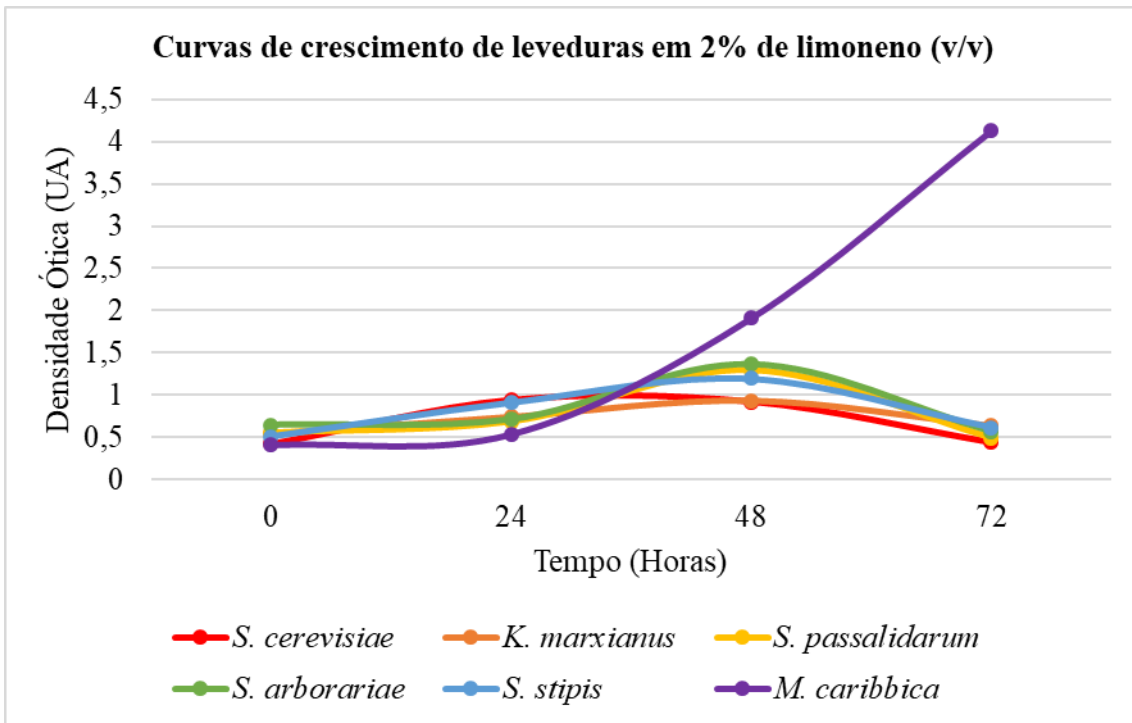


Figura 9: Curvas de crescimento de leveduras na presença de 4% de limoneno (v/v). A robustez no crescimento de *M. caribbica* na presença de 4% de limoneno (v/v) é evidenciada em relação às demais leveduras.

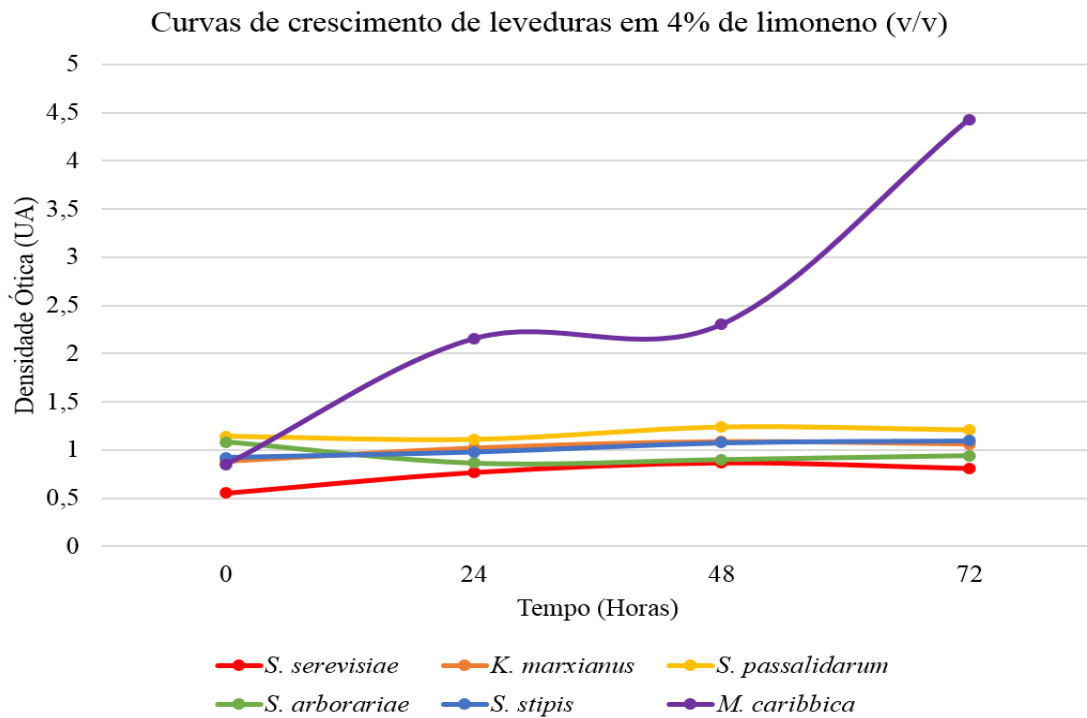


Figura 10: Curvas de crescimento de leveduras na presença de 6% de limoneno (v/v). Novamente é possível perceber o perfil de crescimento singular de *M. caribbica*, entretanto, *S. stipitis* apresentou um considerável crescimento após 48 horas de cultivo.

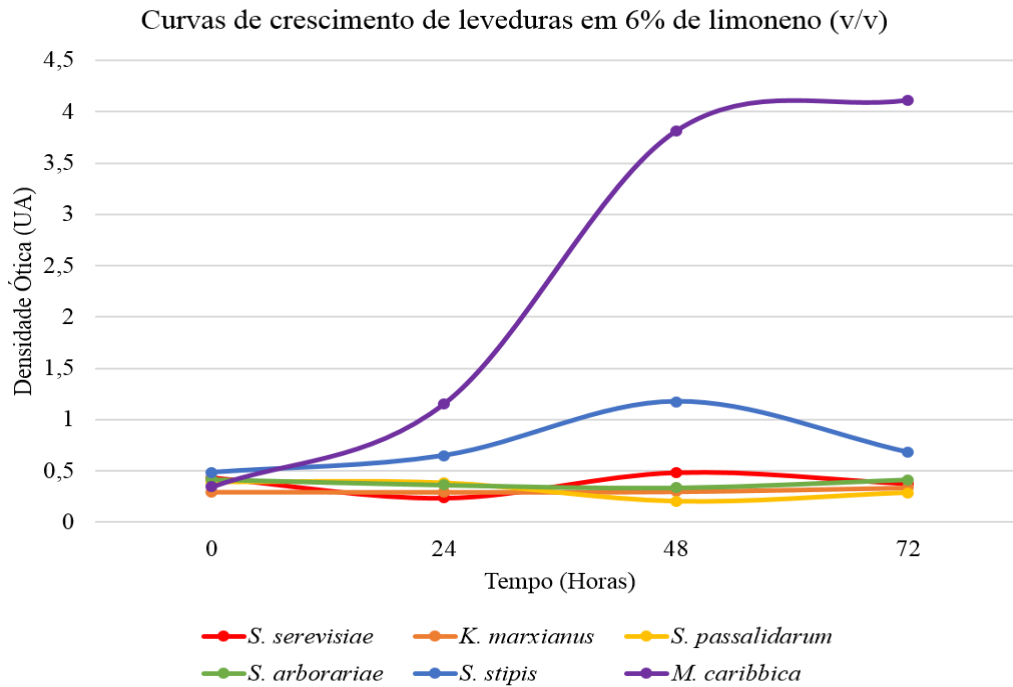
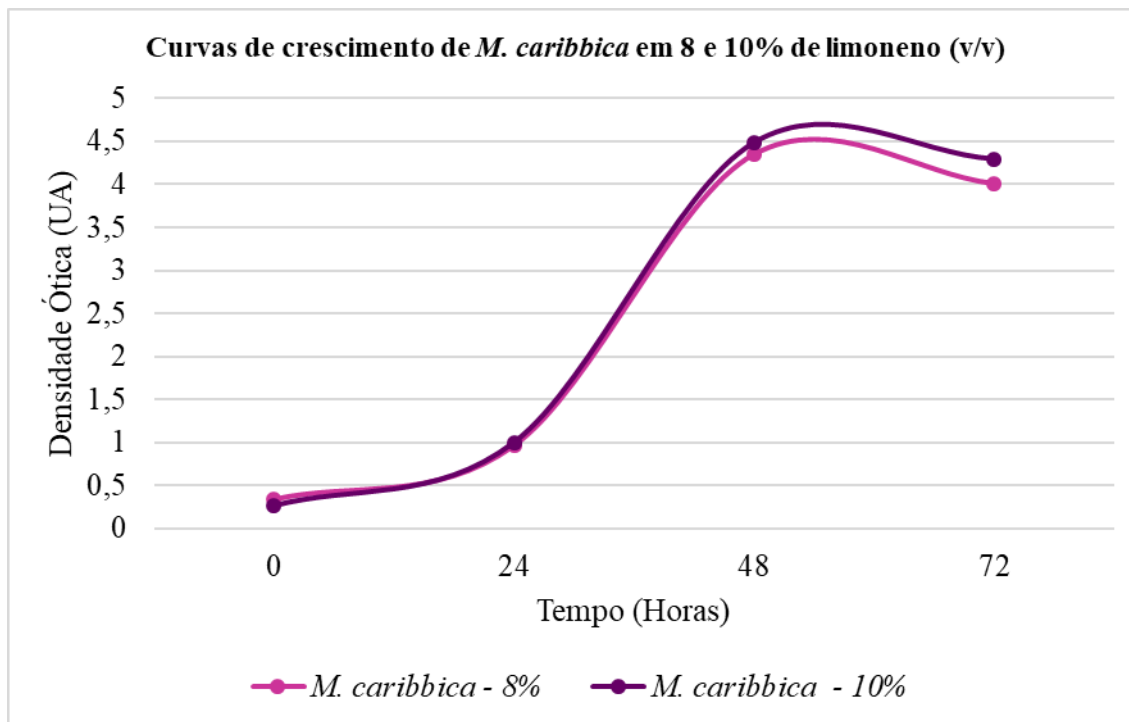


Figura 11: Curvas de crescimento de *M. caribbica* na presença de 8 e 10% de limoneno (v/v). Mesmo em concentrações de 8 e 10% de limoneno (v/v) o crescimento de *M. caribbica* não foi inibido.



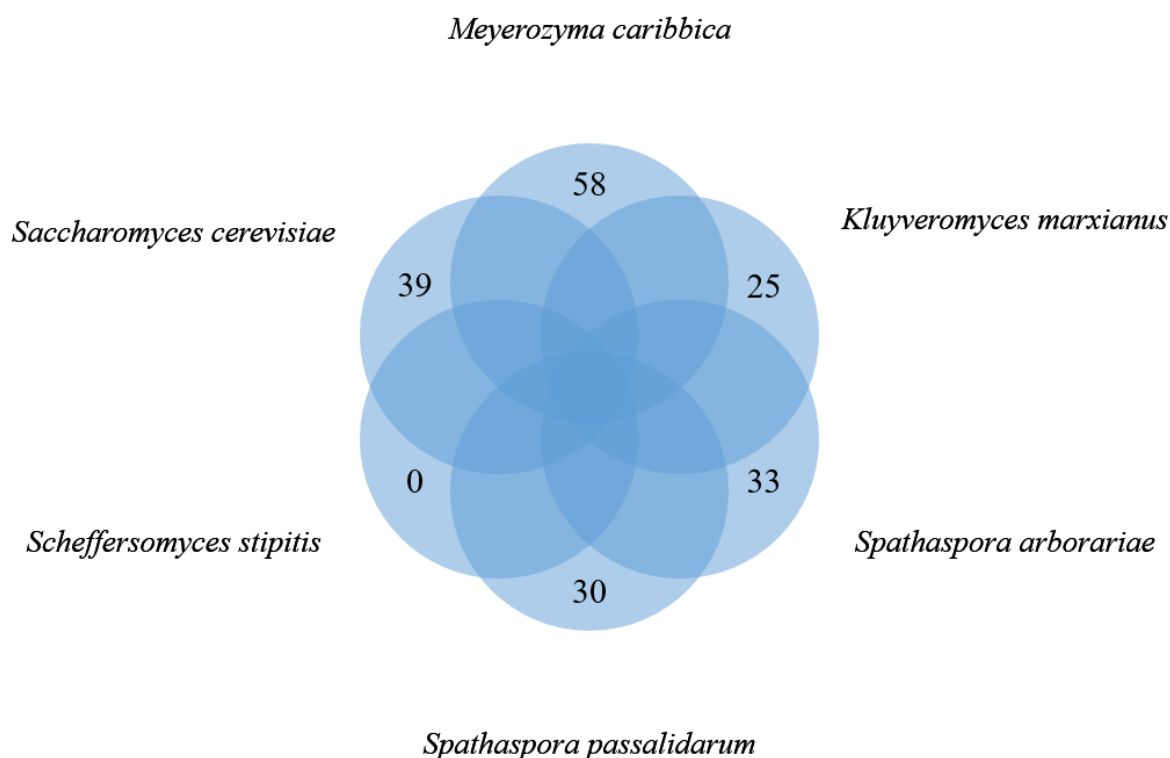
Os perfis de crescimento de *M. caribbica* em contato com o limoneno, em comparação às demais leveduras, sugerem fortemente que há mecanismos biológicos atuando de forma a convergir em um perfil de resistência ao limoneno.

2.3.2 Genômica comparativa

Uma das estratégias utilizadas com bastante sucesso para investigar características fenotípicas de seres vivos é a técnica de genômica comparativa (GRUEBER, 2015). Por meio de métodos computacionais, torna-se possível identificar grupos de genes de organismos distintos que compartilham ancestralidade e funções biológicas, bem como semelhanças e diferenças a nível genético (COUTINHO; FRANCO; LOBO, 2015).

Após predizer os genes e classificá-los em grupos de ortólogos com base nos genomas referidos na Tabela 3, foram encontrados 58 agrupamentos (*clusters*) de genes ortólogos exclusivos no genoma de *M. caribbica*; 39 para *S. cerevisiae*; 25 para *K. marxianus*; 30 para *S. passalidarum*; 33 para *S. arborariae* e nenhum para *S. stipitis* conforme o diagrama de Venn a seguir (Figura 12).

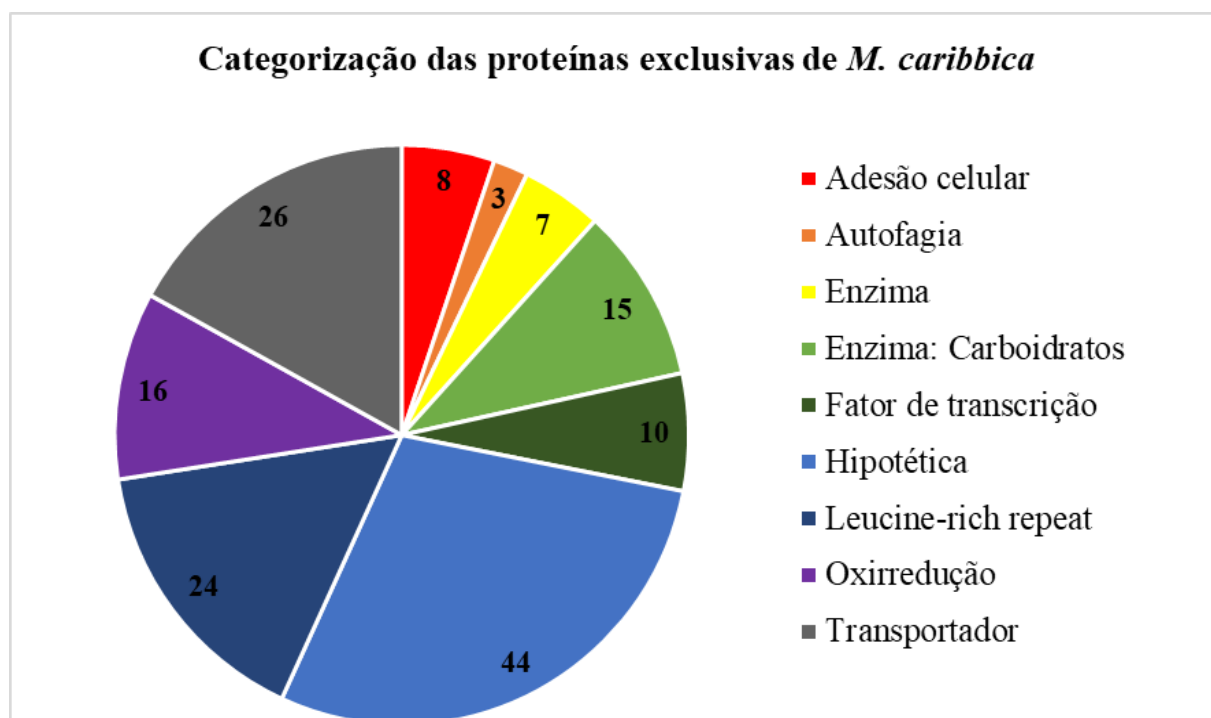
Figura 12: Diagrama de Venn dos grupos de genes ortólogos. Foram encontrados 58 agrupamentos de genes ortólogos exclusivos da levedura *M. caribbica* em relação às demais. Tais grupos de genes podem estar relacionados ao fenótipo de resistência ao limoneno observado nesta levedura. Foram encontrados também 39 grupos exclusivos para *S. cerevisiae*, 25 para *K. marxianus*, 30 para *S. passalidarum*, 33 para *S. arborariae* e nenhum para *S. stipitis*.



Buscando entender quais processos biológicos poderiam estar envolvidos no fenótipo de resistência ao limoneno observado em *M. caribbica*, e levando em consideração que tal característica pode estar relacionada aos genes que este microrganismo possui com exclusividade, foi realizada a anotação das proteínas presentes nos 58 clusters restritos a esta

levedura. A Figura 13 apresenta a categorização da anotação de todas as proteínas presentes nos 58 agrupamentos de genes ortólogos exclusivos de *M. caribbica*. Foram encontradas sete categorias de proteínas: adesão celular (8), autofagia (3), enzimas (22, sendo 15 relacionadas a carboidratos), fatores de transcrição (10), *leucine-rich repeat* (24), oxirredução (16) e transportadores (26), além de proteínas hipotéticas (44), ou seja, de função desconhecida.

Figura 13: Categorização das proteínas codificadas pelos genes ortólogos exclusivos de *M. caribbica*. Foram encontradas sete categorias de proteínas (Adesão celular, autofagia, enzimas, fatores de transcrição, *leucine-rich repeat*, oxirredução e transportadores, além de proteínas hipotéticas, ou seja, de função desconhecida).



A categoria com mais representantes foi a de transportadores, sendo constituída por 26 proteínas. Destas, todas estão relacionadas a MFS *transporter superfamily*, a maior família de transportadores secundários e que está presente em todas as formas de vida (YAN, 2013). Este achado é de grande relevância pois é sabido que bombas de efluxo podem estar relacionadas a redução de toxicidade e tolerância a solventes orgânicos em microrganismos (JONGEDIJK *et al.*, 2016). A toxicidade exercida pelo limoneno aos microrganismos está ligada em grande parte a sua característica lipofílica, que faz com o terpeno seja acumulado na membrana das células desencadeando o comprometimento da integridade da membrana plasmática e inibição de algumas de suas funções (GRIFFIN, S.; WYLLIE; MARKHAM, 1999). Portanto, o grande número de proteínas transportadoras encontradas no genoma de *M.*

caribbica sugere que os mecanismos de resistência podem estar relacionados a transportadores de limoneno presentes neste microrganismo.

2.3.3 Doseamento de limoneno

Baseando-se na hipótese de que o fenótipo de resistência observado em *M. caribbica* possa estar relacionado a proteínas transportadoras, o doseamento de limoneno intracelular foi avaliado por cromatografia gasosa em comparação a outras três leveduras (*S. cerevisiae*, *K. marxianus* e *S. passalidarum*).

A Figura 14 retrata os testes de viabilidade celular realizados antes (A) e depois (B) da exposição das culturas ao limoneno a 4% (v/v), por 15 minutos. Antes da exposição o crescimento celular é observado para todas as leveduras e em todas as diluições realizadas, demonstrando a viabilidade de tais células. Após o período de exposição, é possível observar crescimento microbiano somente de *K. marxianus* e *M. caribbica*.

Figura 14: Teste de viabilidade celular antes de depois da exposição ao limoneno. A - Crescimento celular antes da exposição ao limoneno evidenciando a viabilidade celular dos microrganismos. B - É possível observar crescimento microbiano somente para *K. marxianus* e *M. caribbica*.

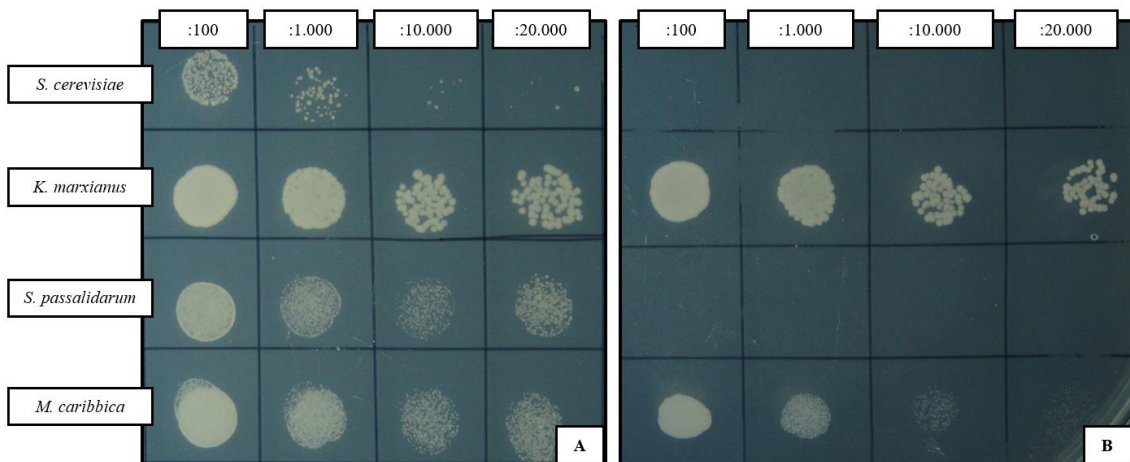
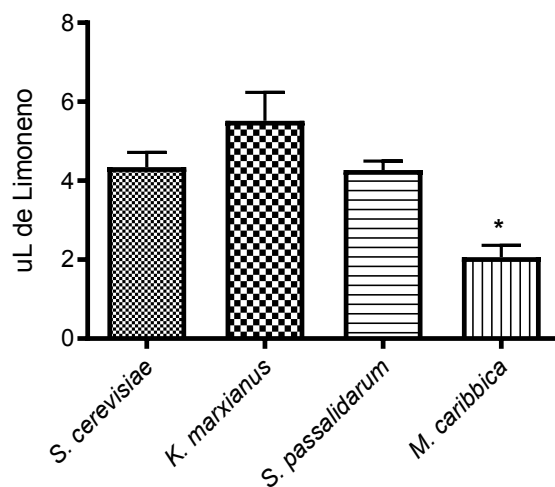


Figura 15: Limoneno intracelular. Representação gráfica dos valores obtidos após doseamento de limoneno intracelular das leveduras. As barras acima das colunas representam os valores de desvio padrão. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) nos valores encontrados em *M. caribbica* em relação às demais leveduras.



Após análise estatística dos valores obtidos no doseamento intracelular de limoneno, foi constatada diferença significativa ($p > 0,05$) entre os valores observados para *M. caribbica* aqueles observados para as demais leveduras (Figura 15). Foram detectadas menores quantidades de limoneno intracelular em *M. caribbica* e este microrganismo permaneceu viável após o período de exposição ao limoneno. Estes resultados corroboram a hipótese de que proteínas transportadoras estariam contribuindo para um menor acúmulo de limoneno intracelular em *M. caribbica* e, possivelmente, contribuindo para o fenótipo de resistência observado ao longo deste trabalho.

2.4 Conclusão

Embora os processos de bioconversão de terpenos para a produção de compostos de valor agregado apresentem claras vantagens em relação aos tradicionais processos de síntese química, a toxicidade celular dos substratos utilizados pode inviabilizar a implementação desta estratégia. Uma das formas de superar esta limitação é através do uso de microrganismos que apresentem uma natural resistência aos terpenos. Neste enfoque, este trabalho visou avaliar o fenótipo de resistência ao limoneno da levedura *Meyerozyma caribbicae*, através de genômica comparativa, foram identificados potenciais mecanismos relacionados a esse fenótipo.

Foram encontrados 58 agrupamentos de genes ortólogos exclusivos de *M. caribbica* em relação às demais leveduras utilizadas neste estudo e, a partir desses *clusters*, foram identificados 26 genes dos quais as anotações remetem a proteínas transportadoras do

tipo MFS *transporter superfamily*. Com o intuito de investigar um potencial mecanismo de resistência ligado aos genes de proteínas transportadoras, os níveis intracelulares de limoneno foram dosados. Em *M. caribbica*, estes foram menores do que aqueles encontrados nas outras leveduras comparadas, fato que sugere a existência de um possível mecanismo de efluxo de limoneno.

Os resultados encontrados neste estudo corroboram a hipótese de que o fenótipo de resistência observado em *M. caribbica* está relacionado a proteínas de transporte que provavelmente atuam de forma a minimizar o acúmulo de limoneno no interior das células. Além disso, este parece ser o primeiro relato demonstrando o fenótipo de resistência ao limoneno de *M. caribbica*. Os resultados aqui apresentados apontam que *M. caribbica* pode ser um importante microrganismo a ser empregado em processos biotecnológicos utilizando o limoneno como substrato para obtenção de compostos de valor agregado.

REFERÊNCIAS

ALONSO-GUTIERREZ, Jorge *et al.* Metabolic engineering of *Escherichia coli* for limonene and perillyl alcohol production. *Metabolic Engineering*, v. 19, p. 33–41, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2013.05.004>>.

AMORIM, Soraya Sander *et al.* Manganese (Mn²⁺) tolerance and biosorption by *Meyerozyma guilliermondii* and *Meyerozyma caribbica* strains. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 6, n. 4, p. 4538–4545, 2018.

BEN AKACHA, Najla; GARGOURI, Mohamed. Microbial and enzymatic technologies used for the production of natural aroma compounds: Synthesis, recovery modeling, and bioprocesses. *Food and Bioprocesses Processing*, v. 94, n. September, p. 675–706, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2014.09.011>>.

BICAS, Juliano Lemos; PASTORE, Gláucia Maria. Isolation and screening of D-limonene-resistant microorganisms. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, n. 3, p. 563–567, 2007.

COUTINHO, Tarcisio José Domingos; FRANCO, Glória Regina; LOBO, Francisco Pereira. Homology-Independent Metrics for Comparative Genomics. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, v. 13, p. 352–357, 2015.

FELIPE, Lorena de Oliveira *et al.* Bioaromas - Perspectives for sustainable development. *Trends in Food Science & Technology*, v. 62, p. 141–153, 2017.

GRIFFIN, S.; WYLLIE, S. Grant; MARKHAM, J. Determination of octanol-water partition coefficient for terpenoids using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 864, n. 2, p. 221–228, 1999.

GRUEBER, Catherine E. Comparative genomics for biodiversity conservation.

Computational and Structural Biotechnology Journal, v. 13, p. 370–375, 2015.

HAFT, Daniel H. Using comparative genomics to drive new discoveries in microbiology. *Current Opinion in Microbiology*, v. 23, p. 189–196, 2015.

JONES, Philip *et al.* InterProScan 5: Genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, v. 30, n. 9, p. 1236–1240, 2014.

JONGEDIJK, Esmer *et al.* Biotechnological production of limonene in microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 100, n. 7, p. 2927–2938, 2016.

LI, Li; STOECKERT, Christian J Jr; ROOS, David S. OrthoMCL: Identification of Ortholog Groups for Eukaryotic Genomes -- Li *et al.* 13 (9): 2178 -- *Genome Research*. *Genome Research*, v. 13, n. 9, p. 2178–2189, 2003.

MENDES, T. A.O. *et al.* Repeat-enriched proteins are related to host cell invasion and immune evasion in parasitic protozoa. *Molecular Biology and Evolution*, v. 30, n. 4, p. 951–963, 2013.

MITCHELL, Alex L. *et al.* InterPro in 2019: Improving coverage, classification and access to protein sequence annotations. *Nucleic Acids Research*, v. 47, n. D1, p. D351–D360, 2019.

MOLINA, Gustavo *et al.* Comparative study of the bioconversion process using R-(+)- and S-(-)-limonene as substrates for *Fusarium oxysporum* 152B. *Food Chemistry*, v. 174, p. 606–613, 2015.

STANKE, Mario *et al.* Using native and syntenically mapped cDNA alignments to improve de novo gene finding. *Bioinformatics*, v. 24, n. 5, p. 637–644, 2008.

SUKPIPAT, Wiphat *et al.* Purification and characterization of xylitol dehydrogenase with L-arabitol dehydrogenase activity from the newly isolated pentose-fermenting yeast *Meyerozyma caribbica* 5XY2. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 123, n. 1, p. 20–27, 2017.

VESPERMANN, Kele A. C. *et al.* Biotransformation of α - and β -pinene into flavor compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 101, n. 5, p. 1805–1817, mar. 2017.

WANG, Ye *et al.* A specialized ABC efflux transporter *GcABC-G1* confers monoterpene resistance to *Grosmannia clavigera*, a bark beetle-associated fungal pathogen of pine trees. *New Phytologist*. [S.l.: s.n.], 2013

YAN, Nieng. Structural advances for the major facilitator superfamily (MFS) transporters. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 38, n. 3, p. 151–159, 2013.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção de compostos de aroma por vias biotecnológicas representa um avanço científico considerável em relação aos processos químicos tradicionais pois através do uso de microrganismos é possível se obter compostos de maior qualidade e pureza. Os terpenos são muito utilizados nessa estratégia de produção devido sua abundância e baixo custo, sendo o limoneno um dos representantes mais proeminentes destes substratos. Entretanto, a toxicidade deste terpeno para os microrganismos limita o escalonamento e produção em larga escala de compostos de valor agregado por esta metodologia. Uma das alternativas para sobrepujar essa limitação é o uso de microrganismos resistentes aos efeitos tóxicos causados pelo limoneno.

Este trabalho teve por objetivos principais isolar e caracterizar microrganismos que apresentassem fenótipo de resistência ao limoneno e investigar os potenciais mecanismos envolvidos nestes fatores.

No estudo, foram encontrados 29 microrganismos com perfil de resistência ao limoneno, provenientes de fontes vegetais. Destes, foi possível identificar três a nível de espécie através do uso de marcadores genéticos, a saber: *Bacillus cereus*, *B. mycoides* e *Meyerozyma caribbica*. Para as bactérias encontradas, também foi possível realizar um teste comparativo de tolerância ao limoneno com outras três linhagens de *Bacillus* isoladas por outros cientistas. Com base nos resultados observados foi possível postular que o limoneno exerça efeito bacteriostático às bactérias do gênero *Bacillus*.

Além disso, através de genômica comparativa, 26 genes codificantes de proteínas transportadoras puderam ser identificados estando presentes somente em *M. caribbica* em relação a outras cinco leveduras com fenótipo de susceptibilidade ao limoneno. Dosagens de limoneno intracelular, a correlação entre função anotada para os genes estudados e a observação do fenótipo, deram indícios de que aqueles transportadores podem estar relacionados ao mecanismo de resistência ao limoneno descrito na levedura estudada.

Os resultados deste trabalho representam um avanço significativo para a área de bioprocessos, considerando o potencial das linhagens isoladas e identificadas. Além disso, outro ponto de destaque deste estudo foi a abordagem computacional para identificação *in silico* de potenciais alvos para estudos futuros, como foi o caso dos transportadores MFS encontrados.