



MARIANA RECCO PIMENTEL

**PRODUÇÃO DE COMPOSTOS DE AROMA A PARTIR DA
BIOTRANSFORMAÇÃO DE MONOTERPENOS POR *PSEUDOMONAS***

**PRODUCTION OF AROMA COMPOUNDS THROUGH
BIOTRANSFORMATION OF MONOTERPENES BY *PSEUDOMONAS***

CAMPINAS

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MARIANA RECCO PIMENTEL

**PRODUÇÃO DE COMPOSTOS DE AROMA A PARTIR DA
BIOTRANSFORMAÇÃO DE MONOTERPENOS POR *PSEUDOMONAS***

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Gláucia Maria Pastore

**PRODUCTION OF AROMA COMPOUNDS THROUGH
BIOTRANSFORMATION OF MONOTERPENES BY *PSEUDOMONAS***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Master thesis presented to the Food Science Post Graduation Programme of the School of Food Engineering of the University of Campinas to obtain the Master grade in Food Science.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA MARIANA RECCO PIMENTEL E ORIENTADA
PELA PROFA. DRA. GLÁUCIA MARIA PASTORE

Assinatura da Orientadora

CAMPINAS, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

P649p Pimentel, Mariana Recco, 1984-
Produção de compostos de aroma a partir da
biotransformação de monoterpenos por pseudomonas /
Mariana Recco Pimentel. -- Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Gláucia Maria Pastore.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Aroma. 2. Monoterpenos. 3. Biotransformação.
4. Pseudomonas. 5. Cromatografia gasosa. I. Pastore,
Gláucia Maria. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Production of aroma compounds through biotransformation of
monoterpenes by pseudomonas

Palavras-chave em inglês:

Flavor

Monoterpenes

Biotransformation

Pseudomonas

Gas Chromatography

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestra em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Gláucia Maria Pastore [Orientador]

Mário Roberto Maróstica Júnior

Daniele Souza de Carvalho

Data da defesa: 30-11-2012

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Glaucia Maria Pastore (DCA/FEA/Unicamp) – Orientadora

MEMBRO

Prof. Dr. Mario Roberto Marostica Junior (DEPAN/FEA/Unicamp)

MEMBRO

Profª Drª Daniele Souza de Carvalho (IFSP)

MEMBRO

Drª. Luciana Malta (DCA/FEA/Unicamp)

SUPLENTE

Drª. Ana Paula Dionisio (Embrapa-FOR)

SUPLENTE

AGRADECIMENTOS

À professora Gláucia Pastore, pela orientação, pelos incentivos e por acreditar no meu trabalho.

Aos membros da banca examinadora pelo auxílio na correção, sugestões e críticas.

À minha família, pelo apoio, incentivos e suporte ao longo da minha educação.

Ao Huber, pelo amor e cumplicidade sempre.

Aos meus eternos amigos de Campinas: Viviane, Priscila, Thaís, Soraia, e à família Otarola Gallego que fazem parte de grandes momentos da minha vida.

Aos meus queridos amigos esalqueanos: Denci, Acerola, Mar&sol, e Xakrinha.

Aos meus amigos do Laboratório de Bioaromas: Dani, Xispita, Rosângela, Ju Piccoli, Carol, Ju Bueno, Beth, Lu Malta, Érica, Angélica, Ana Simiqueli, Ana Flávia, Cristiano, Mônica, Julia, Tokie, Renato, Lázaro, Renata Lino, Mônica, Rebecca (Panqk), Patrícia, Adriane, Renata Sancho, Michelle, Géssica, Leonardo, Verônica e demais colegas, por todas risadas, conversas e desabafos.

Aos alunos de intercâmbio Aurélie (França) e Gerardo (México), por tornar nosso ambiente mais alegre e agradável.

Agradeço em especial ao Gustavo Molina, pela amizade, pela força, pelos ensinamentos e sugestões ao longo do trabalho, e por não me deixar desanimar com as dificuldades.

À Ourinhos pela ajuda indispensável nos experimentos finais, e pela amizade e carinho. E mais recentemente, à Karol pelo apoio e amizade.

Ao Nadir, por me acolher com muito carinho e se tornar um grande amigo, por fazer do Laboratório um ambiente mais agradável, e por estar ao meu lado nas alegrias e tristezas.

Aos funcionários da FEA-Unicamp, sobretudo ao Cosme e Marcão, pessoal da manutenção, almoxerifado e administração, pelo auxílio constante e disponibilidade;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Mestrado oferecida e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro oferecido através do projeto de Auxílio a Pesquisa (processo número 2011/50687-7).

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
ÍNDICE DE TABELAS.....	7
RESUMO GERAL.....	9
ABSTRACT.....	11
INTRODUÇÃO GERAL	13
1. Terpenos	13
2. Aromas.....	15
3. Obtenção de compostos de aromas	16
3.1. Limitações e desafios dos processos de biotransformação	18
4. Prospeção da biotecnologia no mercado mundial.....	19
5. Referências bibliográficas.....	20
CAPÍTULO 1	25
<i>PSEUDOMONAS: A PROMISING BIOCATALYST FOR THE BIOCONVERSION OF TERPENES.....</i>	25
ABSTRACT.....	25
1. General Information	26
2. Biotransformation processes	27
2.1. Acyclic monoterpenes/terpenoids	29
2.2. Monocyclic monoterpenes/terpenoids.....	31
2.3. Bicyclic monoterpenes/terpenoids	35
2.4. Sesquiterpenes/terpenoids	38
2.5. Biotransformation of other compounds (non-isoprenoids)	39
3. Industrial applications and patents	41
4. References.....	42

CAPÍTULO 2	59
ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS DO GÊNERO PSEUDOMONAS POTENCIALMENTE BIOTRANSFORMADORES DE MONOTERPENOS.....	59
RESUMO	59
1. Introdução	60
2. Material e métodos	63
2.1. Reagentes	63
2.2. Isolamento de micro-organismos em meio seletivo para <i>Pseudomonas</i>	64
2.3. Etapas do Pré-inóculo.....	65
2.3.1. Preparação da cultura de células	65
2.3.2. Recuperação da biomassa	65
2.4. Procedimento de biotransformação de monoterpênos	65
2.5. Variação do pH do meio de biotransformação.....	65
2.6. Indução das linhagens	66
2.7. Procedimento de extração	66
2.8. Análises cromatográficas dos produtos formados.....	66
3. Resultados e Discussão	67
3.1. Isolamento de micro-organismos em meio seletivo para <i>Pseudomonas</i>	67
3.2. Biotransformação de monoterpênos.....	69
3.2.1. Biotransformação de <i>R</i> -(+)-Limoneno.....	70
3.2.2. Biotransformação de α -Pineno.....	75
3.2.3. Biotransformação de Citronelol.....	79
3.3. Efeito da variação do pH do meio de biotransformação	83
3.3.1. Crescimento microbiano	83
3.3.2. Formação de produtos em diferentes valores de pH.....	85
3.3.2.1. Limoneno	85
3.3.2.2. α -Pineno	87
3.3.2.3. Citronelol.....	87
3.4. Efeito da indução das linhagens na formação dos produtos.....	88
3.4.1. Limoneno	91
3.4.2. α -Pineno	93
3.4.3. Citronelol	95
4. Conclusão	96
5. Referências bibliográficas.....	97

<i>CAPÍTULO 3</i>	107
<i>BIOTRANSFORMATION OF CITRONELLOL IN ROSE OXIDE__BY PSEUDOMONAS SPP.</i>	107
<i>ABSTRACT</i>	108
1. Introduction	108
2. Material and Methods	110
2.1. Reagents and Standards	110
2.2. Microorganisms and cultivation	110
2.3. Cell culture preparation	111
2.4. Evaluation of terpene citotoxicity	111
2.5. Biotransformation experiments	111
2.6. Analysis of the samples by GC-MS	112
3. Results and Discussion	112
4. Conclusion	115
5. References	115
<i>CONCLUSÃO GERAL</i>	119

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1. *PSEUDOMONAS*: A PROMISING BIOCATALYST FOR BIOCONVERSION OF TERPENES25

Figure 1. Substrates used by strains of <i>Pseudomonas</i> in bioconversion processes.....	28
Figure 2. Bioconversion of (<i>R</i>)-(+)- β -citronellol to <i>cis</i> - and <i>trans</i> -rose oxide by the <i>Pseudomonas</i> spp. strain.	30
Figure 3. Bioconversion of myrcene by <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
Figure 4. Bioconversion pathways of limonene and related compounds by strains of <i>Pseudomonas</i>	32
Figure 5. Biotransformation of isoeugenol into vanillin by <i>Pseudomonas</i> sp. strain ISPC2.	35
Figure 6. Degradation pathways of α -pinene by <i>Pseudomonas</i>	38
Figure 7. Biotransformation of valencene to nootkatone by engineered bacterial CYP450 enzymes from <i>Pseudomonas putida</i> (P450cam).	39

CAPÍTULO 2. ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS DO GÊNERO *PSEUDOMONAS* POTENCIALMENTE BIOTRANSFORMADORES DE MONOTERPENOS59

Figura 1. Ilustração de bactérias Gram-negativas após a Coloração de Gram.	69
Figura 2. Principal via metabólica da biotransformação de limoneno pelas linhagens isoladas. Os números referem-se aos picos cromatográficos do cromatograma (figura 4).	71
Figura 3. Estrutura de outros produtos formados a partir da biotransformação do limoneno. Os números referem-se aos picos cromatográficos seguindo a ordem do tempo de retenção.	71
Figura 4. a. Cromatograma da bioconversão de limoneno a 30°C e 150 rpm, pela linhagem LB-HORT. b. Produtos formados após 112h da adição do limoneno (preto), em comparação com o controle (azul). Números correspondem às estruturas apresentadas nas Figuras 2 e 3.	72
Figura 5. Produção de carvona (barras) e decaimento do limoneno (linhas) para as linhagens LB-HORT e LB-MANJ. As setas indicam a adição de limoneno durante a biotransformação.	75
Figura 6. Biotransformação de α -pineno a <i>cis</i> -verbenol e verbenona.	76
Figura 7. Produção de verbenona durante a biotransformação de α -pineno (pH não ajustado).	78

Figura 8. Biotransformação de citrônello por pelas linhagens L1B2P, HORT e LARP3.	79
Figura 9. Biotransformação do citrônello e formação de β -citronelal e isopulegol pelas linhagens LB-LARP3 (a) e LB-HORT (b), durante fermentação a 30°C e 150 rpm. A concentração do isopulegol foi obtida relativo ao citrônello.....	81
Figura 10. Cromatograma da biotransformação de β -citrônello em β -citronelal e isopulegol, pela linhagem HORT, após 120 horas de fermentação a 30°C e 150 rpm.	82
Figura 11. Crescimento microbiano durante fermentação em meio contendo 0,5% de limoneno (a), α -pineno (b), ou citrônello (c) como única fonte de carbono. As setas indicam a reaplicação de terpeno ao longo da biotransformação.	84
Figura 12. Produção de carvona, <i>cis</i> -carvol e <i>trans</i> -carveol pelas linhagens MANJ, HORT, L1B2P sem indução (a) e com indução (b). As setas indicam a reaplicação de limoneno ao meio de biotransformação.	92
Figura 13. Produção de verbenona e <i>cis</i> -verbenol pelas linhagens HORT e SFC32P sem indução (a) e com indução (b).....	93
Figura 14. Decaimento do α -pineno e formação de verbenona e <i>cis</i> -verbenol pelas linhagens induzidas HORT (a) e SFC32P (b).	94
Figura 15. Decaimento do citrônello e produção de isopulegol pela linhagem HORT sem indução (a) e com indução (b).....	95

CAPÍTULO 3. BIOTRANSFORMATION OF CITRONELLOL IN ROSE OXIDE BY PSEUDOMONAS SPP.....107

Figure 1. Terpene citotoxicity for L1B2P strain under different concentrations of citrônello, ranging from 0.1% to 10%, in YM medium agar.	113
Figure 2. Enantioselective bioconversion of (<i>R</i>)-(+)- β -citrônello to <i>cis</i> - and <i>trans</i> -rose oxide by the <i>Pseudomonas</i> spp. strain L1B2P.	114
Figure 3. Chromatogram of citrônello degradation and rose oxide production by L1B2P. The biotransformation medium consisted of phosphate buffer and citrônello as sole carbon source.....	114

ÍNDICE DE TABELAS

INTRODUÇÃO GERAL.....	13
Tabela 1. Características odoríferas de cada enantiômero de determinados monoterpenos	15
 CAPÍTULO 1. <i>PSEUDOMONAS</i>: PROMISING BIOCATALYST FOR BIOCONVERSION OF TERPENES	25
Table 1. Patents on biotransformations of industrial interest by <i>Pseudomonas</i> spp.	41
 CAPÍTULO 2. ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS DO GÊNERO <i>PSEUDOMONAS</i> POTENCIALMENTE BIOTRANSFORMADORES DE MONOTERPENOS	59
Tabela 1. Fontes de isolamento de micro-organismos potencialmente pertencentes ao gênero <i>Pseudomonas</i> e codificação das colônias.	68
Tabela 2. Concentração de carveol (isômeros <i>cis</i> e <i>trans</i>) e carvona após 112h de bioconversão do limoneno. Os números na última coluna referem-se às estruturas mostradas na Figura 2.	73
Tabela 3. Produtos da biotransformação do α -pineno por linhagens de <i>Pseudomonas</i>	77
Tabela 4. Produção de compostos derivados do citrionelol após 120 horas de biotransformação.	80
Tabela 5. Concentração máxima de <i>cis</i> -carveol, <i>trans</i> -carveol e carvona derivados da biotransformação de limoneno em pH 6,5 a 7,5, após 112 h de fermentação.....	85
Tabela 6. Concentração máxima de verbenona e verbenol derivado da biotransformação de α -pineno em pH 6,5 a 7,5.	87
Tabela 7. Concentração máxima de isopulegol derivado da biotransformação de citrionelol em pH 6,5 a 7,5.....	88
Tabela 8. Valores de Log P _{ow} de alguns monoterpenos selecionados.....	89

RESUMO GERAL

O aroma é responsável por grande parte do sabor de um alimento, e considerado um dos atributos mais importantes na aceitação do produto pelo consumidor. A preferência dos consumidores por produtos naturais tem incentivado o desenvolvimento de novos processos biotecnológicos para a produção de compostos de aroma naturais. A biotransformação de terpenos é uma alternativa promissora para a produção de aromas, visto que pode contornar alguns problemas associados a síntese química como a baixa geração de resíduos tóxicos e alta regio- e estéreo-seletividade das reações. Ademais, segundo a legislação brasileira, produtos obtidos por métodos microbiológicos podem ser rotulados como 'naturais' (ANVISA, Resolução nº 104, de 14 de maio de 1999). Os processos de biotransformação de monoterpenos frequentemente utilizam bactérias do gênero *Pseudomonas* como biocatalisadores por se adaptarem facilmente a diferentes substratos e condições extremas devido a sua elevada versatilidade metabólica e sistema enzimático complexo. Assim, o presente trabalho visou a utilização de monoterpenos (limoneno, α -pineno e citrônolol) como substratos em processos de biotransformação por micro-organismos do gênero *Pseudomonas*. O Capítulo 1 apresenta um artigo de revisão atualizado sobre o potencial biotecnológico de micro-organismos do gênero *Pseudomonas* como biocatalisadores em processos de biotransformação. O Capítulo 2 refere-se aos resultados obtidos pelos experimentos que contemplam o isolamento de bactérias em meio seletivo e diferencial para *Pseudomonas*, e sua aplicação em processos de biotransformação de monoterpenos (*R*-(+)-limoneno, α -pineno, citrônolol). Das 34 linhagens selecionadas, 9 bactérias foram capazes de biotransformar pelo menos um dos substratos em compostos de aroma de maior valor agregado. *R*-(+)-limoneno foi convertido a *cis*- e *trans*-carveol e carvona por 7 linhagens, atingindo concentrações de até 412 mg/L, 275 mg/L e 209 mg/L, respectivamente. α -Pineno, por sua vez, foi usado como fonte de carbono e energia por 7 linhagens e foi convertido principalmente em *cis*-verbenol e verbenona a baixas concentrações por 5 linhagens. Outros compostos como limoneno, mirtenol e β -pineno, também foram identificados como produtos principais da conversão do α -pineno por 2 linhagens. Por outro lado, apenas 3 linhagens foram capazes de metabolizar citrônolol em outros compostos derivados, como óxidos de rosa e isopulegol. O efeito da variação do pH do meio de biotransformação e da indução das linhagens, através da pré-exposição do micro-organismo

ao substrato, no crescimento celular e formação de produtos de bioconversão foram avaliados com o intuito de otimizar o processo de biotransformação. A produção de óxido de rosa a partir de citrionelol foi estudada e detalhada no capítulo final, que configurou um artigo publicado na revista *Chemical Engineering Transactions*. Em testes de citotoxicidade, a linhagem mostrou alta resistência a maiores concentrações de terpeno, revelando grande potencial para posterior otimização do processo. Os compostos derivados mais notáveis foram destacados no presente trabalho pela alta qualidade sensorial e alto valor agregado. Além das notas sensoriais altamente relevantes industrialmente, a carvona e o carveol são ainda reconhecidos por apresentar algumas funções biológicas. A verbenona e verbenol se destacam pelo alto custo e vasta aplicação nas áreas alimentícia, da agricultura, e da medicina. O óxido de rosa é um dos componentes mais importantes na criação de composições florais em perfumaria, além de possuir um baixo threshold. Sendo assim, a biotransformação de precursores de baixo custo em compostos de alto valor agregado pode ser considerado uma estratégia vantajosa e econômica.

ABSTRACT

Aroma compounds influence greatly the flavor of food products and govern their acceptance by consumers and market success. The increasing consumer preference for natural products has encouraged remarkable efforts towards the development of biotechnological processes for the production of natural flavor compounds. Biotransformation of terpenes represents a very promising alternative for production of aromas, since overcome the problems associated with chemical synthesis such as the low generation of toxic waste and high regio- and stereo-selectivity reactions. In addition, products obtained by microbiological methods can be labeled 'natural' under Brazilian law (ANVISA Resolution No. 104 dated May 14, 1999). Studies on monoterpene bioconversion frequently use bacteria from the genus *Pseudomonas* as biocatalysts since they adapt easily to different substrates and extreme conditions thanks to their high metabolic versatility and complex enzyme system. Therefore, the present work aims to use monoterpenes, such as limonene, α -pinene and citronellol, as substrate for the biotransformation processes by microorganisms from the genus *Pseudomonas*. The Chapter 1 presents a current review on the biotechnological potencial of microorganisms from the genus *Pseudomonas*. Chapter 2 refers to the results obtained from laboratory experiments which include the isolation of bacteria in selective and differential medium for *Pseudomonas* and their application in monoterpene biotransformation processes ((*R*-(+)-limonene, α -pinene, citronellol). Among 32 selected strains for investigation of biotransformation capability, 9 bacteria were able to biotransform one of the substrates on value-added flavor compounds. *R*-(+)-limonene was converted to *cis*- and *trans*-carveol and carvone by 7 strains, at concentrations of 412 mg/L, 275 mg/L e 209 mg/L, respectively. α -Pinene, in turn, was used as sole carbon and energy source for 7 strains, and yielded especially *cis*-verbenol and verbenone at low concentrations by 5 strains. Other compounds such as limonene, myrtenol and β -pinene have also been identified as major products from the conversion of α -pinene by 2 strains. On the other hand, only 3 strains were able to metabolize citronellol on other derivative compounds, such as rose oxides and isopulegol. The effects of different pH of biotransformation medium and induction phase on cell growth and product concentration were evaluated in order to optimize the biotransformation process. The production of rose oxides by strain L1B2P was studied and detailed separately in the third chapter, set as a published article at *Chemical Engineering Transactions*. In

citotoxicity tests, the strain showed impressive terpene resistance, revealing great potential for further process optimization. Most notable compound derivatives were highlighted in the present work due to their high sensory quality and added value. Besides highly industrially relevant sensory notes, carvone and carveol are also recognized by pursuing some biological functions. The verbenone and verbenol stand by the high cost and wide application in food, agriculture, and medicine fields. Rose oxide, in turn, is one of the most important components in creating floral compositions in perfumery, besides its low threshold. Thus, biotransformation of inexpensive precursors into high value added compounds can be considered an economical and advantageous strategy.

INTRODUÇÃO GERAL

1. Terpenos

Terpenos são metabólitos secundários de plantas, e geralmente são responsáveis pelas suas características odoríferas (Bouwmeester *et al.*, 1998). A estrutura dos terpenos é construída pela combinação de unidades de isopreno (C_5H_{10}), por isso podem ser classificados de acordo com o número de carbonos presentes na molécula, como hemiterpenos (C_5H_{10}), monoterpenos ($C_{10}H_{16}$), sesquiterpenos ($C_{15}H_{24}$), diterpenos ($C_{20}H_{32}$), triterpenos ($C_{30}H_{48}$), tetraterpenos ($C_{40}H_{56}$) também chamados de carotenos e politerpenos ($(C_5H_{10})_n$ sendo $n > 8$) conhecidos por borrachas (Demyttenaere, 2001). Os monoterpenos e sesquiterpenos, por sua vez, podem ser classificados segundo a ciclização de sua cadeia carbônica: acíclicos, monocíclicos, bicíclicos ou tricíclicos (Daniel, 2006).

Todos os terpenos são originados a partir de precursores universais de 5 carbonos, chamados de pirofosfato de isopentilalila (IPP) e seu isômero alílico pirofosfato de dimetilalila (DMAPP), que são derivados de duas vias alternativas que ocorrem em diferentes compartimentos celulares de plantas superiores: a via do mevalonato (MVA) que ocorre no citossol, e a via do metil-eritritol-fosfato (MEP) que ocorre em plastídeos (Dudareva *et al.*, 2006). Os produtos gerados pela ação de enzimas conhecidas como preniltransferases, incluem o geranil, farnesil, geranilgeranil pirofosfatases, esqualeno e fitoeno, que são responsáveis pela formação diversificada de terpenóides (Humphrey e Beale, 2006). Enquanto o geranil difosfato (GPP) apresenta um papel importante como precursor para monoterpenos e outros metabólitos secundários de plantas, o farnesil difosfato (FPP) é o precursor de uma grande variedade de sesquiterpenóides (Khor e Uzir, 2010).

Do ponto de vista químico, os terpenos são considerados hidrocarbonetos compostos apenas por carbono e hidrogênio como, por exemplo, limoneno e farneseno. No entanto, a medida que suas ligações duplas são oxidadas e se transformam em diversas funções orgânicas como álcoois, cetonas, ácidos e aldeídos, passam a ser chamados de “terpenóides”. Os terpenóides (frequentemente chamados de isoprenóides) consitituem o maior grupo de produtos naturais compondo cerca de 23.000 compostos diferentes já descritos até o

momento, e estão entre os mais importantes compostos de aromas e fragrâncias por oferecerem uma ampla variedade de notas sensoriais interessantes, como a carvona (hortelã), verbenol (menta e cânfor), mentol (menta) e óxido de rosa (floral) (Demyttenaere, 2001).

Estas moléculas são geralmente metabólitos secundários produzidos por micro-organismos ou plantas, e contribuem para a interatividade do ecossistema (Berger, 1995). Muitas plantas produzem terpenos voláteis para atrair insetos específicos para polinização ou, ao contrário, para inibir a aproximação de determinados animais que possam usar aquela planta como alimento. Terpenos menos voláteis, mas com intenso sabor ou tóxicos, também servem para proteger as plantas contra herbívoros. Por último, os terpenos podem atuar como compostos sinalizadores ou reguladores de crescimento das plantas. Alguns insetos também metabolizam terpenos, provavelmente obtidos através da alimentação por plantas, em feromônios e hormônios de crescimento (Breitmaier, 2006; Langenheim 1994). Em mamíferos, os terpenos estão envolvidos na estabilização de membranas celulares, rotas metabólicas e como reguladores de reações enzimáticas, como o colesterol e alguns esteróides (De Carvalho e Da Fonseca, 2006).

Assim, os terpenos ganharam grande importância comercial não só devido a suas propriedades sensoriais, mas também a diversas aplicações biológicas, incluindo seu uso como agentes antimicrobianos e inseticidas naturais, como precursores na síntese de muitos compostos de alto valor agregado nas indústrias de fármacos e cosméticos, e na prevenção e terapia de diversas doenças como o câncer (de Carvalho e da Fonseca, 2006). Para maiores detalhes com relação à biossíntese, regulação e funções dos compostos voláteis nas plantas, a leitura do artigo de revisão de Dudareva *et al.* (2006) é indicada.

Os mono e sesquiterpenos/terpenóides são comumente encontrados nos óleos essenciais e figuram como os principais aromatizantes utilizados nos alimentos, bebidas e cosméticos devido a sua alta qualidade sensorial. A grande variedade de aromas e fragrâncias dessa classe de metabólitos pode ser atribuído à ocorrência de um grande número de isômeros desses compostos (Petersen, 2006), como é mostrado na Tabela 1. A quiralidade é um aspecto importante na área de aromas e fragrâncias visto que a percepção do odor e do aroma dependem da conformação absoluta de cada isômero. Estima-se que 400 monoterpenos distintos já foram encontrados e identificados na natureza e, além disso, têm sido largamente explorados como substrato em conversões microbianas para formação de

derivados de maior valor agregado, já que o preço dos terpenos extraídos de fontes naturais, como o α -pineno, em geral é relativamente baixo, em torno de \$2-4 por Kg (Berger, 1997).

Tabela 1. Características odoríferas de cada enantiômero de determinados monoterpenos

Monoterpeno	Enantiômero	Descrição odorífera
Limoneno	<i>R</i> -(+)	cítrico, laranja, frescor, natural
	<i>S</i> -(-)	terebentina, nota de limão
Carvona	<i>R</i> -(+)	erva fresca, hortelã, pungente
	<i>S</i> -(-)	erva fresca, alcaravia (cominho)
α-Pineno	1 <i>R</i> ,5 <i>R</i> -(+)	levemente menta, pungente
	1 <i>S</i> ,5 <i>S</i> -(-)	conífero, pungente
Mentol	1 <i>R</i> , 3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> -(-)	refrescante, fortemente menta
	1 <i>S</i> , 3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> -(+)	menta, mofado, fenólico, medicamento
α-Terpineol	<i>R</i> -(+)	floral pesado
	<i>S</i> -(-)	Conífero

(adaptado de van der Werf *et al.*, 1997, de Carvalho e da Fonseca, 2006)

2. Aromas

Os aromas sempre fizeram parte da história da humanidade, sendo que antigamente os aromas tinham a função de alertar se um alimento estava estragado ou diferenciar plantas nocivas das comestíveis. Nos dias atuais, com o desenvolvimento tecnológico na área de alimentos, os aromas assumem a nova função de melhorar a qualidade sensorial dos alimentos. Assim, o aroma é responsável por grande parte do sabor de um alimento, sendo considerado um dos atributos mais importantes na aceitação do produto pelo consumidor. O aroma é resultante da presença, em matrizes complexas, de vários componentes voláteis e não-voláteis que possuem diversas propriedades químicas e físico-químicas. Enquanto os compostos não-voláteis contribuem imensamente para o sabor do alimento, os compostos voláteis influenciam tanto o sabor como o odor (cheiro) do mesmo (Longo e Sanromán, 2006).

Muitos compostos de aromas disponíveis no mercado ainda são produzidos sinteticamente ou extraídos de fontes naturais, no entanto a preferência do consumidor por alimentos ou produtos cujos ingredientes possam ser rotulados como “naturais” dão suporte ao desenvolvimento da área biotecnológica para produção de aromas visto que o custo de produção é significativamente menor se comparado à extração de fontes naturais (Dubal *et al.*, 2008). Assim, há um grande interesse pela bioprodução e aplicação de compostos de aroma de origem (micro) biológica, resultando nos chamados bioaromas. Esses compostos são considerados substâncias naturais, e sua produção apresenta menores impactos ambientais e custos de produção (Janssens *et al.*, 1992). A legislação brasileira (ANVISA, Resolução nº 104, de 14 de maio de 1999) define “aromas naturais” como aqueles obtidos por métodos físicos, microbiológicos ou enzimáticos a partir de matérias-primas aromatizantes ou aromas naturais, semelhante às legislações norte-americana (FDA: Code of Federal Regulations, 21CFR101.22) e européia (Council Directive 88/388/EEC) (Chiappini, 2008; Demyttenaere, 2001).

Embora não haja diferença, do ponto de vista dos químicos, entre um composto sintetizado na natureza e um composto idêntico ao natural sintetizado em laboratório, o preço de um aroma natural é significativamente maior se comparado ao preparado por síntese química (Serra *et al.*, 2005). Por isso, se torna interessante a aplicação de precursores de aroma em processos de conversão microbiana por parte dos grupos de pesquisa acadêmicos e industriais, indicando a importância desses processos no desenvolvimento futuro de novos compostos naturais (Gatfield, 1997).

3. Obtenção de compostos de aromas

A maior parte dos compostos de aromas produzidos atualmente são oriundos de processos de transformação química, onde os produtos são considerados “artificiais” ou “idênticos ao natural”. Os aromas “idênticos ao natural” são produzidos sinteticamente, mas sua estrutura química pode ser encontrada na natureza. Já os aromas artificiais são substâncias nunca identificadas na natureza, mas possuem propriedades sensoriais iguais ou similares aos aromas naturais porém totalmente diferentes quimicamente (Demyttenaere, 2001). Apesar de produzir maiores rendimentos e produtividade, a transformação química tem sido questionada devido algumas desvantagens como a baixa regio- enantio-

seletividade ao substrato resultando em uma mistura de produtos ou isômeros (Longo e Sanromán, 2006). Além disso, e os compostos produzidos quimicamente são considerados “artificiais”, o que vai contra a tendência mundial a favor dos produtos rotulados como “naturais” (Zink, 1997).

Os aromas naturais, por sua vez, podem ser obtidos de fontes vegetais e animais através de processos físicos. No entanto, esses compostos bioativos estão presentes em quantidades muito pequenas, tornando os processos de extração, purificação e formulação muito caros, ou se encontram apenas em espécies de plantas exóticas (Vandamme, 2003). Além disso, sua disponibilidade e extração são dependentes de fatores sazonais, climáticas e políticos, e podem estar relacionados a problemas ecológicos devido ao extrativismo (Bicas *et al.*, 2009).

Dessa forma, os processos biotecnológicos têm se destacado no cenário mundial como uma ferramenta promissora no desenvolvimento de novos compostos de aromas, já que são capazes de promover um grande número de reações enzimáticas régio- e estéreo-seletivas que não são facilmente alcançadas pelos procedimentos sintéticos menos seletivos. Assim, ocorre o direcionamento do sistema de reação para obtenção de um produto definido, o que pode ser muito interessante principalmente nos casos em que isômeros óticos de um composto de aroma específico exibem diferentes propriedades entre si (Serra *et al.*, 2005). As condições brandas de processo, baixa geração de resíduos tóxicos e consequente menor impacto ambiental configuram outras vantagens da produção biotecnológica de aromas (Demyttenaere, 2001). Ademais, os processos de biotransformação são capazes de produzir compostos que são dificilmente obtidos por métodos químicos.

Os métodos biotecnológicos para a produção de aromas incluem a síntese *de novo* através da fermentação e a biotransformação através da biocatálise de precursores de aroma, sendo que ambos podem ser apoiados pela engenharia genética. A síntese *de novo* implica na utilização de todo arsenal metabólico do micro-organismo e geralmente produz uma mistura de compostos que caracterizam o *bouquet* do produto, no entanto a obtenção de um composto dificilmente possui rendimentos aceitáveis industrialmente (Maróstica 2006). Dentre os estudos que envolvem a síntese *de novo*, poucos resultam na produção de terpenos e os fungos são os principais biocatalisadores descritos (Bicas *et al.*, 2010). As biotransformações, por sua vez, são empregadas para a síntese de um ou vários compostos através da transformação de seus precursores por uma única reação enzimática, ou por duas

ou mais reações bioquímicas, quando passam a ser chamadas de “bioconversão” (Berger, 1995). Esses termos também se diferem no fato de que a estrutura química do substrato e do produto se assemelham entre si no caso das biotransformações, mas não necessariamente nas bioconversões (Vasic-Racki, 2006). Essas reações podem ser catalizadas através de micro-organismos, cultura de células vegetais ou sistemas enzimáticos (Bicas *et al.*, 2009).

3.1. Limitações e desafios dos processos de biotransformação

As transformações microbianas de terpenos têm se mostrado cada vez mais promissoras no desenvolvimento de novos compostos de aromas, no entanto, alguns desafios e limitações ainda precisam ser superados como a instabilidade química, baixa solubilidade em água, alta volatilidade e toxicidade de ambos substrato e produto. Assim, a taxa de reação pode ser limitada pela biodisponibilidade do substrato, que por sua vez afeta a viabilidade do biocatalisador no processo (Van de Werf *et al.*, 1997). Além disso, os rendimentos obtidos na maioria dos processos, atualmente, ainda são insuficientes para uma aplicação em escala industrial. E a recuperação seletiva do produto de interesse durante o processo de “downstream” pode ser mais difícil nos casos em que o produto e o substrato possuem propriedades físico-químicas semelhantes (Berger, 2009).

Apesar disso, os avanços na área biotecnológica têm focado no desenvolvimento de medidas para superar esses desafios descritos anteriormente, como métodos de recuperação *in situ* do produto através de ‘gas stripping’, sistemas bifásicos para separação de compostos apolares, uso de meios não convencionais como solventes orgânicos, líquidos iônicos e fluidos supercríticos, e alimentação em batelada do substrato para evitar concentrações citotóxicas do substrato e produto (Berger, 2009). Simples medidas como a variação das condições do processo (ex. temperatura, pressão, pH) podem melhorar significativamente a produtividade. Essas variações podem ser realizadas através de planejamento experimental e análise de superfície de resposta, uma estratégia estatística aplicada com a finalidade de diminuir o número de experimentos necessários para otimização do processo (Rodrigues e Iemma, 2005).

4. Prospecção da biotecnologia no mercado mundial

As composições de aromas e fragrâncias compõem o grupo de aditivos mais numeroso e de maior valor agregado utilizado em alimentos e cosméticos, somando em torno de 72% do valor total do mercado mundial de produtos de aromas e fragrâncias, e apresenta atualmente a maior taxa de crescimento e rentabilidade em relação aos aditivos e ingredientes utilizados em produtos alimentícios e cosméticos (Müller *et al.*, 2011). Outros dados mostram que no ano de 2006, a indústria de aromas e fragrâncias apresentou um faturamento estimado em torno de US\$ 12.6 bi (IAL Consultants, 2007), e subiu para US\$ 21.8 bi em 2011 (Leffingwell & Associates, 2011).

A grande maioria dos compostos aromatizantes utilizados mundialmente ainda são produzidos por via química, no entanto, há uma forte tendência pelo consumo de produtos que possam ser rotulados como “naturais” devido à sua associação com uma alimentação e estilo de vida mais saudáveis. Na década de 90, essa tendência já iniciara na Alemanha onde 70% dos aromas utilizados em alimentos eram naturais (Krings e Berger, 1998). No entanto, a propagação dessa tendência nos outros países pode ter sido tardia, entre outros fatores, devido a discrepância entre o custo de um aroma natural e um aroma sintético, e um bom exemplo é a vanilina, o aroma mais empregado mundialmente. Enquanto a vanilina sintética custa ao redor de US\$ 12 Kg⁻¹, o preço da vanilina pura extraída do favo de baunilha pode atingir valores de até US\$ 4.000 Kg⁻¹ (Feron *et al.*, 1996).

Essa diferença de preços combinado com a crescente demanda por produtos naturais pelos consumidores estimulou o desenvolvimento de alternativas biotecnológicas para a produção de aromas naturais. Em países como o Brasil, onde se encontra a maior e mais variada flora e fauna do planeta, as perspectivas no campo de investigação do potencial biotecnológico de suas espécies é uma questão estratégica frente à vasta fonte de produtos naturais com grande potencial biotecnológico e que ainda não foram investigados (Petersen, 2006). Além disso, a produção biotecnológica de compostos aromatizantes derivados de terpenos é econômica e vantajosa. Por exemplo, a verbenona extraída de pinho e eucalipto custa em torno de US\$ 3000/Kg, enquanto a verbenona resultante da biotransformação de α -pineno tem um custo muito menor, em torno de US\$ 0,0075/Kg (Agrawal e Joseph, 2000). Nesse sentido, a biotecnologia surge como aliada na obtenção de aromas naturais e prospecção do país no mercado mundial de aromas e fragrâncias.

Desta forma, o presente trabalho teve como principais objetivos isolar e selecionar biocatalisadores com potencial para biotransformar monoterpenos em compostos de aromas naturais de maior valor agregado industrialmente.

5. Referências bibliográficas

- Agrawal, R., Joseph, R. 2000. Bioconversion of α -pinene to verbenol by resting cells of *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53, 335-337.
- Berger, R. G. 1995. *Aroma Biotechnology*. Springer, Berlin Heidelberg New York.
- Berger, R. G. 1997. Biotechnology of aroma compounds. In: *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, v 55.
- Berger, R. G. 2009. Biotechnology of flavours - the next generation. *Biotechnology Letters*, 31, 1651–1659.
- Bicas, J. B., Dionísio, A. P., Pastore, G. M. 2009. Bio-oxidation of Terpenes: An Approach for the Flavor Industry. *Chemical Reviews*, 109, 4518–4531.
- Bicas, J. L., Silva, J. C., Dionísio, A. P., Pastore, G. M. 2010. Biotechnological production of bioflavors and functional sugars. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30, 7-18.
- Bouwmeester, H. J., Gershenzon, J., Konings, M. C. J. M., Croteau, R. 1998. Biosynthesis of the monoterpenes limonene and carvone in the fruit of caraway - I. Demonstration of enzyme activities and their changes with development. *Plant Physiology*, 117, 901-912.
- Breitmaier E. 2006. *Terpenes: Flavors, Fragrances, Pharmacology, Pheromones*, 1st edn. Wiley-VCH: Weinheim.
- Chiappini, C. C. 2008. Aromas naturais produzidos por micro-organismos. *Food Ingredients Brasil*, 4, 22-24.
- Daniel, M. 2006. *Medicinal Plants: Chemistry and Properties*. Science Publishers, Edenbridge Ltd.

- de Carvalho, C. C. C. R., da Fonseca, M. M. R. 2006. Biotransformation of terpenes. *Biotechnology Advances*, 24, 134–142.
- Demyttenaere, J. C. R. 2001. Biotransformation of terpenoids by microorganisms. *Studies in Natural Products Chemistry*, 25, 125-178.
- Dubal, S. A., Tilkari, Y. P., Momin, S. A., Borkar, I. V. 2008. Biotechnological routes in flavour industries. *Advanced Biotechnology*, 20-31.
- Dudareva, N., Negre, F., Nagegowda, D. A., Orlova, I. 2006. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25, 417–440.
- Feron, G., Bonnarme, P., Durand, A. 1996. Prospects for the microbial production of food flavours. *Trends in Food Science & Technology*, 7, 285-293.
- Gatfield, I. L. 1997. Biotechnological Production of Flavour-Active Lactones. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 55, 221-238.
- Humphrey, A. J., Beale, M. H. 2006. Terpenes. In *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*, Crozier A, Clifford MN, Ashihara H (eds). Blackwell: Oxford, 47–101.
- IAL Consultants. 2007. An overview of the global flavours and fragrances market. Disponível em: www.ialconsultants.com acessado em Julho de 2012.
- Janssens, L., De Pooter, H. L., Schamp, N. M., Vandamme, E. J. 1992. Production of Flavours by Microorganisms. *Process Biochemistry*, 27, 195-215.
- Khor, G. K., Uzir, M. H. 2010. *Saccharomyces cerevisiae*: a potential stereospecific reduction tool for biotransformation of mono- and sesquiterpenoids. *Yeast*, 28, 93-107.
- Krings, U., Berger, R. G. 1998. Biotechnological production of flavours and fragrances. *Applied Microbiology Biotechnology*, 49, 1-8.
- Langenheim, J. H. 1994. Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. *Journal of Chemistry and Ecology*, 20, 1223-1280.

Leffingwell and Associates. 2011. In 2007 - 2011 Flavor & fragrance industry leaders. [www.leffingwell.com/top 10.htm](http://www.leffingwell.com/top%2010.htm) acessado em Julho de 2012.

Longo, M. A., Sanromán, M. A. 2006. Production of Food Aroma Compounds. *Food Technology Biotechnology*, 44, 335–353.

Maróstica-Jr, M. R. 2006. Biotransformação de terpenos para a produção de compostos de aroma e funcionais. Tese de doutorado, Unicamp, Campinas.

Müller, S., Kishi, A., Bizzari, S., Yang, V. 2011. Flavor and Fragrances. SRI Consulting, HIS, EUA.

Petersen, R. Z. 2006. Biotransformação de terpenóides por culturas de células vegetais e fungos filamentosos. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil.

Rodrigues, M. I., Iemma, A. F. 2005. Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos. Editora Casa do Pão, Campinas, Brazil.

Serra, S., C. Fuganti, E. Brenna. 2005. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. *Trends Biotechnol*, 23, 193–198.

Somogyi, L. P. 1996. The Flavour and fragrance industry: serving a global market. *Chemistry and Industry*, 4, 170-173.

Van der Werf, M. J., Bont, J. A. M. de, Leak, D. J. 1997. Opportunities in microbial transformation of monoterpenes. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology* 55, 147–177.

Vandamme, E. J. 2003. Bioflavours and fragrances via fungi and their enzymes. *Fungal Diversity* 13, 153-166.

Vasic-Racki, D. 2006. History of Industrial Biotransformations – Dreams and Realities. *Industrial Biotransformations*, 1-36.

Zink, D. L. 1997. The impact of consumer demands and trends on food processing. *Emerging Infectious Diseases*, 3, 4, 467-469.

CAPÍTULO 1

ARTIGO DE REVISÃO

PSEUDOMONAS: A PROMISING BIOCATALYST FOR THE BIOCONVERSION OF TERPENES

Submetido a Revista “Journal of Microbiology and Biotechnology”

ABSTRACT

The genus *Pseudomonas* is the most diverse and ecologically significant group of known bacteria and it includes species that have been isolated worldwide in all types of environments. The bacteria from this genus are characterized by an elevated metabolic versatility, thanks to the presence of a complex enzymatic system. Investigations since the early sixties have demonstrated their potential as biocatalysts for the production of industrially relevant and value-added flavor compounds from terpenes. Although terpenes are often removed from essential oils as undesirable components, its synthetic oxy-functionalized derivatives have broad applications in flavors/fragrances and pharmaceutical industries. Hence, biotransformation appears to be an effective tool for the structural modification of terpene hydrocarbons and terpenoids to synthesize novel and high-valued compounds. This review highlights the potential of *Pseudomonas* spp. as biocatalysts for the bioconversion of terpenes and summarizes the presently known bioflavors that are obtained from these processes.

1. General Information

The genus *Pseudomonas* was first proposed by Migula in 1894 to classify a bacterium that initially belonged to the genus *Monas*. Later on, the genus *Pseudomonas* included a large number of species, which were then rearranged into 23 genera. The progress on taxonomic studies on the genus *Pseudomonas* was performed by a research group from the University of California at Berkeley (Palleroni 1970, Palleroni 1973, Palleroni 1993), who reported 5 groups with rRNA similarities from which only one group was included in the current *Pseudomonas* genus (Palleroni 2003).

The *Pseudomonas* genus is the most heterogeneous and ecologically significant group of known bacteria. It includes Gram-negative motile aerobic bacilli, which are characterized by an elevated metabolic versatility due to their complex enzymatic systems (Franzetti and Scarpellini, 2007). The genus is ubiquitous in nature and highly successful in colonizing a diversity of environments (Palleroni 1992). Therefore, *Pseudomonas* species are found in natural habitats, such as soil, fresh water, and marine environments, but have also been isolated from clinical instruments, aseptic solutions, cosmetics and medical products (Franzetti and Scarpellini, 2007). Some species are saprophyte, which means that they feed on organic substances that are formed from decaying organic matter and have long been known to be responsible for the spoilage of chilled food (Zhang *et al.* 2011). Other species also play an important role as opportunist pathogens for humans (Kunert *et al.*, 2007; Stover *et al.*, 2000) and plants (Morris *et al.*, 2008). A major factor in their prominence as pathogens is the intrinsic resistance of some species to the antibiotics and disinfectants that eliminate other environmental bacteria (Stover *et al.*, 2000).

Therefore, microorganisms from the *Pseudomonas* genus are frequently associated with a lack of quality in food products and with pathogenic infections in plants and humans. Nevertheless, investigations since the early sixties have demonstrated their potential as biocatalysts for the production of industrially relevant and value-added flavor compounds. This review highlights the potential of *Pseudomonas* spp. as biocatalysts for the bioconversion of terpenes and summarizes the presently known bioflavors that are obtained through these processes.

2. Biotransformation processes

Biotransformation can be defined as the use of biological systems to produce chemical changes on compounds that are not their natural substrates (Borges *et al.*, 2007). A certain molecule is modified through the transformation of its functional groups with or without the degradation of its carbon skeleton. Such modifications result in the formation of novel and useful bioactive compounds that are not easily prepared through chemical methods (Borges *et al.*, 2009). Among these products, many have wide-ranging applications including flavorings, agrochemicals, antibiotics, antioxidants and anticancer agents (Molina *et al.* 2012).

The biotransformation process provides a number of advantages over chemical synthesis. This include the fact that this process can be performed under mild conditions, does not generate toxic wastes and the reactions occur under ecologically acceptable conditions, which reduces the environmental impact (Suresh *et al.* 2006, Aleu and Collado 2001, Bicas *et al.* 2009). In addition, the regio- and stereo-selectivity of the process allows the production of enantiomerically pure compounds, thereby eliminating the need for complicated separation and purification steps (Borges *et al.* 2007). Moreover, the products obtained through a biotransformation process can be labeled as “natural”, which is in agreement with the worldwide consumer preference for natural products (Demyttenaere, 2001). Chemical synthesis often results in environmentally unfriendly production processes and lacks substrate selectivity, thereby possibly causing the formation of undesirable reaction mixtures and increasing the downstream costs (Longo and Sanromán 2006). The production of natural products by direct recovery from nature has been applied for decades, although some disadvantages are encountered such as the low concentrations of the compound of interest, the dependency on seasonal and climatic features, and the possible ecological problems that are associated with the extraction of the product (Bicas *et al.* 2010).

Therefore, biotransformation is an effective tool for the structural modification of bioactive natural and synthetic compounds to synthesize novel and more potent compounds. This process can also enhance the productivity of the desired product, overcome the problems associated with chemical analysis and provide basic information that can be used elucidate the biosynthetic pathways (Suresh *et al.* 2006). In fact, many studies have led to

the characterization of the different metabolic pathways in *Pseudomonas* bacteria that are responsible for the bioconversion of terpenes/terpenoids. The terpenes and terpenoids that are used as substrates in these bioconversion processes are shown in Fig 1.

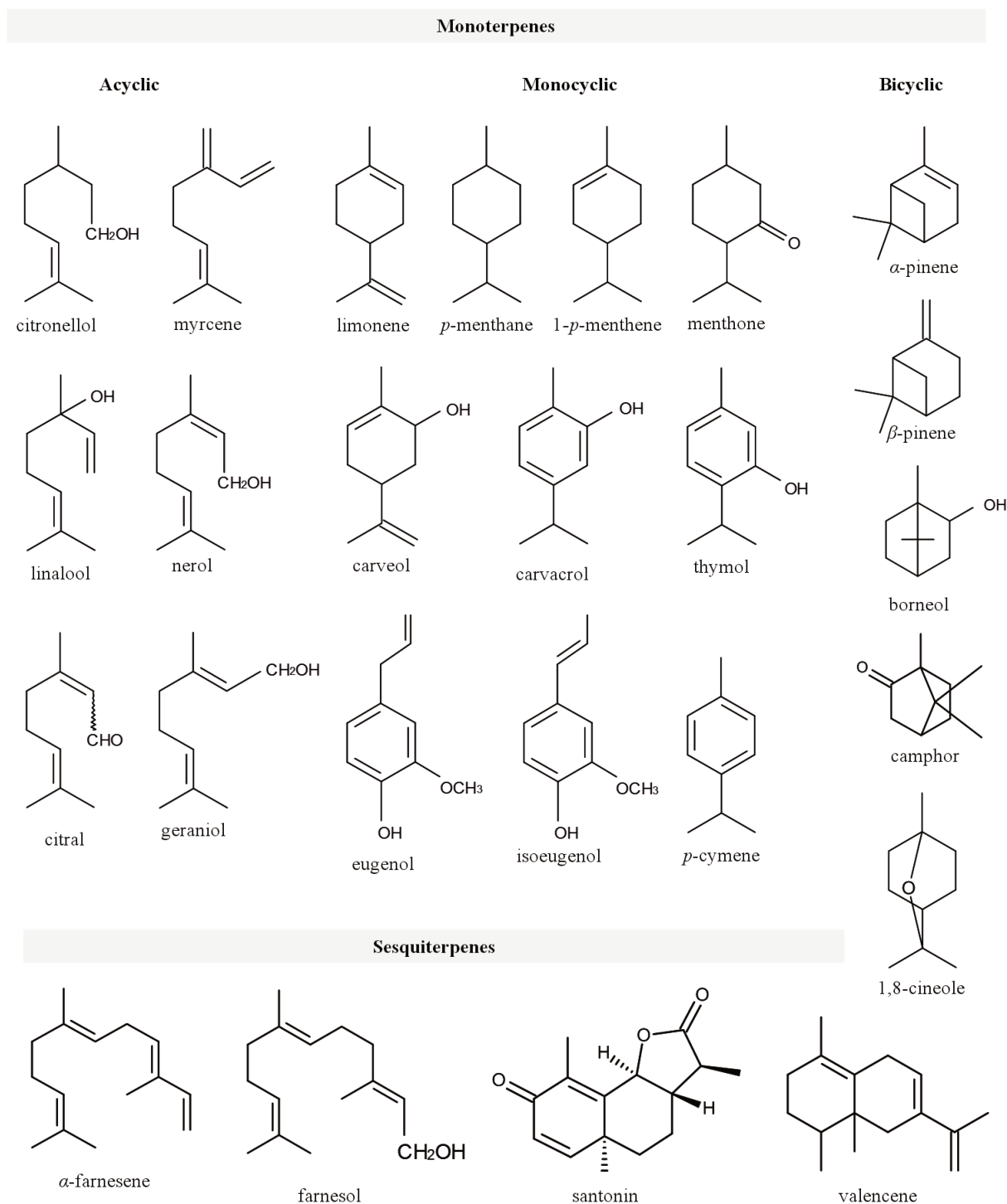


Figure 1. Substrates used by strains of *Pseudomonas* in bioconversion processes.

2.1. Acyclic monoterpenes/terpenoids

Terpenes are often removed from essential oils as undesirable components, whereas synthetic oxyfunctionalized derivatives find broad applications in flavors and fragrances industries. This discrepancy, together with the facts that there is an increasing demand for natural products and that the economically interesting terpenoids are only found in traces in plant sources, have supported more than fifty years of development of biotechnological approaches for the production of bioflavor compounds (Schrader and Berger, 2001). The acyclic terpene alcohols such as citronellol, geraniol, linalool and nerol are considered important substances for flavor and fragrance compositions, and are also primary products from terpene biosynthesis (Surburg and Panten, 2006).

Bacteria from the *Pseudomonas* genus were the subject of pioneering studies on the microbial transformations of terpenes 50 years ago, when Seubert and co-workers reported that a soil Pseudomonad had the ability to use citronellol and other related compounds as its sole carbon and energy source (Seubert, 1960). The isolate was classified as a new species named *Pseudomonas citronellolis* and was the subject of continuous investigations that led to the discovery of the catabolic pathway of citronellol, in which the carboxylation of *cis*-geranyl-CoA by geranyl-CoA carboxylase was identified as a key step (Seubert *et al.* 1963; Seubert and Remberger 1963; Seubert and Fass 1964a,b).

The biodegradation of acyclic monoterpenoids, particularly the flowery-rose-like flavor compounds citronellol, nerol and geraniol by Pseudomonads were continuously studied afterwards (Cantwell *et al.* 1978, Madyastha and Renganathan 1983, Madyastha 1984, Díaz-Pérez *et al.* 2004, Höschle *et al.* 2005, Höschle and Jendrosseck, 2005, Aguilar *et al.* 2006, Foster-Fromme *et al.* 2006, Tozoni *et al.* 2010). Madyastha and Renganathan (1983) discovered that *Pseudomonas incognita* metabolized the acetates of geraniol, nerol and citronellol much faster than their respective alcohols. To the best of our knowledge, a strain of *Pseudomonas* with the ability to produce rose oxides from the biotransformation of citronellol was reported for the first time (Pimentel *et al.* 2012), as shown in Figure 2. A summarized description of the reported catabolic pathways that are used by Pseudomonads to transform citronellol and other related compounds was recently published by Forster-Fromme and Jendrosseck (2010b).

Other acyclic monoterpenoids were degraded and converted to interesting products by *Pseudomonas* species. Citral, which is a *cis-trans* mixture of neral and geranial, was converted to geranic acid by *Pseudomonas convexa* (Hayashi *et al.*, 1967). Likewise, *P. aeruginosa* converted citral and citronellal mainly into geranic acid and citronellic acid, respectively, in addition to other minor compounds (Joglekar and Dhavlikar 1969). Linalool was utilized and degraded by *Pseudomonas pseudomallei* (Murakami *et al.* 1973, Mizutani *et al.* 1971), *Pseudomonas incognita* (Madyastha *et al.* 1977; Rama Devi and Bhattacharyya 1977), and *Pseudomonas fluorescens* (Vandenbergh and Cole 1986) to produce carbon and energy source. The bioconversion of linalool led to the formation of camphor and other minor products (Mizutani *et al.* 1971). Camphor is mainly used to perfume industrial products due to its slightly minty odor, but also plays a role as a plasticizer (Surburg and Panten, 2006). It was suggested that the biotransformation of linalool can be achieved by at least three different degradation pathways, as described above.

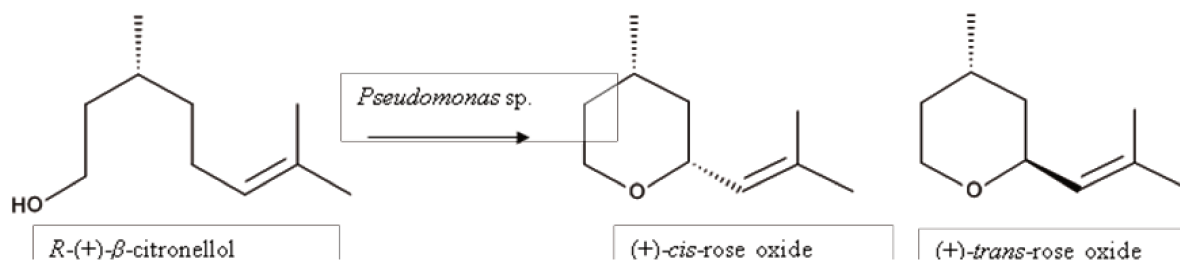


Figure 2. Bioconversion of *R*-(+)- β -citronellol to *cis*- and *trans*-rose oxide by a *Pseudomonas* spp. strain (Pimentel *et al.* 2012).

Acyclic monoterpene hydrocarbons, however, are not widely used in flavor and fragrance industries because they are relatively unstable and have a slightly aggressive odor due to their highly unsaturated structure (Surburg and Panten 2006). However, these compounds serve as potential precursors for oxidative derivatives that possess high-value odor. A β -myrcene-utilizing bacterial strain, *Pseudomonas* sp. M1, was isolated by Iurescia *et al.* (1999), and myrcen-8-ol was accumulated as a unique product by a β -myrcene-negative mutant N22. Based on the identification and sequencing of the β -myrcene catabolism genes, a new pathway for the catabolism of β -myrcene in *Pseudomonas* sp. strain M1 was proposed (Iurescia *et al.* 1999). A former study had reported the degradation of β -myrcene through the oxidation of the C-8 methyl group by a strain of *Pseudomonas putida* (Narushima *et al.* 1981). The oxy-derivative myrcenol is usually used in perfumery to obtain

a lifting top note in citrus and lavender compositions (Surburg and Panten 2006). A recent report by Esmaeili and Hashemi (2011) demonstrated the bioconversion of myrcene by a strain of *Pseudomonas aeruginosa*, and the conversion products varied according to the incubation time. An incubation time of 1.5 days resulted in the production of dihydrolinalool and 2,6-dimethyloctane (88.8% total yield), whereas a 3-days incubation accumulated 2,6-dimethyloctane and α -terpineol (97.7% total yield) as the major products.

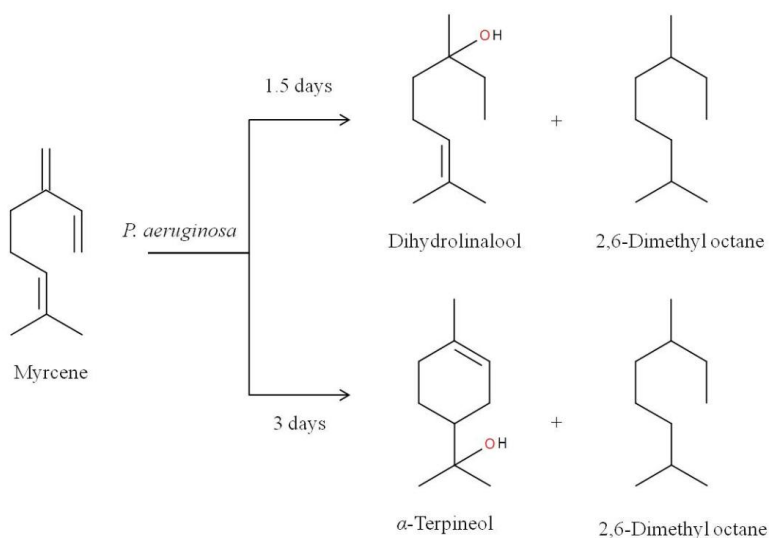


Figure 3. Bioconversion of myrcene by *Pseudomonas aeruginosa* (adapted from Esmaeili and Hashemi 2011).

2.2. Monocyclic monoterpenes/terpenoids

Limonene is the most abundant naturally occurring monoterpene and represents up to 90% of orange peel oil, which is an interesting and inexpensive citrus byproduct (Bauer *et al.* 2001). Thus, limonene has become one of the most studied precursors in bioconversion experiments for the production of high-value derivatives, which may prove to be a good strategy for the enrichment of the commercial value of agro-industrial residues, such as orange peel oil (Maróstica and Pastore 2007). Studies on the enzymatic oxidation of limonene were begun in the early sixties by Dhavalikar and Bhattacharrya (1966). The authors isolated a soil *Pseudomonad* that was capable of using limonene as its sole carbon source, which it converted into a wide diversity of products including perillic compounds and other important products, such as carveol, carvone and dihydrocarvone. Based on these data, three different metabolic routes for the catabolism of limonene by the soil *Pseudomonad* were proposed by Dhavalikar *et al.* (1966). Thereafter, several other authors

have investigated the degradation of limonene by *Pseudomonas gladioli* and reported the production of various products such as perillic acid and α -terpineol (Cadwallader *et al.* 1989, Cadwallader and Braddock, 1992), perillic acid at concentrations of 3 g/L (Speelmans *et al.* 1998), and perillic acid and sobrerol at yields of 36 and 44%, respectively (Chatterjee and Bhattacharyya, 2001).

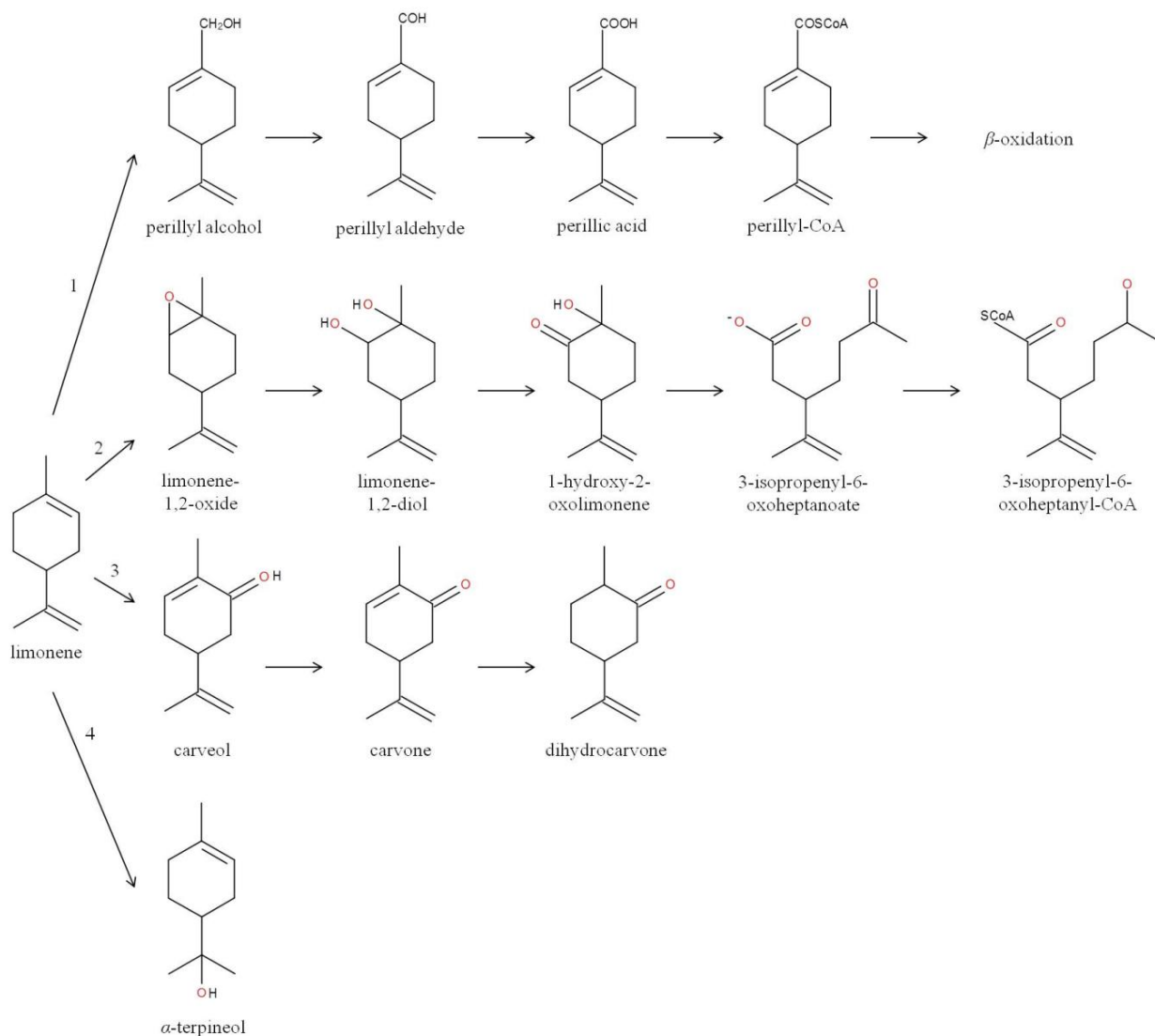


Figure 4. Bioconversion pathways of limonene and related compounds by strains of *Pseudomonas*: Bicas *et al.* 2008 (1, 4), Mirata *et al.* 2009 (1), Noma 1977 (3), Noma *et al.* 1975 (3), Teunissen and De Bont 1995 (4), Cadwallader *et al.* 1989, Cadwallader and Braddock 1992 (1,4), and Speelmans *et al.* 1998 (1).

Recently, Bicas *et al.* (2008) studied the capability of *P. rhodesiae* CIP107491 and *P. fluorescens* NCIMB 11671 to grow and degrade different terpene sources in a biphasic

medium. The results showed that *P. rhodesiae* was specially able to bioconvert α - and β -pinene, whereas *P. fluorescens* metabolized limonene via two different pathways, which allowed the elimination of limonene by either the production of limonene-1,2-oxide through a β -oxidation process or the synthesis of α -terpineol at a concentration of approximately 11 g/L. An efficient integrated bioprocess was later developed for the oxidation of limonene to perillic acid by *Pseudomonas putida* DSM 12264 (Mirata *et al.* 2009). A method for *in situ* product recovery (ISPR) was established to overcome the inhibition of the bioconversion activity, which led to the accumulation of perillic acid at a concentration of 31 g/L after 7 days (Mirata *et al.* 2009).

Investigations at the gene level through the use of molecular biological tools have also contributed to the understanding of the catabolism of acyclic terpene by *Pseudomonas* species (Diaz-Perez *et al.* 2004, Forster-Fromme *et al.* 2008, Forster-Fromme and Jendrossek, 2010a). Carveol was used as a substrate for the production of carvone by *Pseudomonas ovalis* (Noma 1977). (+)-Carvone was turned and metabolized into (-)-dihydrocarvone by *Pseudomonas fragi* IFO3458 and *Pseudomonas fluorescens* IFO 3081 (Noma *et al.* 1975). Carvone has received great attention due to its broad application as a flavor and fragrance component in food, pharmaceutical, and oral hygiene products, in addition to its other uses in agriculture, medicine and organic synthesis (de Carvalho and da Fonseca, 2006). *R*-(-)-carvone possesses a sweet spearmint-like odor, whereas *S*-(+)-carvone possesses a caraway/dill like odor (Leitereg *et al.* 1971).

The monoterpenes of the *p*-menthane family are widespread in nature and well-known as flavoring ingredients and valuable synthetic intermediates (Serra *et al.* 2005). Menthol is one of the most important flavor compounds in the food, cosmetic, pharmaceutical and tobacco industries, and has other physiological properties, such as sedative, anesthetic, and antiseptic properties (Galeotti *et al.* 2002, Eccles 2011). Eight isomers of the menthol (*p*-menthan-3-ol) skeleton exist; of these, (-)-menthol is the most important one due to its peppermint odor and its cooling and refreshing effects (Dubal *et al.* 2008). Therefore, many attempts have been made to produce (-)-menthol through biotechnological routes, but most studies have usually obtained a mixture of isomers. A mixture of the eight isomers of menthol was produced through the hydrogenation of thymol, and the isolation of *l*-menthol was achieved through the use of a commercial *Pseudomonas*

fluorescens lipase for the transesterification of the isomers in an organic solvent (Brady *et al.* 2012). A strain of *Pseudomonas mendocina* SF, which has been found to grow using *cis-p*-menthane as the sole carbon source, produces *p-cis*-menthan-1-ol (Tsukamoto *et al.* 1975). The related compound, 1-*p*-menthene, was also degraded by a *Pseudomonas* sp. strain (PL), resulting in the formation of β -isopropyl pimelic acid and methylisopropyl ketone (Hungund *et al.* 1970). The strain *Pseudomonas pseudomallei* was cultivated with α -terpineol as the sole carbon source, which it converted to 8,9-epoxy-*p*-menthan-1-ol (Hayashi *et al.* 1972). Some other example includes the conversion of (–)-carvotanacetone to (+)-carvomenthone, (+)-neocarvomenthol and (–)-carvomenthol, whereas (+)-carvotanacetone was converted into (–)-carvomenthone and (–)-isocarvomenthol by *Pseudomonas ovalis* (Noma *et al.* 1974). The biotransformation of ($\pm$)-menthone and racemic isomenthone by *Pseudomonas fluorescens* M-2 (Sawamura *et al.* 1976) and *Pseudomonas putida* YK-2 (Nakajima *et al.* 1978) has also been reported. A racemic mixture of isomenthone was also metabolized to methone by *Pseudomonas fragi* IFO 3458, and menthone was metabolized by *Pseudomonas fluorescens* M-2 (Noma *et al.* 1975).

Eugenol and isoeugenol are used in perfumery, mostly in clove and carnation compositions and for oriental and spicy notes (Surburg and Panten 2006). However, these compounds may also be used as the starting material for the synthesis of vanillin, one of the main aroma compounds used worldwide. The microbial transformation of eugenol and isoeugenol was reported by several authors that when used isolates of *Pseudomonas* spp. (Rabenhorst 1996, Overhage *et al.* 1999a, Furukawa *et al.* 2003, Yamada *et al.* 2007, Unno *et al.* 2007, Ashengroph *et al.* 2010, Ashengroph *et al.* 2008). Among these, *Pseudomonas nitroreducens* Jin1 was found to metabolize both eugenol and isoeugenol to vanillin by different pathways, as described by Unno *et al.* (2007). The growing cells of *Pseudomonas* sp. HR199 were able to produce high amounts of vanillic acid (3.25 g/L), ferulic acid (5.8 g/L) and coniferyl alcohol (3.22 g/L) from bioconversion of eugenol (Rabenhorst 1996). Thus, this strain was intensively studied at the genetic and biochemical levels (Overhage *et al.* 1999b). Recently, a novel isolate *Pseudomonas* sp. strain ISPC2 capable of converting isoeugenol to vanillin was reported. This isolate obtained a vanillin concentration with a maximum value of 1.15 g/L after a 96-h fermentation (Ashengroph *et al.* 2008, Figure 5). The same research group isolated a novel *Pseudomonas resinovorans* for the

biotransformation of eugenol to vanillin (0.24 g/L), vanillic acid (1.1 g/L), and other intermediates (Ashengroph *et al.* 2011). The biotechnological production of vanillin is one of the most advanced bioprocess, as evidenced by the numerous deposited patents, which are briefly described in item 3.

Other acyclic monoterpenes have also used as sole carbon source and degraded by *Pseudomonas* strains, such as thymol (Chamberlain and Dagley 1968), *p*-cymene (Madyastha and Bhattacharyya 1968, Eaton 1997, Wigmore and Ribbons 1980, Dutta *et al.* 2010), and carvacrol (Schwammle *et al.* 2001).

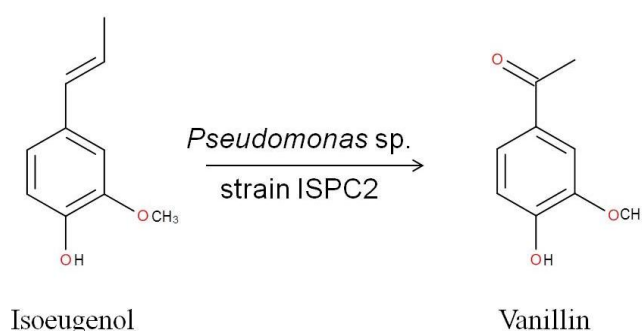


Figure 5. Biotransformation of isoeugenol into vanillin by *Pseudomonas* sp. strain ISPC2 (Ashengroph *et al.* 2008).

2.3. Bicyclic monoterpenes/terpenoids

Pinenes are naturally occurring bicyclic monoterpenes that are found in major amounts in turpentine oils, which are a byproduct of the pulp and paper industries (Yoo and Day 2002). In an attempt to increase the commercial value of turpentine oil, the bioconversion of α - and β -pinene into more valuable compounds has been increasingly pointed out (Lindmark-Henriksson *et al.* 2003). In an early publication by Shukla and Battacharyya (1968), strains of *Pseudomonas* were used in bioconversion experiments. In addition to four other possible pathways, a mechanism of α -pinene degradation was suggested to proceed by isomerization to limonene, which was subsequently oxidized to perillic acid prior to ring cleavage. Another report suggested an alternative pathway that passes through limonene with other intermediate acids (Gibbon and Pirt 1971). Another route was described for *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671 was described in which α -

pinene was completely degraded through the direct oxidation to its epoxide prior to the ring cleavage (Best *et al.* 1987). Further reports indicated a different pathway for the epoxidizing of the pinene by the same strain, NCIMB 11671 (Colocousi *et al.* 1996). A variation of the previous route involves the isomerization of isonovalal to novalal (Zorn *et al.* 2004, Larroche *et al.* 2006).

The bacterial strain *P. rhodesiae* CIP 107491 proved to efficiently convert α -pinene oxide to isonovalal, which was obtained with a maximum product recovery of 400 g L⁻¹ from 25 g biomass L⁻¹ in 2.5 h (Fontanille and Larroche 2003), and novalic and isonovalic acids (Linares *et al.* 2008). Variations of the metabolic steps described by both studies include the use of a single cofactor-independent enzyme (α -pinene oxide lyase) for the formation of isonovalal, whereas the production of the acids required several enzymatic steps (Linares *et al.* 2009). This bioconversion process by the same strain was studied further and applied to a stirred aerated bioreactor in biphasic conditions, which resulted in the production of 16 g/L novalic acid in approximately 8 h (Linares *et al.* 2009). Resting cells of *Pseudomonas putida* were able to bioconvert (+)- α -pinene into industrially important compounds such as verbenol (35%), dihydrocarveol acetate (20%) and verbenone (10%) (Divyashree *et al.* 2006). The conversion of (-)- β -pinene by *Pseudomonas putida* arvilla (PL strain) (Rama Devi and Bhattacharyya, 1978) and the *Pseudomonas* sp. PL strain (Shukla *et al.* 1968) was also reported. Dhavalikar and co-workers (1974) isolated a bacterium identified as *Pseudomonas pseudomallei*, which was able to grow using β -pinene as its sole carbon source. When using a mineral salt medium, proposed by Seubert (1960), the bacterium yielded camphor, borneol, isoborneol, α -terpineol and β -isopropyl pimelic acid. However the metabolites were completely different if a modified Czapek-Dox medium was used; these included *trans*-pinocarveol, myrtenol, α -fenchol, α -terpineol and myrtenic acid. A complete scheme, including the main metabolic pathways of α - and β -pinene, was previously published by Bicas *et al.* (2008). This scheme was adapted in this work to show the routes described herein that were specifically mediated by bacteria from the *Pseudomonas* genus (Figure 6).

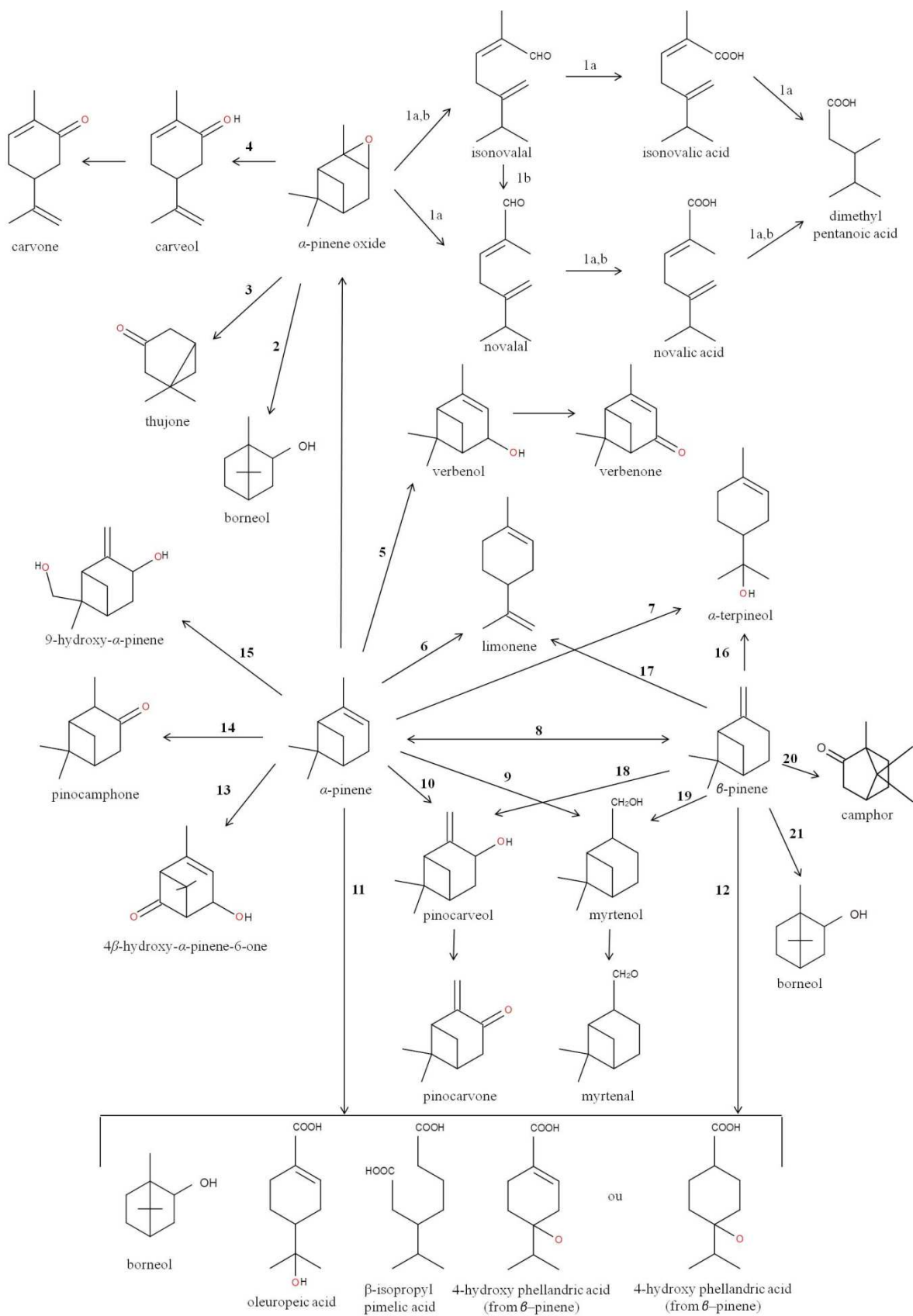


Figure 6. Degradation pathways of α -pinene by *Pseudomonas* (adapted from Bicas *et al.* 2008): Bicas *et al.* 2008 (**1a,b, 8**), Fontanille and Larroche 2003 (**1a,b**), Linares *et al.* 2008 (**1a,b**), Boontawan and Stuckey 2006 (**1a,b**), Best *et al.* 1987 (**1a**), Zorn *et al.* 2004 (**1b**), Larroche *et al.* 2006 (**1b**), Schrader 2007 (**2-4,13-15**), Divyashree *et al.* 2006 (**5**), Gibbon *et al.* 1972 and Gibbon and Pirt 1971 (**3, 4, 6**), Tudroszen *et al.* 1977 (**6**), Yoo and Day 2002 (**6, 17**), Shukla and Battacharyya 1968 (**6, 9, 11, 12, 21**), Shukla *et al.* 1968 (**11, 12**), Dhavalikar *et al.* 1974 (**7, 10, 16, 18, 19, 20, 21**), Rama Devi and Battacharyya 1978 (**21**).

Growing cells of the *Pseudomonas pseudomonallei* strain H were able to transform (–)-borneol to (–)-camphor, 6-hydroxycamphor, and 2,6-diketocamphor (Hayashi *et al.*, 1969). The degradation pathway of (+)-camphor (37) by *Pseudomonas putida* (Abraham *et al.* 1988, Trudgill 1990, Schindler and Schmid 1982) was described. Other bicyclic compounds, such as 1,8-cineole, were used as the substrate in bioconversion experiments that were performed with Pseudomonads (*Pseudomonas flava*, MacRae *et al.* 1979).

2.4. Sesquiterpenes/terpenoids

Many sesquiterpenes and other derivatives are important flavor compounds, with biological functions and desirable properties. In addition, some of these are also of considerable importance in pharmaceutical applications (Edris 2007). The first studies on the biotransformation of farnesol were performed by Seubert (1960), who described the degradation of this substrate by a strain of *Pseudomonas citronellolis*, through a pathway that was similar to that of geraniol and nerol (Seubert *et al.*, 1964a). The investigations indicated that farnesol was converted by analogous reactions that had a approximately 40% overall activity compared to citronellol (Seubert and Fass 1964a). Farnesene and its isomers may serve as closely related starting materials for the production of the isomeric aldehydes α - and β -sinensals (Berger 2007). However, bacterial strains of *Pseudomonas* are only able to convert a small amount of farnesene to sinensal (Abraham *et al.*, 1992).

The oxidation of (+)-valencene to produce nootkatone, which is a very attractive aroma compound that possesses a pleasant grapefruit-like odor (Fraatz *et al.* 2009), has been achieved with mutants of the cytochrome P450_{cam} from *Pseudomonas putida*. (+)-*trans*-Nootkatol and (+)-nootkatone constituted over 85% of the conversion products (Sowden *et*

flavors (Feron et al 1996). The biotechnological production of benzaldehyde through the microbial degradation of phenylalanine by *Pseudomonas putida* (ATCC 55012) has been described (Hagedorn and Kaphammer 1994). The bioconversion process is an alternative route for the production of benzaldehyde without the formation of hydrocyanic acid, which is an undesirable toxic compound that is identified in the extraction of benzaldehyde from natural sources (Longo and Sanromán 2006). Another example includes the production of glutaminase, which has applications as a flavor-enhancing agent in food industry (Longo and Sanromán, 2006). The microbial production of glutaminase through a bioconversion process by immobilized cells of a marine Pseudomonad has been reported by Kumar (2001).

Pseudomonas species also have applications in the pharmaceutical field. The growing cells of *Pseudomonas* sp. DSM 8653 are able to convert (S)-nicotine into functionalized pyridines that are used as precursors for drug production. It was possible to produce up to 15 g/L 4-[6-hydroxypyridin-3-yl]4-oxobutyrate (Kiener *et al.* 1998). Recently, a detailed review on the microbial degradation of nicotine by *Pseudomonas* spp. has been reported by Li and co-workers (2010). Mandelate is also a useful precursor for various drugs. The equilibration of the (R)-mandelate and (S)-mandelate enantiomers is catalyzed by mandelate racemase (MR) from *Pseudomonas putida* ATCC 12633) (Schafer *et al.* 1996, Lietzan *et al.* 2012). Other enzymes are involved in the mandelate pathway of this Pseudomonad and were studied at the gene level by Tsou and co-workers (1990).

In the environmental field, strains of *Pseudomonas aeruginosa* has been applied for biotransformation and detoxification of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT), which is a toxic product accumulated in soil and water during the disposal of the wastewater from the production of munition (Oh 2003). Furthermore, Tandlich *et al.* (2000) used two terpenes, carvone and limonene, to induce the biodegradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) by *Pseudomonas stutzeri*. PCBs are a mixture of chlorinated compounds that are used as coolants and lubricants in electrical equipment and are potential pollutants in the environment.

3. Industrial applications and patents

Due to their great ability to catalyze reactions and their versatile applications, the use of *Pseudomonas* species as biocatalysts has expanded the number of industrial applications and deposited patents. The production of vanillin, which is one of the most important flavor compounds worldwide, has been found to be achievable through several metabolic pathways by different *Pseudomonas* species; these investigations have led to several patents. Researchers from Kraft General Foods have patented a metabolic route for the production of vanillin through the microbial transformation of ferulic acid and eugenol. *Pseudomonas putida* (ATCC 55180) accumulated 210 mg/L vanillin from the degradation of ferulic acid with sulfhydryl compounds (Labuda *et al.* 1992). Similarly, a yield of 280 mg/L vanillin from eugenol was obtained by *Pseudomonas* sp. TK2102 (FERM P-12689) (Washisu *et al.* 1993). Furthermore, a new dioxygenase identified in *Pseudomonas* sp. was patented for its ability to cleave natural stilbenes, which are a potent raw material in the production of vanillin (Yoshimoto *et al.* 1990). A method for the preparation of flavor/aroma materials, particularly for vanilla composition, was also patented by employing bioconversions of such compounds (Cheetham *et al.* 2005).

Another patent application describes a process that converts α - and β -pinene to carvone by *Pseudomonas* sp. (Rhodes and Winskill 1985. US patent 4495284). Although the yield was not significant (approximately 15 mg/L), the study provided a useful method by which commercial value of naturally occurring pinenes from turpentine oil, a cheap and readily available starting material, can be increased. Some ketocampholenic acid derivatives are useful for fragrance and flavor applications due to their attractive olfactory properties and thus the subject of a patent that described methods for the preparation of such compounds (Selifonov 2006, US Patent 2006/0111270 A1).

Comprising other than aroma field, the industrial production of D-aspartic acid and L-alanine from DL-aspartic acid used a pressurized column reactor containing immobilized *Pseudomonas dacunhae* cells (Senuma *et al.* 1989). Similar patents were published for the production of L-aspartic acid Takamura *et al.* 1968, US patent 3391059; Chibata *et al.* 1974, JP patent 3791926; Kato *et al.* 1998, US patent 5741681; Sakano *et al.* 1999, US patent

5939296). Table 1 describes major patents in the biotransformation field by using *Pseudomonas* strains as biocatalysts.

Table 1. Patents on biotransformations of industrial interest by *Pseudomonas* spp.

Substrate	Product	Biocatalyst	Patent inventors
Eugenol	Vanillin	<i>Pseudomonas</i> sp. TK2102 (FERM P-12689)	Washisu et al 1993
Eugenol/ ferulic acid	Vanillin	<i>P. putida</i> (ATCC 55180)	Labuda et al 1992
α - and β -Pinene	Carvone	<i>Pseudomonas</i> sp.	Rhodes e Winskill 1985
DL-aspartic acid	D-Aspartic acid	<i>P. dacunhae</i>	Senuma <i>et al.</i> 1989
Maleic acid	L-Aspartic acid	<i>P. fluorescens</i> , <i>P. ovalis</i>	Sakano <i>et al.</i> 1999, Takamura <i>et al.</i> 1968, Kato <i>et al.</i> 1998
Ammonium fumarate	L-Aspartic acid	<i>P. aeruginosa</i>	Chibata <i>et al.</i> 1974
Nicotine	Pyridines	<i>Pseudomonas</i> spp.	Kiener <i>et al.</i> 1998
Phenylacetate	Mandelate	<i>P. putida</i>	Geusz and Anderson 1992

4. References

Abraham, W. -R., H.-A. Arfmann, B. Stumpf, P. Washausen, and K. Kieslich. 1988. Microbial transformations of some terpenoids and natural compounds, In P. Schreier (ed.), Bioflavour'87. *Analysis Biochem Biotechnol*, 399–414. Berlin: Walter de Gruyter and Co.

Abraham, W. -R., H. -A. Arfmann, and W. Giersch. 1992. Microbial hydroxylation of precursors of sinensal. *Z. Naturforsch*, **47c**: 851-858.

- Agrawal, R., Y. N. Seetharam, R. C. Kelamani, and G. Jyothishwaran 2003. Biotransformation of ferulic acid to vanillin by locally isolated bacterial cultures. *Indian Journal of Biotechnology*, **2**: 610-612.
- Aguilar, J. A., A. N. Zavala, C. Diaz-Perez, C. Cervantes, and A. L. Diaz-Perez, J. Campos-Garcia. 2006. The atu and liu clusters are involved in the catabolic pathways for acyclic monoterpenes and leucine in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*, **72**: 2070–2079.
- Aleu, J. and I. G. Collado. 2001. Biotransformations by *Botrytis* species. *J Mol Catal, B Enzyme*, **13**:77–93.
- Ashengroph, M., I. Nahvi, H. Zarkesh-Esfahani, and F. Momenbeik. 2010. Optimization of media composition for improving conversion of isoeugenol into vanillin with *Pseudomonas* sp. strain KOB10 using the Taguchi method. *Biocatalysis and Biotransformation*, **28**: 5-6, 339-347.
- Ashengroph, M., I. Nahvi, and H. Zarkesh-Esfahani. 2008. A bioconversion process using a novel isolated strain of *Pseudomonas* sp. ISPC2 to produce natural vanillin from isoeugenol. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 3, **2**: 41-47.
- Ashengroph, M., I. Nahvi, H. Zarkesh-Esfahani, and F. Momenbeik. 2011. *Pseudomonas resinovorans* SPR1, a newly isolated strain with potential of transforming eugenol to vanillin and further conversion to vanillic acid. *New Biotechnology*, 28, **6**: 656-664.
- Bauer, K., D. Garbe, and H. Surburg. 2001. Common fragrance and flavor materials. Preparation, properties and uses. 4th Ed. Wiley-VCH, Weinheim.
- Best, D.J., N. C. Floyd, A. Magalhaes, A. Burfield, and P. M. Rhodes. 1987. Initial enzymatic step in the degradation of α -pinene by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671. *Biocatalysis*, **1**:147–59.
- Berger, R. G. 2007. Flavours and Fragrances. Chemistry, Bioprocessing and Sustainability. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

- Bicas, J. B., A. P. Dionísio, and G. M. Pastore. 2009. Bio-oxidation of Terpenes: An Approach for the Flavor Industry. *Chem. Rev.*, **109**: 4518–4531.
- Bicas, J. L., P. Fontanille, G. M. Pastore, and C. Larroche. 2008. Characterization of monoterpene biotransformation in two pseudomonads. *Journal of Applied Microbiology*, **105**: 1991-2001.
- Bicas, J. L., J.C. Silva, A.P. Dionísio, and G.M. Pastore. 2010. Biotechnological production of bioflavors and functional sugars. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, **30**: 1, 7-18.
- Boontawan, A., and D. C. Stuckey. 2006. A membrane bioreactor for the biotransformation of α -pinene oxide to isonovalal by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671. *Appl Microbiol Biotechnol*, **69**, 643-649.
- Borges, K. B., W. S. Borges, M. T. Pupo, and P. S. Bonato. 2007. Endophytic fungi as models for the stereoselective biotransformation of thioridazine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **77**, 669–674.
- Borges, K. B., W. S. Borges, R. Patrón-Durán, M. T. Pupo, P. S. Bonato, and I. G. Collado. 2009. Stereoselective biotransformations using fungi as biocatalysts. *Tetrahedron: Asymmetry*, **20**: 385-397.
- Brady, D., S. Reddy, B. Mboniswa, L. H. Steenkamp, A. Rousseau, C. J. Parkinson, J. Chaplin, R. K. Mitra, T. Moutlana, S. F. Marais, and N. S. Gardiner. 2012. Biocatalytic enantiomeric resolution of l-menthol from an eight isomeric menthol mixture through transesterification. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **75**: 1-10.
- Cadwallader, K. R. and R. J. Braddock. 1992. Enzymatic hydration of (4*R*)-(+)-limonene to (4*R*)-(+)- α -terpineol. *Dev. Food Sci.*, **29**: 571–584.
- Cadwallader K. R., R. J. Braddock, M. E. Parish, and D. P. Higgins. 1989. Bioconversion of (+)-limonene by *Pseudomonas gladioli*. *J Food Sci*, **54**: 1241-1245.
- Cantwell, S.G., E.P. Lau, D.S. Watt, and R.R. Fall. 1978. Biodegradation of acyclic isoprenoids by *Pseudomonas* species. *J. Bacteriol.*, **135**: 324–333.

- Chatterjee T. and D. K. Bhattacharyya. 2001. Biotransformation of limonene by *Pseudomonas putida*. *Appl Microbiol Biotechnol* **55**: 541-546.
- Chamberlain, E. M. and S. Dagley. 1968. The metabolism of thymol by a *Pseudomonas*. *Biochem. J.*, **110**: 755–763.
- Cheetham, P., M. Gradley, and J. Sime. 2005. Flavor/aroma materials and their preparation. US patent 6844019.
- Chibata, I., T. Tetsuya, and T. Sato. 1974. Process for the production of *L*-aspartic acid. Japanese patent 3791926.
- Colaco, D., I. Furtado, U. P. Naik, S. Mavinkurve, and S.K. Paknikar. 1993. Transformation of alpha-santonin via two independent pathways by *Pseudomonas* strain S ATCC 43388. *Letters in Applied Microbiology* **17**: 212-214.
- Colocousi, A., K. M. Saqib, and D. J. Leak. 1996. Mutants of *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671 defective in the catabolism of α -pinene. *Appl Microbiol Biotechnol*, **45**: 822–30.
- de Carvalho, C. C. C. R. and M. M. R. da Fonseca. 2006. Biotransformation of terpenes. *Biotechnol Adv* **24**: 134–142.
- Demyttenaere, J. C. R. 2001. Biotransformation of terpenoids by microorganisms. In Rah Man, A. (Ed) *Studies in Natural Products Chemistry*. London: Elsevier, **25F**: 125-178.
- Dhavalikar, R. S. and P. K. Bhattacharyya. 1966. Microbiological Transformations of Terpenes. Part VIII. Fermentation of limonene by a soil *Pseudomonad*. *Indian J Biochem.*, **3**: 144-157.
- Dhavalikar, R. S., P. N. Rangachari, and P. K. Bhattacharyya. 1966. Microbiological Transformations of Terpenes Part IX. Pathways of degradation of limonene in a soil *Pseudomonad*. *Indian J Biochem.*, **3**: 158-163.
- Dhavalikar, R. S., A. Ehbrecht, and G. Albroscheit. 1974. Microbial transformations of terpenoides: β -pinene. *Dragoco Rep*, **21**: 47–9.

- Diaz-Perez, A. L., A. N. Zavala-Hernandez, C. Cervantes, J. Campos-Garcia. 2004. The gnyRDBHAL cluster is involved in acyclic isoprenoid degradation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*, **70**: 5102-5110.
- Divyashree, M. S., J. George, and R. Agrawal. 2006. Biotransformation of terpenic substrates by resting cells of *Aspergillus niger* and *Pseudomonas putida* isolates. *J. Food Sci. Technol.* **43**: 73–76.
- Dubal, S. A., Y. P. Tilkari, S. A. Momin, and I. V. Borkar. 2008. Biotechnological routes in flavour industries. *Advanced Biotech*, 20-31.
- Dutta, T. K., J. Chakraborty, M. Roy, D. Ghosal, P. Khara, and I. C. Gunsalus. 2010. Cloning and characterization of a *p*-cymene monooxygenase from *Pseudomonas chlororaphis* subsp. aureofaciens. *Res Microbiol.*, **161**: 10, 876-82.
- Eaton, R. W. 1997. *p*-Cymene catabolic pathway in *Pseudomonas putida* F1: cloning and characterization of DNA encoding conversion of *p*-cymene to *p*-cumate. *J. Bacteriol*, **179**: 10, 3171.
- Eccles, R. 2011. Menthol and related cooling compounds. *Journal of Pharmacy and pharmacology*, **46**: 8, 618-630.
- Edris, A. E. 2007. Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review. *Phytotherapy Research*, DOI: 10.1002/ptr.2072.
- Esmaeili, A. and E. Hashemi. 2011. Biotransformation of myrcene by *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemistry Central Journal*, **5**: 26.
- Feron, G., P. Bonnarne, and A. Durand. 1996. Prospects in the microbial production of food flavours. *Trends in Food Science and Technology*, **7**: 285-293.
- Fontanille, P., C. Larroche. 2003. Optimization of isonovalal production from α -pinene oxide using permeabilized cells of *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **60**: 534-540.

- Förster-Fromme, K., B. Höschle, C. Mack, M. Bott, W. Armbruster, and D. Jendrossek. 2006. Identification of genes and proteins necessary for catabolism of acyclic terpenes and leucine/ isovalerate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*, **72**: 4819–4828.
- Förster-Fromme, K., A. Chattopadhyay, D. Jendrossek. 2008. Biochemical characterization of AtuD from *Pseudomonas aeruginosa*, the first member of a new subgroup of acyl-CoA dehydrogenases with specificity for citronellyl-CoA. *Microbiology*, **154**: 789-796.
- Förster-Fromme, K. and D. Jendrossek. 2010a. AtuR is a repressor of acyclic terpene utilisation (Atu) gene cluster expression and specifically binds to two 13 bp inverted repeat sequences of the atuA-atuR intergenic region. *FEMS Microbiol Lett*, **308**: 166-74.
- Förster-Fromme, K. and D. Jendrossek. 2010b. Catabolism of citronellol and related acyclic terpenoids in pseudomonads. *Appl Microbiol Biotechnol*, **87**: 859–869.
- Franzetti, L. and M. Scarpellini. 2007. Characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from foods. *Annals of Microbiology*, **57**: 39-47.
- Fraatz, M. A., R. G. Berger, and H. Zorn. 2009. Nootkatone - a biotechnological challenge. *Appl Microbiol Biotechnol*, **83**: 35–41.
- Fujimoto, Y., T. Shimizu, T. Ishimoto, and T. Tatsuno. 1978. Studies on the microbiological transformation of alpha-santonin and its analogues. *Yakugaku Zasshi*, **98**: 230-233.
- Furukawa, H., H. Morita, T. Yoshida, and T. Nagasawa. 2003. Conversion of isoeugenol into vanillic acid by *Pseudomonas putida* I58 cells exhibiting high isoeugenol-degrading activity. *J. Biosci. Bioeng.*, **96**: 401–403.
- Galeotti, N., L. D. C. Mannelli, G. Massanti, A. Bartolini, and C. Ghelardini. 2002. Menthol: a natural analgesic compound. *Neuroscience Letters*, **322**: 145-148.
- Gasson, M. J., Y. Kitamura, W. R. McLauchlan, A. Narbad, A. J. Parr, E. L. H. Parsons, J. Payne, M. J. C. Rhodes, and Walton, N.J. 1998. Metabolism of ferulic acid to vanillin - a bacterial gene of the enoyl ScoA hydratase/isomerase superfamily encodes an enzyme for the hydration and cleavage of a hydroxy cinnamic acid ScoA thioester. *J Biol Chem*, **273**: 4163-4170.

- Geusz, S. D. and D. M. Anderson. 1992. Process of using bacteria that metabolize phenylacetate through mandelate. US Patent 5 151 353.
- Gibbon G. H. and S. J. Pirt. 1971. Degradation of α -pinene by *Pseudomonas* PX1. *FEBS Lett*, **18**: 103–105.
- Gibbon, G. H., N. F. Millis, and S.J. Pirt, 1972. Degradation of α -pinene by bacteria. Proc. IV IFS, Ferment. Technol. Today, 609–612
- Hagedorn, S. and B. Kaphammer. 1994. Microbial biocatalysis in the generation of flavour and fragrance chemicals. *Annual Review of Microbiology*, **48**: 773-800.
- Hayashi, T., H. Takashiba, H. Ueda, and C. Tsutsumi, 1967. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, Patent 41.254. no. 79878g.
- Hayashi, T., T. Kakimoto, H. Ueda, and C. Tatsumi, 1969. Microbiological conversion of terpenes. Part VI. Conversion of borneol. *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.*, **43**: 583–587
- Hayashi, T., S. Uedono, and C. Tatsumi. 1972. Conversion of α -terpineol to 8,9-epoxy-p-menthan-1-ol. *Agric. Biol. Chem.*, **36**: 690–691.
- Höschle, B., V. Gnau, and D. Jendrosseck. 2005. Methylcrotonyl-CoA and geranyl-CoA carboxylases are involved in leucine/isovalerate utilization (Liu) and acyclic terpene utilization (Atu), and are encoded by liuB/liuD and atuC/atuF, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, **151**: 3649–3656.
- Höschle, B. and D. Jendrosseck. 2005. Utilization of geraniol is dependent on molybdenum in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for different metabolic routes for oxidation of geraniol and citronellol. *Microbiology*, **151**: 2277-2283.
- Huang, Z., L. Dostal, and J. P. N. Rosazza. 1993. Microbial transformations of ferulic acid by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 2244-2250.
- Hungund, B. L., P. K. Bhattachayya, and P. N. Rangachari, 1970. Methylisopropyl ketone from a terpene fermentation by the soil Pseudomonad, PL-strain. *Indian J. Biochem.*, **7**: 80–81.

- Iurescia, S., A. M. Marconi, D. Tofani, A. Gambacorta, A. Paternò, C. Devirgiliis, M. J. Van der Werf, and E. Zennaro. 1999. Identification and sequencing of beta-myrcene catabolism genes from *Pseudomonas* sp. strain M1. *Appl Environ Microbiol*, **65**: 2871– 2876.
- Joglekar, S.S and R. S. Dhavalikar. 1969. Microbial transformation of terpenoids. I. Identification of metabolites produced by a pseudomonad from citronellal and citral. *Applied Microbiology*, **18**: 1084.
- Kato, N., Y. Mori, N. Mine, S. Fujii, and N. Watanabe. 1998. Method for producing L-aspartic acid. US patent 5741681.
- Kiener, A., Roduit, J-P., and Wellig, A. 1998. Di and trisubstituted pyridines. Patent number 5,760,236.
- Kumar S. R. 2001. L-Glutaminase production by an immobilized marine *Pseudomonas* sp. BLMS -51. Doctoral Thesis submitted to the Cochin University of Science and Technology, Kerala, India.
- Kunert, A., J. Losse, C. Gruszin, M. Huhn, K. Kaendler, S. Mikkat, D. Volke, R. Hoffmann, T. S. Jokiranta, H. Seeberger, U. Moellmann, J. Hellwage, and P. F. Zipfel. 2007. Immune evasion of the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: elongation factor Tuf is a factor H and plasminogen binding protein. *J. Immunol*, **179**: 2979-2988.
- Labuda, I. M., S. K. Goers, and K. A. Keon. 1992. Bioconversion process for the production of vanillin. U.S. patent 5128253.
- Larroche, C., P. Fontanille, and C. Larroche. 2006. Purification of α -pinene oxide lyase from *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. In Current Topics on Bioprocesses in Food Industry ed. Larroche, C., A. Pandey and C.G. Dussap, 98–108. New Delhi: Asiatech.
- Leitereg, T. J., D. G. Guadagni, J. Harris, T. R. Mon, and R. Teranishi. 1971. Chemical and sensory data supporting the difference between the odors of the enantiomeric carvones. *J. Agric. Food Chem.* **19**: 785.
- Li, H., X. Li, Y. Duan, K-Q Zhang, and J. Yang. 2010. Biotransformation of nicotine by microorganism: the case of *Pseudomonas* spp. *Appl. Microbiol Biotechnol*, **86**: 11-17.

- Lietzan A. D., M. Nagar, E. A. Pellmann, J. R. Bourque, S. L. Bearne, and M. St Maurice. 2012. Structure of mandelate racemase with bound intermediate analogues benzohydroxamate and cupferron. *Biochemistry*, **51**: 1160-1170.
- Linares, D., D. Martinez, P. Fontanille, and C. Larroche. 2008. Production of trans-2-methyl-5- isopropylhexa-2,5-dienoic acid by *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. *Bioresource Technology*, **99**: 4590-4596.
- Linares, D., P. Fontanille, C. Larroche. 2009. Exploration of α -pinene degradation pathway of *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. Application to novalic acid production in a bioreactor. *Food Research International*, **42**: 461–469.
- Lindmark-Henriksson, M. 2003. Biotransformations of Turpentine Constituents: Oxygenation and Esterification. Doctoral Thesis, Stockholm, Sweden.
- Longo, M.A. and M. A. Sanromán. 2006. Production of Food Aroma Compounds. *Food Technol. Biotechnol.* **44**: 335–353.
- MacRae, I. C., V. Alberts, R. M. Carman, and I. M. Shaw. 1979. Products of 1,8-cineole oxidation by a Pseudomonad. *Aust. J. Chem.*, **32**: 917–922.
- Madyastha, K. M. 1984. Microbial transformations of acyclic monoterpenes. *Proc. Indian Acad. Sci. (Chem. Sci.)*, **93**: 677–686.
- Madyastha, K. M. and P. K. Bhattacharyya. 1968. Microbiological transformation of terpenes. Part XIII. Pathways for degradation of p-cymene in a soil pseudomonad (PL-strain). *Indian J. Biochem.*, **5**: 161–167.
- Madyastha, K.M. and V. Renganathan. 1983. Bio-degradation of acetates of geraniol, nerol and citronellol by *P. incognita*: Isolation and identification of metabolites. *Indian J. Biochem. Biophys.*, **20**: 136–140.
- Madyastha, K., P. K. Bhattacharyya, and C. S. Vaidyanathan. 1977. Metabolism of monoterpene alcohol, linalool, by a soil pseudomonad. *Can J Microbiol.*, **3**: 230–239.

- Maróstica, M.R. and G. M. Pastore. 2007. Production of *R*-(+)- α -terpineol by the biotransformation of limonene from orange essential oil, using cassava waste water as medium. *Food Chemistry*, **101**: 345–350.
- Migula, W. 1894. Über ein neues System der Bakterien. *Arb Bakteriol Inst Karlsruhe*, **1**: 235–328.
- Mirata, M.A., D. Heerd, and J. Schrader. 2009. Integrated bioprocess for the oxidation of limonene to perillic acid with *Pseudomonas putida* DSM 12264. *Process Biochemistry*, **44**: 764-771.
- Mizutani, S., T. Hayashi, H. Ueda, and C. Tstsumom. 1971. Microbiological conversion of terpenes. Part IX. Conversion of linalool. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, **45**: 368–373.
- Molina, G., M. R. Pimentel, T. C. P. Bertucci, and G. M. Pastore. 2012. Application of fungal endophytes in biotechnological processes. *Chemical Engineering Transactions*, **27**: 289-294.
- Morris, C.E., D. C. Sands, B. A. Vinatzer, C. Glaux, C. Guilbaud, A. Buffière, S. Yan, H. Dominguez, and B. M. Thompson. 2008. The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle. *ISME Journal*, **2**: 231-334.
- Murakami, T., I. Ichimoto, and C. Tstsumom. 1973. Microbiological conversion of linalool. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, **47**: 699–703.
- Nakajima, O., R. Iriye, and T. Hayashi. 1978. Conversion of (-)-menthone by *Pseudomonas putida* strain YK-2: metabolic intermediate and stereochemical structure of the metabolic products. *Nippon Nagei Kagaku Kaishi*, **52**: 167-174.
- Narbad, A. and M. J. Gasson. 1998. Metabolism of ferulic acid to vanillin using a novel CoA-dependent pathway in a newly-isolated strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiology*, **144**: 1397-1405.
- Narushima, H., T. Omori, and Minoda. 1981. In *Advances in biotechnology* (Vezina, C. and Singh, K., eds.) Oxford: Pergamon Press, **3**: 525.

- Noma, Y., S. Nonomura, and H. Sakai. 1974. Conversion of (-)-carvotanacetone and (+)-carvotanacetone by *Pseudomonas ovalis*, strain 6-1. *Agric. Biol. Chem.*, **38**: 1637–1642.
- Noma, Y., S. Nonomura, and H. Sakai. 1975. Epimerization of (-)-isodihydrocarvone to (-)-dihydrocarvone by *Pseudomonas fragi* IFO 3458. *Agric. Biol. Chem.*, **39**: 437–441.
- Noma, Y., 1977. Conversion of the analogues of carvone and dihydrocarvone by *Pseudomonas ovalis*, strain 6-1, Biochemical reduction of terpenes, part VII. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **51**: 463–470.
- Oh, B-T., P. J. Shea, R. A. Drijber, G. K. Vasilyeva, G. Sarath. 2003. TNT biotransformation and detoxification by a *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Biodegradation*, **14**: 309–319.
- Overhage, J., H. Priefert, and A. Steinbüchel. 1999a. Biotransformation of eugenol to vanillin by a mutant of *Pseudomonas* sp. strain HR199 constructed by disruption of the vanillin dehydrogenase (*vdh*) gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 820-828.
- Overhage, J., H. Priefert, and A. Steinbüchel. 1999b. Biochemical and genetic analyses of ferulic acid catabolism in *Pseudomonas* sp. strain HR199. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**: 4837–4847.
- Palleroni, N. J. 1992. Introduction to the family *Pseudomonadaceae*. In *The Prokaryotes*, 3071-3085. Balows, A., H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder., and K-H Schleifer (Ed.). Springer-Verlag, New York, USA.
- Palleroni, N. J. 1993. *Pseudomonas* classification. A new case history in the taxonomy of Gram-negative bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, **64**: 231–251.
- Palleroni, N. J., M. Doudoroff, R. Y. Stanier, R. E. Solanes, and M. Mandel. 1970. Taxonomy of the aerobic pseudomonads: the properties of the *Pseudomonas stutzeri* group. *J Gen Microbiol*, **60**: 215–231.
- Palleroni, N. J. 2003. Prokaryote taxonomy of the 20th century and the impact of studies on the genus *Pseudomonas*: a personal view. *Microbiol.*, **149**: 1-7.

- Palleroni, N. J., R. Kunisawa, R. Contopoulou, and M. Doudoroff. 1973. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Int J Syst Bacteriol*, **23**: 333–339.
- Pimentel, M.R., G. Molina, T. C. P. Bertucci, and G. M. Pastore. 2012. Biotransformation of Citronellol in rose oxide by *Pseudomonas* spp. *Chem Eng Trans*, **27**: 295-300.
- Rabenhorst, J. 1996. Production of methoxyphenol-type natural aroma chemicals by biotransformation of eugenol with a new *Pseudomonas* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **46**: 470-474.
- Rama Devi, J. and P.K. Bhattacharyya. 1977. Microbiological transformations of terpenes. Part XXIV. Pathways of degradation of linalool, geraniol, nerol and limonene by *Pseudomonas incognita*, linalool strain. *Indian J. Biochem. Biophys.*, **14**: 359–363.
- Rama Devi, J. and P.K. Bhattacharyya. 1978. Molecular rearrangements in the microbiological transformations of terpenes and the chemical logic of microbial processes. *J. Indian Chem. Soc.*, **55**: 1131–1137.
- Rama Devi, J. 1979. Microbiological transformations of terpenes. 26. Microbiological transformation of caryophyllene. *Indian J. Biochem. Biophys.* **16**: 76-79.
- Rhodes, P.M. and N. Winskill. 1985. Microbiological process for the preparation of *l*-carvone. USA, Patent No. 4495284.
- Sakano, K., M. Mukouyama, and T. Hayashi. 1999. Process for producing L-aspartic acid. US patent 5939296.
- Sangodkar, U. M. X and S. Mavinkurve. 1982. Isolation and characterization of α -santonin assimilating *Pseudomonad*. *J. Biosci.*, **4**: 79-84.
- Sangodkar, U. M. X and S. Mavinkurve. 1984. Environmental and nutritional requirements for optimal growth and transformation of alpha-santonin by *Pseudomonas cichorii* strain. *S. Ind J Microbiol*, **2**: 202-206.
- Sawamura, N., S. Shima, and H. Sakai. 1976. Conversion of (-)-menthone by *Pseudomonas fluorescens* M-2. *Agric Biol Chem*, **40**: 649-653.

- Schafer S. L., W. C. Barrett, A. T. Kallarakal, B. Mitra, J. W. Kozarich, J. A. Gerlt, J. G. Clifton G. A. Petsko, and G. L. Kenyon. 1996. Mechanism of the reaction catalyzed by mandelate racemase: structure and mechanistic properties of the D270N mutant. *Biochem*, **35**: 5662-5669.
- Schindler, J. E and R. D. Schmid. 1982. Fragrance or aroma chemicals – microbial synthesis and enzymatic transformation – a review. *Process Biochem.*, **17**: 5, 2-8.
- Schrader, J. 2007. Microbial flavour production. In Berger, R. G. (ed). Flavours and fragrances - chemistry, bioprocessing, sustainability. Springer, Heidelberg, 507–574.
- Schrader J. and R. G. Berger. 2001. Biotechnological production of terpenoid flavor and fragrance compounds. In Rehm HJ (Ed) Biotechnology, 2nd Edn. Wiley-VCH, Weinheim, 374–422.
- Schwammle, B., E. Winkelhausen, S. Kuzmanova, and W. Steiner. 2001. Isolation of carvacrol assimilating microorganisms. *Food Technol. Biotechnol.*, **39**: 341–345.
- Selifonov, S. 2006. Ketocampholenic acid derivatives and their use in fragrance applications. US patent 2006/0111270 A1.
- Senuma, M., O. Osamu, S. Nobuyuki, F. Masakatsu, T. Tetsuya. 1989. Industrial production of d-aspartic acid and l-alanine from dl-aspartic acid using a pressurized column reactor containing immobilized *Pseudomonas dacunhae* cells. *J ferment bioeng*, **67**: 233-237.
- Serra, S., C. Fuganti, E. Brenna. 2005. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. *Trends Biotechnol*, **23**: 193–198.
- Seubert, W. 1960. Degradation of isoprenoid compounds by microorganisms: I. Isolation and characterization of an isoprenoid degrading bacterium, *Pseudomonas citronellolis* n.sp. *J Bacteriol*, **79**: 426–434.
- Seubert, W. and E. Fass. 1964a. Studies on the bacterial degradation of isoprenoids. Iv. The purification and properties of beta-isohexenylglutaconyl-CoA-hydratase and beta-hydroxy-beta-iso- hexenylglutaryl-CoA-lyase. *Biochem Z*, **341**: 23–34.

Seubert, W. and E. Fass. 1964b. Studies on the bacterial degradation of isoprenoids.V. The mechanism of isoprenoid degradation. *Biochem Z*, **341**: 35–44.

Seubert, W. and U. Remberger. 1963. Studies on the bacterial degradation of isoprenoids. II. The role of carbon dioxide. *Biochem Z*, **338**: 245–264.

Seubert, W., E. Fass, and U. Remberger. 1963. Studies on the bacterial degradation of isoprenoids. Iii. Purification and properties of geranyl carboxylase. *Biochem Z*, **338**: 265–275.

Shukla, O. P. and P. K. Bhattacharyya. 1968. Microbiological transformations of terpenes: Part I -- pathway of degradation of α - and β -pinene by a soil *Pseudomonad* (PL-strain). *Indian Journal of Biochemistry*, **5**: 92-98.

Shukla, O.P., M. N. Moholay, and P. K. Bhattacharyya. 1968. Microbiological transformation of terpenes. X. Fermentation of α - and β -pinenes. *Ind J Biochem*, **5**: 79–91.

Sowden R. J., S. Yasmin, N. H. Rees, and S. G. Bell, L.-L. Wong. 2005. Biotransformation of the sesquiterpene (+)-valencene by cyto- chrome P450cam and P450BM-3. *Org Biomol Chem*, **3**: 57–64.

Speelmans, G., A. Bijlsma, and G. Eggink. 1998. Limonene bioconversion to high concentrations of a single and stable product, perillic acid, by a solvent-resistant *Pseudomonas putida* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, **50**: 538-544.

Stover, C. K., X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warrenner, M. J. Hickey, F. S. L. Brinkman, W. O. Hufnagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G. K.-S. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsenk, J. Reizer, M. H. Saier, R. E. W. Hancock, S. Lory, and M. V. Olson. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, **406**: 959-964.

Suresh, B., T. Ritu, and G. A. Ravishankar. 2006. Chapter 3.14 Biotransformations as applicable to food industries. In Food Biotechnology, 2nd edn, K. Shetty, G. Paliyath, A. Pometto, R. D. Levin (Ed).

- Surburg, H. and J. Panten. 2006. Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses, 5nd Ed. Wiley-VCH, Weinheim.
- Takamura, Y., I. Kitamura, K. Kono, and A. Ozaki. 1968. Process for producing L-aspartic acid. US patent 3391059.
- Tandlich, R., B. Brezná, K. Dercová. 2000. The effect of terpenes on the biodegradation of polychlorinated biphenyls by *Pseudomonas stutzeri*. *Chemosphere*, **44**: 1547-1555.
- Teunissen, M. J. and J. A. M. De Bont. 1995. Will terpenes be of any significance in future biotechnology, pp. 329–330. In: Bioflavor '95 (Eds P. Etiévant and P. Schreier.), INRA, Versailles, Cedex.
- Tozoni D., J. Zacaria, R. Vanderlinde, A. P. Longaray Delamare, S. Echeverrigaray. 2010. Degradation of citronellol, citronellal and citronellyl acetate by *Pseudomonas mendocina* IBPse 105. *Electr J Biotechnol*, **13**: 1-7.
- Trudgill, P. W. 1990. Microbial metabolism of terpenes - recent developments. *Biodegrad*, **1**: 93–105.
- Tudroszen, N. J., D. P. Kelly, and N. F. Millis. 1977. α -Pinene Metabolism by *Pseudomonas putida*. *The Biochemic J.*, **168**: 315-318.
- Tsou, A. Y., S. C. Ransom, J. A. Gerlt, D. D. Buechter, P. C. Babbitt, G. L. Kenyon. 1990. Mandelate pathway of *Pseudomonas putida*: sequence relationships involving mandelate racemase, (S)-mandelate dehydrogenase, and benzoylformate decarboxylase and expression of benzoylformate decarboxylase in Escherichia coli. *Biochem*, **29**: 9856-9862.
- Tsukamoto, Y., S. Nonomura, and H. Sakai, 1975. Formation of p-cis-menthan-1-ol from p-menthane by *Pseudomonas mendocina* SF. *Agric. Biol. Chem.*, **39**: 617–620.
- Unno, T., S.-J. Kim, R. A. Kanaly, J.-N. Ahn, S.-I. Kang, and H.-G. Hur. 2007. Metabolic Characterization of Newly Isolated *Pseudomonas nitroreducens* Jin1 Growing on Eugenol and Isoeugenol. *J. Agric. Food Chem.*, **55**: 8556–8561.
- Vandenbergh, P. A. and R. L. Cole. 1986. Plasmid involvement in linalool metabolism by *Pseudomonas fluorescens*. *Appl Environ Microbiol*, **52**: 939–940.

- Zhang, Y., Y. Mao, K. Li, P. Dong, R. Liang, and X. Luo. 2011. Models of *Pseudomonas* growth kinetics and shelf life in chilled *Longissimus dorsi* muscles of beef. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, **24**: 713 – 722.
- Zorn, H., F. Neuser, and R. G. Berger. 2004. Degradation of α -pinene oxide and [2H7]-2,5,6-trimethyl-hept-(2E)-enoic acid by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11761. *J Biotechnol*, **107**: 255–263.
- Walton, N.J., A. Narbad, C. B. Faulds, G. Williamson. 2000. Novel approaches to the biosynthesis of vanillin. *Curr Opi Biotechnol*, **11**: 490-496.
- Washisu, Y., A. Tetsushi, N. Hashimoto, and T. Kanisawa. 1993. Manufacture of vanilin and related compounds with *Pseudomonas*, JP Patent 5227980.
- Wigmore G. J. and D. W. Ribbons. 1980. p-Cymene pathway in *Pseudomonas putida*: selective enrichment of defective mutants by using halogenated substrate analogs. *J Bacteriol.*, **143**: 816-24.
- Yamada, M., Y. Okada, T. Yoshida, and T. Nagasawa. 2007. Biotransformation of isoeugenol to vanillin by *Pseudomonas putida* IE27 cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, **73**: 1025–1030.
- Yoo S. K. and D. F. Day. 2002. Bacterial metabolism of α - and β -pinene and related monoterpenes by *Pseudomonas* sp. strain PIN. *Process Biochem*, **37**: 739–45.
- Yoshimoto, T., M. Samejima, N. Hanyu, and T. Koma. 1990. Dioxygenase for styrene cleavage manufactured by *Pseudomonas*. JP patent 2195871.

CAPÍTULO 2

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS DO GÊNERO *PSEUDOMONAS* POTENCIALMENTE BIOTRANSFORMADORES DE MONOTERPENOS

RESUMO

Os monoterpênos são hidrocarbonetos formados a partir de duas unidades de isopreno. Os compostos oxigenados derivados dos terpenos possuem características sensoriais particularmente interessantes. Assim, vários monoterpênos prontamente disponíveis e de baixo custo têm sido amplamente usados como precursores de terpenóides de maior valor agregado no mercado mundial. O presente trabalho visou a utilização de monoterpênos (limoneno, α -pineno e citrônolol) como substrato em processos de biotransformação por micro-organismos do gênero *Pseudomonas*. O isolamento de micro-organismos, realizado em meios seletivo e diferencial para *Pseudomonas*, resultou em 34 linhagens incluindo algumas da coleção do Laboratório de Bioaromas (FEA/UNICAMP). Dentre as linhagens isoladas, 9 bactérias foram capazes de biotransformar um dos substratos em compostos de aroma de maior valor agregado. *R*-(+)-limoneno foi convertido a *cis*- e *trans*-carveol e carvona por 7 linhagens, das quais a maior concentração de produtos foi obtida pela linhagem MANJ, em torno de 412 mg/L, 275 mg/L e 209 mg/L respectivamente. α -Pineno, por sua vez, foi usado como fonte de carbono e energia por 7 linhagens, e foi convertido em *cis*-verbenol e verbenona a baixas concentrações por 5 linhagens. Outros compostos como limoneno, mirtenol e β -pineno, também foram identificados como produtos principais da conversão do α -pineno por 2 linhagens. Apenas 3 linhagens foram capazes de metabolizar citrônolol em outros compostos derivados, como óxidos de rosa e isopulegol, a concentrações de até 29 mg/L e 50 mg/L, respectivamente. As concentrações dos produtos descritos acima foram obtidos após 112h de fermentação. Os efeitos da variação do pH do meio de bitoransformação e da indução das linhagens no crescimento celular e formação de produtos de bioconversão foram avaliados com o intuito de otimizar o processo de biotransformação.

Palavras-chave: *Pseudomonas*, monoterpênos, biotransformação

1. Introdução

Os monoterpenos são hidrocarbonetos formados a partir de duas unidades de isopreno (C_5H_{10}), e são amplamente distribuídos na natureza, de onde mais de 400 compostos monoterpênicos já foram identificados (Berger 1997). Os compostos oxigenados derivados dos terpenos, conhecidos como terpenóides, possuem o mesmo esqueleto carbônico mas com alguns grupos funcionais que promovem características sensoriais particularmente interessantes (Duetz *et al.* 2003). Assim, vários monoterpenos prontamente disponíveis e de baixo custo, como limoneno e α -pineno, têm sido amplamente usados como precursores de terpenóides de maior valor agregado mundialmente (de Carvalho e da Fonseca 2006a).

R-(+)-limoneno, por exemplo, é o monoterpeno mais abundante na natureza e representa mais de 90% do óleo da casca de laranja, que é um subproduto da indústria cítrica (Surburg e Panten 2006). Entre as décadas de 1945 a 1960, a indústria de suco de laranja cresceu significativamente na Flórida, em torno de 80% (Murdock e Allen 1960). O Brasil também se destaca pela expressiva produção de laranja, que transforma mais de 75% do total de frutas cítricas produzidas em produtos industrializados, sendo que grande parte do resíduo industrial (cerca de 45 a 50% do peso das laranjas processadas) é exportada para a Europa desde a década de 1970, assim como o óleo de laranja e D-limoneno (Bicas 2009). Com isso, a disponibilidade a baixo custo de grandes quantidades de D-limoneno presentes no óleo da casca da laranja despertou o interesse de cientistas em criar novos processos que aumentassem o valor agregado desse subproduto, visto que uma variedade de compostos de aroma e medicinais possuem o mesmo esqueleto carbônico do limoneno, sugerindo um grande potencial de mercado (Duetz *et al.* 2003). Entre os compostos derivados mais notáveis pela alta qualidade sensorial estão a carvona e carveol com notas de hortelã (de Carvalho e da Fonseca 2003, Dhavalikar e Battacharyya 1966) e α -terpineol com notas florais (Cadwallader *et al.* 1989), enquanto o álcool perfílico vem ganhando destaque expressivo pelas comprovações científicas relacionadas ao seu poder de prevenção de doenças degenerativas (Chatterjee e Bhattacharyya 2001, Xu *et al.* 2004, Yuri *et al.* 2004). Outros monoterpenóides também são reconhecidos por apresentar algumas funções biológicas, atuando na prevenção e regressão de diversos tipos de câncer, como mostra a revisão publicada por Crowell (1999). Enquanto o D-limoneno possui um baixo custo, em

torno de US\$ 1-2/Kg, compostos derivados como mentol e carvona custam em torno de US\$ 30-60/Kg (Mazzaro 2000).

Assim, a bioconversão de limoneno têm sido intensivamente investigada desde a década de 60, quando Dhavalikar e Bhattacharyya (1966) divulgaram a formação de uma gama de produtos incluindo compostos perílicos, carveol, carvona e dihidrocarvona, a partir da utilização de *R*-(+)-limoneno como única fonte de carbono por *Pseudomonas*. Posteriormente, outros estudos demonstraram a produção de ácido perílico e α -terpineol por *P. gladioli* (Cadwallader *et al.* 1989), ácido perílico por *P. putida* GS1 (Speelmans *et al.* 1998) e *P. putida* MTCC 1072 (Chatterjee e Bhattacharyya 2001), e α -terpineol por *P. fluorescens* (Bicas *et al.* 2008). A produção de compostos perílicos também já foi relatada pelo uso de fungos e leveduras (Van Rensburg *et al.* 1997, Trytek e Fiedurek 2005). A conversão do limoneno ao diol correspondente configura outra via metabólica da degradação do limoneno e é comumente descrita para fungos, por exemplo *Aspergillus* sp. (Noma *et al.* 1992), *Corynespora cassiicola* (Abraham *et al.* 1986, Demyttenaere *et al.* 2001), mas também é observado em bactérias (Van der Werf *et al.* 1999, de Carvalho *et al.* 2000).

α - e β -Pinenos, por sua vez, são encontrados em abundância no óleo de terebentina, que é um fluido obtido como subproduto das indústrias de papel e celulose (Savithiry *et al.* 1998, Yoo and Day 2002). As indústrias de aromas e fragrâncias selecionam a terebentina a ser utilizada de acordo com sua composição, sendo mais valorizada aquela com maior concentração de pinenos, em torno de 90%, dos quais 30-40% corresponde ao β -pineno (FAO 1995). Nesse sentido, o Brasil se encontra à frente pelo fato de a principal espécie de *Pinus* produzida no país ser a *Pinus Elliottii*, composta por alta porcentagem de pinenos, sendo 60% α -pineno e 30% β -pineno (Ferreira 2001). Além disso, a atividade de resinagem tem crescido significativamente no Brasil, atingindo uma produção média de resina de pinho de aproximadamente 87.000 ton em 2011 (Fonte: Aresb - Associação dos resinadores do Brasil, disponível em <http://www.aresb.com.br/estatistica/index.html>).

Considerando que o Brasil está se tornando um produtor importante de terebentina de alta qualidade, é de grande interesse converter α - e β -pinenos em compostos mais valorizados no mercado mundial, de forma a aumentar o valor agregado do óleo de terebentina e colocar o país em destaque no cenário mundial. Assim, pesquisas têm focado

na seleção de biocatalisadores com a habilidade de oxidar pinenos seletivamente em compostos de aroma de alto valor agregado como terpineols (Chatterjee *et al.* 1999), borneols (Schrader 2007), verbenol e verbenona (Agrawal *et al.* 1999). Os últimos são obtidos através da hidroxilação do α -pineno para produzir verbenol, que por sua vez pode ser dehidrogenado e convertido em verbenona (Battacharyya *et al.* 1960; Berger and Lange 2004). Essa bioconversão começou a ser estudada em 1960, usando uma linhagem de *Aspergillus niger* capaz de produzir verbenol, verbenona e *trans*-sobreol a partir do α -pineno (Prema and Battacharyya 1962, Battacharyya *et al.*, 1960). Outros fungos como *Candida tropicalis* (Chatterjee *et al.* 1999) e endobactéria *Serratia marcescens* (Wright *et al.* 1986) foram capazes de produzir α -terpineol. Da mesma forma, bactérias do gênero *Pseudomonas* foram capazes de converter α -pineno em isonovalal e novalal (Best *et al.* 1987, Fontanille *et al.* 2002, Fontanille and Larroche 2003, Bicas *et al.* 2008), verbenol, verbenona, e acetato de dihidrocarveol (Divyashree *et al.* 2006).

β -Pineno também é precursor de compostos interessantes pelas suas características odoríferas, como α -terpineol por linhagens de *Aspergillus niger* (Toniazzi *et al.* 2005, Rozenbaum *et al.* 2006), pinocamfona e 3-hidroxi-pinocamfona por *Hormonema* sp. (Van Dyk *et al.* 1998). Espécies de *Pseudomonas* também foram capazes de usar β -pineno como fonte de carbono e energia e produzir alguns compostos de interesse como cânfora, borneol, α -terpineol, *trans*-pinocarveol, mirtenol, α -pineno (Dhavalikar *et al.* 1974, Rama Devi e Battacharyya 1978, Shukla *et al.* 1968, Bicas *et al.* 2008).

Outros monoterpenos também são empregados em processos de biotransformação, como o citrionelol, devido a sua importância industrial como aromatizante e por ser um precursor de outros compostos de aroma interessantes pela presença de notas florais (Schrader e Berger 2001). Segundo Förster-Fromme *et al.* (2006), terpenóides acíclicos contém uma substituição do grupo 3-metil na cadeia carbônica principal que torna a degradação desses compostos particularmente relutante. No entanto, algumas bactérias, especialmente do gênero *Pseudomonas*, são capazes de usar esses compostos como única fonte de carbono e energia. Os primeiros estudos no uso de terpenos como fonte de carbono por micro-organismos foi realizado por Seubert (1960) ao isolar uma linhagem de *Pseudomonas* do solo, *Pseudomonas citrionellolis*, com a habilidade de usar citrionelol e compostos relacionados como única fonte de carbono e energia. A elucidação das etapas

enzimáticas da degradação do citrônolol foi publicada em trabalhos subsequentes (Seubert *et al.* 1963, Seubert e Remberger 1963, Seubert e Fass 1964a, Seubert e Fass 1964b).

Inúmeras linhagens de *Pseudomonas* foram capazes de degradar o citrônolol incluindo *P. incognita* (Madyastha e Renganathan 1983), *P. mendocina* (Tozoni *et al.* 2010, Cantwell *et al.* 2005), *P. aeruginosa* (Cantwell *et al.* 2005). Um artigo de revisão recentemente publicado por Forster-Fromme and Jendrossek (2010) apresenta informações mais detalhadas das vias catabólicas do citrônolol conhecidas até o momento conduzidas por linhagens de *Pseudomonas*. O óxido de rosa é um dos compostos derivados do citrônolol de maior valor comercial por ser um dos componentes mais importantes na criação de notas florais em perfumaria e com um baixo threshold que atinge 0,5 ppb para l-*cis*-óxido de rosa e 50 ppb para d-*cis*-óxido de rosa (Maróstica e Pastore 2006). No entanto, o acúmulo de produtos como o óxido de rosa, têm sido observado majoritariamente em fungos como *Aspergillus niger* (Demyttenaere *et al.* 2004), *Penicillium* sp. (Maróstica e Pastore 2006), *Cystoderma carcharias* (Onken e Berger 1999b), *B. cinerea* (Rapp e Mandery 1988).

A transformação de citrônolol em citrônolal também já foi relatada (Díaz-Pérez *et al.* 2004, Höschle *et al.* 2005, Aguilar *et al.* 2006, Förster-Fromme *et al.* 2006). O aldeído citrônolal, por sua vez, já foi convertido em compostos como pulegol e isopulegol, seguido de hidrogenação a mentol por *Penicillium digitatum*, cujo processo foi patenteado por Babicka e colaboradores (1952). Outros estudos relataram resultados similares por *Candida reukaufii* (Kieslich *et al.* 1986).

Esse capítulo descreve o isolamento e seleção de linhagens de *Pseudomonas* com potencial para biotransformar monoterpenos, incluindo R-(+)-limoneno, α -pineno, e citrônolol, em compostos de aroma de alto valor agregado.

2. Material e métodos

2.1. Reagentes

Os substratos utilizados nos estudos de biotransformação foram (S)-(-)- α -pineno (~98%, Sigma-Aldrich), DL-citrônolol (~95%, Sigma-Aldrich), e (R)-(+)-limoneno (~98%, Fluka). Os padrões comerciais utilizados como referência para os produtos de bioconversão foram (-)-carveol (97%, Sigma-Aldrich), (R)-(-)-carvona (98%, Sigma-Aldrich), (+)-óxido

de rosa (mistura de isômeros, >99%, Fluka), verbenona (>93%, Sigma-Aldrich). Todos os reagentes foram mantidos sob baixas temperaturas (5°C). Os demais reagentes utilizados eram de grau analítico.

2.2. Isolamento de micro-organismos em meio seletivo para *Pseudomonas*

Micro-organismos foram isolados de amostras de solo, frutas e hortaliças coletados na região de Campinas-SP, Brasil. O isolamento foi realizado através de uma sequência de etapas para promover o crescimento seletivo de bactérias Gram-negativas do gênero *Pseudomonas*. As amostras foram transferidas em condições estéreis para erlenmeyers de 100 mL contendo 20 mL de meio de cultura líquido *yeast malt* (YM, em g/L: 10 g de glicose; 5 g de peptona; 3 g de extrato de malte; 3 g de extrato de levedura, 20 g de ágar bacteriológico). Após 24 h, uma alçada de cada meio líquido foi transferida para placas de Petri com meio sólido TTC (Cloreto de Trifeniltetrazolium, em g/L: 1,4 g de MgCl₂; 10 g de peptona; 1,6 g de K₂HPO₄·3H₂O; 15 g de ágar bacteriológico; e 2 mL de solução 5% de cloreto de trifeniltetrazolium filtrado em millipore para cada 100mL de meio). As placas inoculadas foram incubadas em estufa bacteriológica a 30°C por 24 a 48 h, o suficiente para o crescimento de colônias.

Cada colônia de coloração púrpura foi transferida sob condições estéreis para placas de Petri com meio seletivo e diferencial para *Pseudomonas*, KING B (em g/L: 20 g de proteose peptona nº3; 1,5 g de MgSO₄·7H₂O; 10 g de glicerol; 20 g de ágar bacteriológico; pH=7,2) (King et al., 1954) por método de esgotamento utilizando-se alça de platina, e as placas inoculadas foram colocadas em estufa bacteriológica a 30°C. O correto isolamento e morfologia das colônias foram verificados por meio da coloração de Gram. As colônias bacterianas que cresceram em meio TFT, com coloração púrpura, em meio KING e que foram identificadas como Gram-negativas foram consideradas com grande potencial de pertencerem ao gênero *Pseudomonas*. Os micro-organismos selecionados foram cultivados em placas de Petri com meio de cultura sólido YM em estufa bacteriológica a 30°C até o crescimento bacteriano satisfatório. Cada colônia isolada foi transferida para tubos de ensaio com meio sólido YM sob condições estéreis e estocada sob refrigeração.

2.3. Etapas do Pré-inóculo

2.3.1. Preparação da cultura de células

As culturas foram produzidas em 200 mL de meio líquido MBP contendo 0,8 g de glicose como fonte de carbono, 0,2 g de $(\text{NH})_4\text{SO}_4$, 4 mL de solução de Hutner (Fontanille, 2002), 8 mL de solução A (6,5 g de K_2HPO_4 , 8,28 g de KH_2PO_4 em 250 mL de água destilada) e 188 mL de água destilada (adaptado de Bicas *et al.*, 2009). Os erlenmeyers foram acondicionados em shaker a 30°C e 150 rpm por 24 h para atingir uma densidade óptica entre 2 e 3 (DO_{600}).

2.3.2. Recuperação da biomassa

Após 24 h de crescimento, as culturas foram centrifugadas em condições assépticas a 10.000 rpm e 5°C por 10 min. O sobrenadante foi eliminado e a biomassa celular resultante foi ressuspensa em erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de Tampão Fosfato de Potássio 20mM (pH não ajustado, em torno de 7.4).

2.4. Procedimento de biotransformação de monoterpenos

As linhagens de *Pseudomonas* sp. foram utilizadas para biotransformação de monoterpenos em cultura submersa. A biotransformação foi conduzida em erlenmeyers, incubados em *shaker* a 30°C/150 rpm, empregando 0,5% (v/m) de terpeno como substrato. Os monoterpenos utilizados foram α -pineno, *R*-(+)-limoneno e citrônolol. Igualmente, amostras sem a biomassa foram utilizadas como controle, para garantir a ausência de reações de transformação química ou auto-oxidação do substrato. Amostras foram coletadas nos tempos 0, 24, 48, 72 e 96 h para análise dos possíveis produtos formados e consumo do substrato (adaptado de Bicas *et al.*, 2008).

2.5. Variação do pH do meio de biotransformação

As linhagens que apresentaram melhores resultados de produção de compostos de aromas foram submetidos a experimentos com variação do pH, em 6,5, 7,0 e 7,5, do meio de biotransformação para avaliação do desenvolvimento da biomassa e da formação dos produtos derivados do processo, totalizando 33 experimentos.

2.6. Indução das linhagens

Para investigar o efeito da indução das linhagens no crescimento bacteriano e formação dos compostos de bioconversão, culturas de células das linhagens foram desenvolvidas em meio líquido MBP como descrito no item 2.3. Após 24 h, 50 mL da cultura pré-crescida foi transferida para outro erlenmeyer contendo 150 mL de meio MBP sem glicose, e 0,1% de terpeno foi adicionado como fonte de carbono e energia para indução das linhagens. Após 24 h, a cultura foi centrifugada e a biomassa submetida ao experimento de biotransformação de terpenos como descrito no item anterior, usando o meio de biotransformação com o pH que apresentou melhor resultado pela etapa anterior (adapted from Molina, 2010).

2.7. Procedimento de extração

A extração dos compostos voláteis das amostras foi realizada com acetato de etila contendo 1% (v/v) de *n*-decano como padrão interno e mantida em agitação por 40 s no *Vórtex*. Após a separação das fases, 1 µL da fase orgânica foi injetado no cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM) para análise e identificação dos compostos voláteis formados.

2.8. Análises cromatográficas dos produtos formados

O equipamento empregado para esse estudo foi um cromatógrafo a gás HP-7890 acoplado a um espectrômetro de massas HP-5975C (CG/EM - Agilent Technologies) equipado com uma coluna capilar HP-5MS (30 m comprimento, 0,25mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme). Hélio foi usado como gás de arraste a uma vazão constante de 1,0 mL/min. O injetor permaneceu a 250°C, o detector foi mantido a uma temperatura de 250°C na linha de transferência, energia de impacto de +70 eV e faixa de massas de 35-450 m/z. A identificação dos compostos foi realizada por comparação dos espectros com a biblioteca NIST2008, com similaridade superior a 90%, pelo seu índice de retenção, como também pela confirmação com os padrões comerciais. A temperatura do forno do cromatógrafo a gás foi mantida a 80°C por 2 min, elevada a 220°C a uma taxa de 20°C/min, permanecendo nessa temperatura por mais 6 min. Para dessorção dos compostos, foi utilizado um injetor do tipo *split-splitless*, no modo *split* a uma razão de 10:1. O substrato e os produtos formados foram quantificados por uma curva de calibração

construída com diferentes concentrações do respectivo padrão comercial, utilizando *n*-decano como padrão interno.

3. Resultados e Discussão

3.1. Isolamento de micro-organismos em meio seletivo para *Pseudomonas*

Os micro-organismos usados no presente estudo foram isolados de diversas matrizes ou selecionados da coleção do Laboratório de Bioaromas (UNICAMP), sendo algumas linhagens provenientes de matrizes complexas como o petróleo, e totalizaram 34 linhagens como é mostrado na Tabela 1.

Dentre as matrizes escolhidas para o isolamento, o solo é comumente citado como um habitat natural de micro-organismos do gênero *Pseudomonas*, de onde várias linhagens já foram isoladas e empregadas em processos biotecnológicos (Yoo and Day 2002, Unno *et al.* 2007). As outras matrizes como frutas e hortaliças foram escolhidas por serem ricas em terpenos e, portanto, possivelmente uma fonte de micro-organismos resistentes a toxicidade desses compostos. Além disso, as *Pseudomonas* são conhecidas por se associarem a plantas de forma epifítica, endofítica ou patogênica, o que pode justificar a presença e isolamento de linhagens de *Pseudomonas* de fontes vegetais.

Todas as linhagens consideradas para este estudo foram submetidas a uma sequência de etapas incluindo meios seletivos e diferenciais que favorecem apenas o crescimento de micro-organismos do gênero *Pseudomonas*, e posterior observação em microscópio óptico para avaliação da morfologia das colônias e características apresentadas após a coloração de Gram. O Cloreto de Trifeniltetrazólio (TTC) é um corante de oxi-redução que tem sido utilizado para detecção do crescimento microbiano ou células microbianas viáveis (Ohara e Saito 1993, Johnson *et al.* 1985). O TTC é uma substância incolor na forma oxidada e se reduz formando o Trifenil Formazan na presença de H⁺ pela ação metabólica, assumindo uma coloração púrpura. Portanto, o aparecimento da cor púrpura em uma cultura indica se houve atividade celular bacteriana (Ohara e Saito 1993).

Tabela 1. Fontes de isolamento de micro-organismos potencialmente pertencentes ao gênero *Pseudomonas* e codificação das colônias.

Fonte	Colônias	Codificação
Solo	4	LB-SFC22P*, LB-SFC32P*, LB-SF1P, LB-SF2P
Solo de Laranjeira	1	LB-SL1AA2P*
Folhas de Laranjeira	2	LB-FLC12P*, LB-FLC23P*
Laranja	4	LB-L1B2P, LB-L1C1P, LB-L1C3P, LB-L1C5P
Laranja Polpa	1	LB-LPL5P
Laranja Ponta	2	LB-LPN3P, LB-LPN5P
Laranja Semente	1	LB-LS1P
Cajú Castanha	1	LB-CC6P
Cajú Polpa	2	LB-CP6P, LB-CP7P
Folhas de Hortelã	1	LB-HORT*
Folhas de Manjerição	1	LB-MANJ*
Banana enterrada com terpeno	1	LB-BCF
Maça enterrada com terpeno	1	LB-MCF
Melancia Casca	2	LB-CM1P, LB-CM2P
Cenoura	1	LB-CEN
Folha de pitangueira	1	LB-FOLA1
Pitanga	1	LB-FRA2
Fruta do Coqueiro Jerivá	1	LB-FRB2
Coleção do Laboratório	2	LB-LAN-TAN*, LB-CONT*
Petróleo	4	LB-P105*, LB-P107*, LB-P109*, LB-P110*

*Linhagens pertencentes à Coleção do Laboratório de Bioaromas.

Assim, as colônias selecionadas apresentaram uma coloração púrpura quando desenvolvidas em meio contendo TTC. Elas também foram capazes de crescer em meio KING, seletivo para *Pseudomonas* spp. (King *et al.* 1954). Além disso, foram identificadas pela coloração de Gram como bactérias do tipo bastonetes Gram negativas, características do gênero *Pseudomonas* (Figura 1).

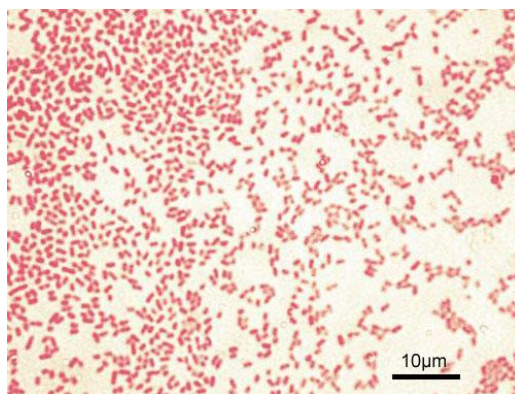


Figura 1. Ilustração de bactérias Gram-negativas após a Coloração de Gram.

3.2. Biotransformação de monoterpenos

Os micro-organismos isolados em meio seletivo e diferencial para *Pseudomonas* e caracterizados como bacilos Gram-negativos foram avaliados quanto a produção de compostos de aroma através da biotransformação de monoterpenos, incluindo (-)- α -pineno, citronelol e (*R*)-(+)-limoneno. Essas linhagens foram selecionadas com o intuito de explorar o potencial de micro-organismos do gênero *Pseudomonas* em se adaptar a novos substratos e usá-los como fonte de carbono para produção de compostos de aroma. Das 34 linhagens testadas, 9 micro-organismos foram capazes de metabolizar pelo menos um dos substratos em novos compostos derivados, o que indica que eles foram capazes de usar o respectivo terpeno como fonte de carbono e energia. O consumo do substrato e a formação dos produtos da biotransformação foram acompanhados através de análise cromatográfica por CG-EM, o que permitiu identificar algumas rotas metabólicas que foram sugeridas no presente trabalho e serão discutidos individualmente nos próximos itens. O monitoramento do consumo do substrato permitiu manter o nível de terpeno suficiente ao longo do processo através da reaplicação do substrato de acordo com o decaimento do mesmo.

A investigação foi focada mais no padrão qualitativo dos produtos obtidos do que em seus rendimentos absolutos, a fim de selecionar biocatalisadores e respectivos substratos com potencial para aplicação em futuros trabalhos mais detalhados e de maior escala. Estudos em biotransformação de limoneno demonstraram que o nível ótimo de limoneno para crescimento satisfatório de bactérias do gênero *Pseudomonas* é em torno de 0,3 a 0,6% (v/v), apesar de não ter sido observado nenhuma toxicidade à concentrações de até 2% (Dhavalikar and Battacharrya 1966, Noma et al 2010). Considerando que o nível de

toxicidade dos terpenos utilizados (α -pineno e citrônolol) são próximos ao do limoneno, em torno de 4 a 4,5, os experimentos de biotransformação foram conduzidos e padronizados pela adição de 0,5% de terpeno para seleção de micro-organismos com habilidade de transformar terpenos em compostos de aroma de interesse industrial.

3.2.1. Biotransformação de *R*-(+)-Limoneno

O limoneno é um dos monoterpenos mais estudados em processos de biotransformação e sua degradação pode produzir diversos compostos voláteis dependendo da posição da reação na molécula (Maróstica e Pastore 2007). Os resultados mostraram que 7 linhagens de *Pseudomonas* foram capazes de usar o limoneno como fonte de carbono e energia, e sua degradação resultou majoritariamente em *cis*- e *trans*-carveol e carvona (Figura 2). Outros compostos derivados do limoneno também foram formados, e suas respectivas estruturas estão demonstradas na Figura 3.

A ocorrência de múltiplos produtos pode indicar a presença de várias enzimas regioespecíficas, como também que as enzimas iniciais envolvidas na rota catabólica do limoneno podem não ser completamente regioespecíficas. Um estudo realizado por Cheong e Oriel (2000) mostrou a formação de uma mistura de carvona e álcool perfílico pela ação de uma hidroxilase de limoneno na posição 6 e 7 da molécula, respectivamente, e concluiu que a formação de múltiplos produtos ocorreu devido a regioespecificidade incompleta da enzima, e não pela ação de diversas enzimas com regioespecificidades diferentes. No entanto a presença de várias enzimas também pode ocorrer, gerando a formação de múltiplos produtos, o que foi constatado usando a linhagem selvagem de *Bacillus* por apresentar enzimas codificadas em diferentes fragmentos cromossômicos (Cheong e Oriel 2000). Outro aspecto da formação múltipla de produtos diz respeito a regioespecificidade das enzimas oxigenases, que só é completa quando os regioisômeros não são assimilados, criando uma pressão seletiva. Além disso, vários micro-organismos capazes de crescer em limoneno também são capazes de utilizar uma ampla variedade de derivados hidroxilados, o que justificaria a formação de múltiplos produtos (Duetz *et al.* 2003). Uma revisão sobre as rotas metabólicas envolvidas na biotransformação de limoneno foi publicada por Maróstica e Pastore (2007), onde a formação dos diferentes produtos derivados do limoneno foi descrita com maiores detalhes.

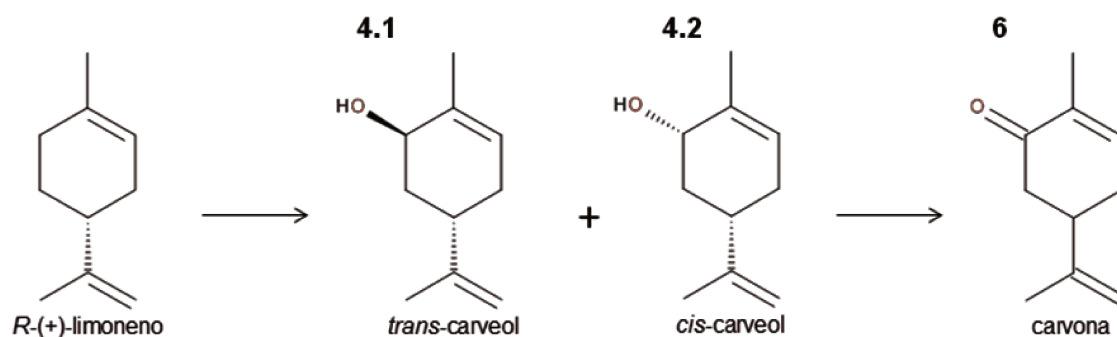


Figura 2. Principal via metabólica da biotransformação de limoneno pelas linhagens isoladas. Os números referem-se aos picos cromatográficos do cromatograma (figura 4).

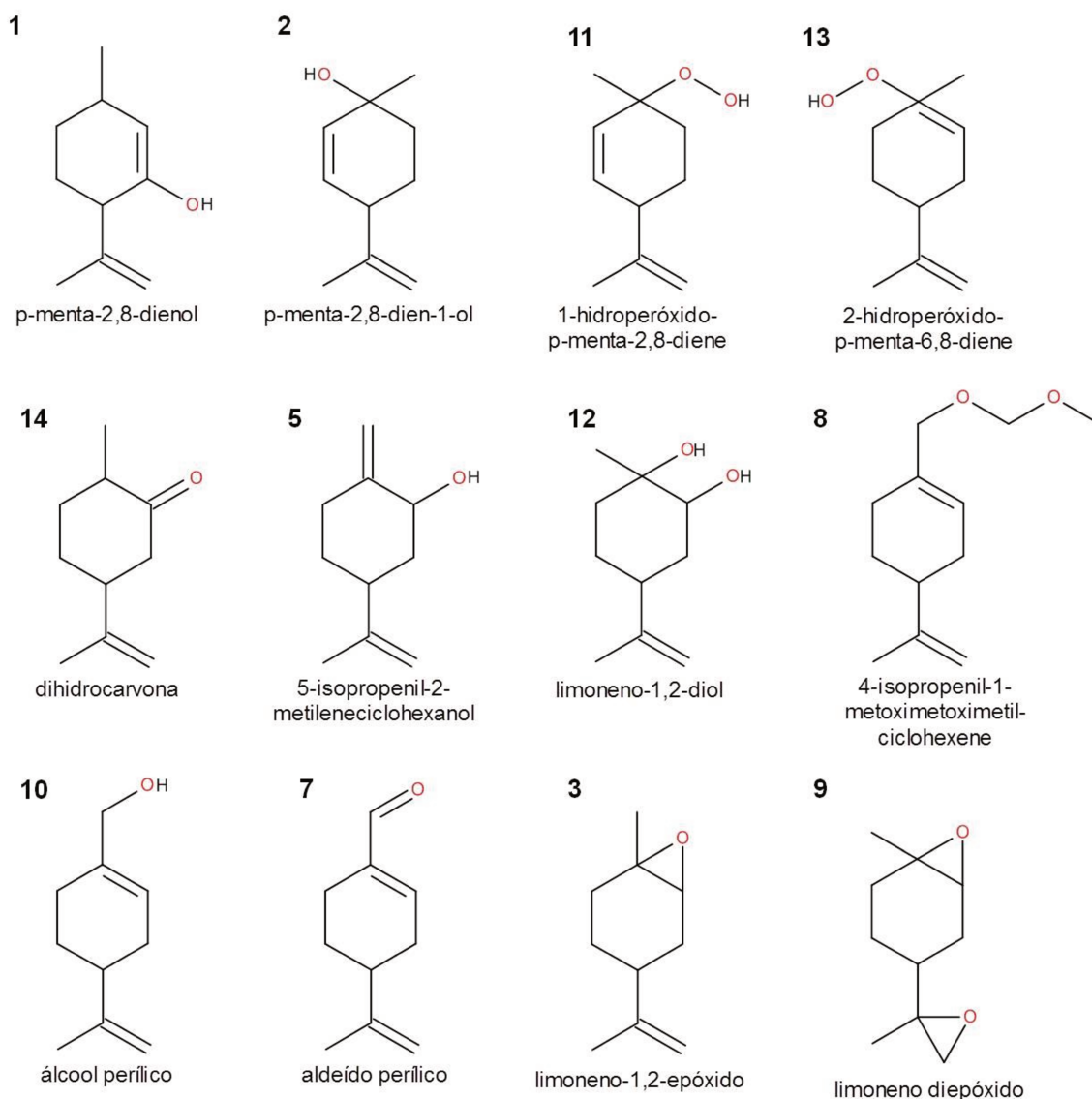


Figura 3. Estrutura de outros produtos formados a partir da biotransformação do limoneno. Os números referem-se aos picos cromatográficos seguindo a ordem do tempo de retenção.

O cromatograma (Figura 4a) apresentado a seguir mostra um exemplo da identificação dos compostos derivados do limoneno através da análise em um cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas, onde cada pico refere-se a um composto ou isômero. O cromatograma menor ainda mostra a formação de compostos pela auto-oxidação do limoneno (amostra controle) em comparação com os compostos formados a partir da transformação microbiana (Figura 4b). Os isômeros *cis*- e *trans*-carveol e a carvona apareceram na amostra controle (ausência de micro-organismos), sugerindo que são formados também pela auto-oxidação do limoneno, no entanto em concentrações muito menores àquelas produzidas pelos micro-organismos. Outros compostos derivados também apareceram na amostra controle, porém em concentrações traços (Figura 4b e Tabela 2).

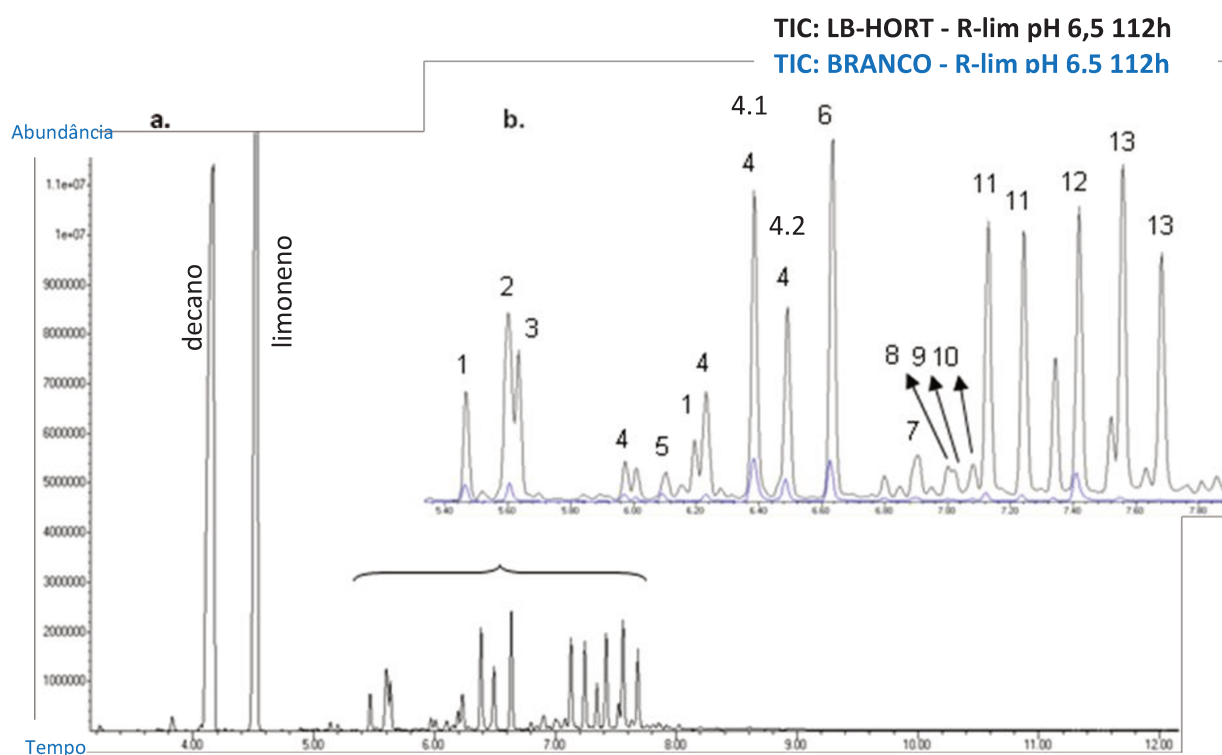


Figura 4. a. Cromatograma da bioconversão de limoneno a 30°C e 150 rpm, pela linhagem LB-HORT. **b.** Produtos formados após 112h da adição do limoneno (preto), em comparação com o controle (azul). Números correspondem às estruturas apresentadas nas Figuras 2 e 3. Condições de fermentação: a cultura previamente crescida em meio MBP foi centrifugada, e a biomassa resultante foi transferida para tampão fosfato de potássio contendo 0,5% de terpeno como única fonte de carbono e incubada a 30°C e 150 rpm por 112 h.

A formação de carveol e carvona ocorre pelo ataque oxidativo na posição alílica C-6 da cadeia carbônica do limoneno e é de grande interesse industrial por apresentar notas sensoriais impactantes (Acosta *et al.* 1996), como hortelã, erva fresca ou alcaravia (de Carvalho e da Fonseca, 2006b). Um dos primeiros relatos dessa reação de transformação microbiana estudou linhagens de *Pseudomonas* isoladas de solo (Dhavalikar e Bhattacharyya 1966). As linhagens LB-HORT e LB-MANJ se destacaram por apresentar as maiores concentrações de carveol e carvona (Tabela 2). A formação dos isômeros de carveol e da carvona ocorreu de forma progressiva, atingindo a máxima concentração no último dia de análise, após 112h, como mostra a Figura 5. Esse perfil foi similar para todas as linhagens, sendo que o aumento da concentração dos produtos foi diretamente proporcional à reaplicação de limoneno ao meio de biotransformação quando o decaimento do substrato era observado. É importante ressaltar que o tempo de fermentação ainda será otimizado em etapas futuras do trabalho, visando atingir a máxima concentração dos compostos de interesse no início da fermentação.

Tabela 2. Concentração de carveol (*cis* e *trans*) e carvona após 112h de bioconversão do limoneno. Os números na última coluna referem-se às estruturas mostradas na Figura 2.

Linhagem	<i>cis</i> -Carveol (4) (mg/L)	<i>trans</i> -Carveol (4) (mg/L)	Carvona (6) (mg/L)	Outros produtos
MANJ	412,05	275,43	209,10	1-3, 5, 7-13
HORT	365,63	246,13	188,01	1-3, 5, 7-13
L1B2P	234,76	135,05	102,20	1-3, 5, 7-13
CEN	190,65	96,86	28,37	1-3, 5, 12, 14
CM1	172,30	75,50	30,45	1-3, 5, 12
FLC23P	129,58	69,29	60,28	1-3, 5, 7-14
BCF	124,12	54,86	25,30	1-3, 5, 12
BRANCO	89,36	52,27	47,28	1-3, 5, 7-13

A atividade enzimática da monoxigenase que promove a conversão de limoneno a carveol é dependente do cofator NAD, que pode ser regenerado a partir do crescimento celular e, por isso, a fonte de carbono (limoneno) e oxigênio devem ser fornecidos ao longo de todo o período de biotransformação para a formação de carvona (de Carvalho e da Fonseca, 2002a).

A linhagem LB-MANJ foi capaz de transformar o limoneno em *cis*- e *trans*-carveol e carvona em concentrações que atingiram valores de até 412,05 mg/L, 275,43 mg/L e 209,10 mg/L, respectivamente, após 112h de fermentação. Esses resultados foram maiores em um tempo menor de fermentação se comparado aos obtidos pelo basidiomiceto *Pleurotus sapidus* que produziu *cis*- e *trans*-carveol e carvona a uma concentração total de produtos > 100 mg/L após 12 dias de cultivo (Onken e Berger, 1999a). Estudos em biotransformação de limoneno por *Pseudomonas aeruginosa* também relataram a formação de carvona em concentrações de até 625 ppm, e α -terpineol a 239 ppm, após 21 dias de fermentação (Acosta *et al.* 1996). Os produtos de bioconversão observados para a maioria das linhagens neste estudo (Tabela 2) estão de acordo com relatos descritos por Bowen (1975), que também observou a formação de carveol e carvona como principais produtos da biotransformação de limoneno, e outros compostos como p-mentha-2,8-dien-1-ol (**2**), limoneno-1,2-diol (**12**), e álcool perílico (**10**) em concentrações menores pela mesma linhagem *P. italicum*.

Estudos em processos de biotransformação de limoneno relataram concentrações significativas de compostos derivados que possuem grande interesse comercial, como a carvona, através do uso de bioreatores. Estudos demonstraram a produção de carvona pelo fungo *Rhodococcus erythropolis* DCL1 (Morrish 2008, de Carvalho e da Fonseca 2002a,b, de Carvalho e da Fonseca 2003). Ao usar carveol como precursor, a produtividade atingiu valores de até 99 mg/L·h, com duração de mais de 48h e volume de substrato adicionado de 35 mL. Este processo foi realizado em bioreator de partição com o intuito de diminuir a citotoxicidade do substrato e inibição da formação do produto (Morrish 2008). Quando a linhagem *R. erythropolis* DCL14 foi crescido em limoneno e tolueno, a taxa de produção de carvona atingiu valores de até 0,58 nmol/min mg proteína, pela alimentação contínua de limoneno ao bioreator (de Carvalho e da Fonseca, 2003). Estudo mais recente demonstrou

uma das maiores produções descritas na literatura até o momento derivado da biotransformação de limoneno, com a formação de 130 g/L de α -terpineol pela bactéria *Sphingobium* sp. (Bicas *et al.* 2010).

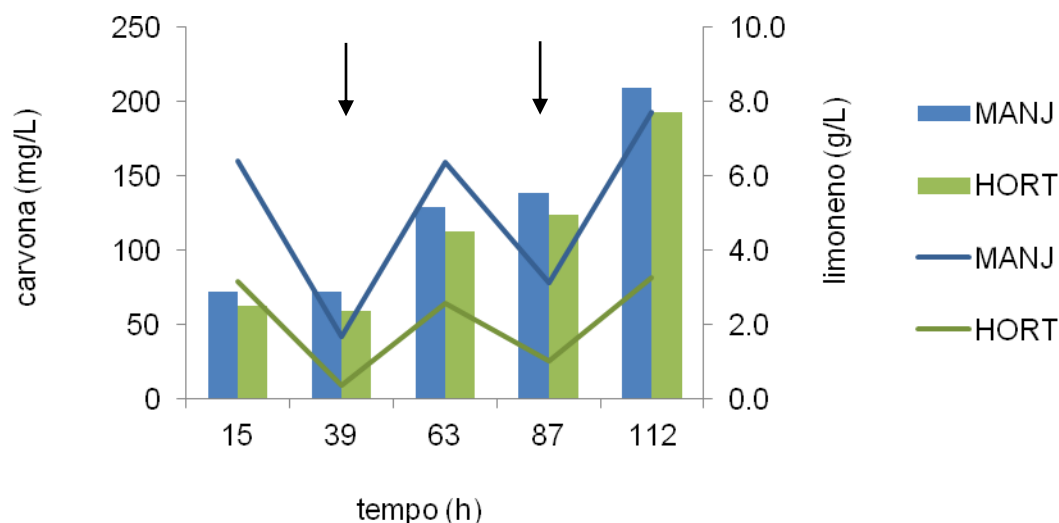


Figura 5. Produção de carvona (barras) e decaimento do limoneno (linhas) para as linhagens LB-HORT e LB-MANJ. As setas indicam a adição de limoneno durante a biotransformação. As condições experimentais estão descritas na figura 4.

A formação de monoterpenos epóxidos e diols também foi observada em quantidades menores durante a biotransformação de limoneno (Figura 4). Estudos anteriores comprovaram que os compostos epóxidos são intermediários da degradação de limoneno ao diol correspondente (van der Werf *et al.* 1999, Abraham *et al.* 1986). O fungo *Rhodococcus erythropolis* foi capaz de epoxidar a dupla ligação 1,2 do anel pela ação de uma monooxigenase, formando limoneno-1,2-epóxido, que por sua vez, foi hidrolisado a limoneno-1,2-diol pela ação de uma enzima hidroxilase (Van der Werf *et al.* 1999).

3.2.2. Biotransformação de α -Pineno

A biodegradação do α -pineno pode resultar na produção de diversos compostos voláteis dependendo da posição de reação na molécula e da rota metabólica usada pelo micro-organismo (Bicas *et al.* 2008). Dentre as linhagens capazes de usar monoterpenos como fonte de carbono e energia, 7 micro-organismos foram capazes de acumular

compostos intermediários da degradação de α -pineno, sendo que a formação de verbenol e verbenona caracterizou a principal via metabólica de 5 linhagens (Tabela 3). A verbenona é um dos componentes majoritários do aroma de morango, framboesa e hortelã, assumindo uma nota de cânfora e menta, e por isso é de grande importância para a indústria de alimentos (Ravid *et al.* 1997). Igualmente, o verbenol é um composto altamente valorizado nas indústrias alimentícias e na medicina por apresentar notas de cânfor e menta (Vidya e Agrawal 2003).

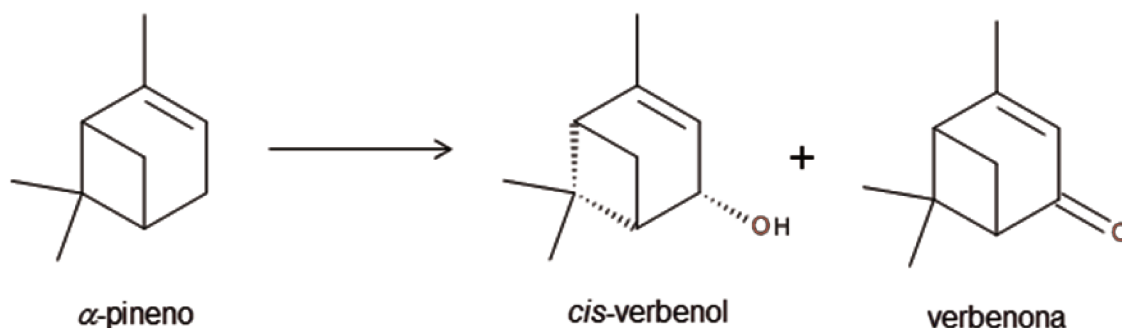


Figura 6. Biotransformação de α -pineno a *cis*-verbenol e verbenona.

As reações ocorreram principalmente pela oxidação na posição alílica resultando em *cis*-verbenol, seguido de lenta oxidação a verbenona (Figura 6). Outros estudos também mostraram rota metabólica similar da degradação do α -pineno por fungos (Prema e Battacharyya 1962a, Draczynska *et al.* 1985, Van Dyk *et al.* 1998, Agrawal *et al.* 1999, Agrawal and Joseph 2000, Rozenbaum *et al.* 2006) e *Serratia marcescens* (Wright *et al.* 1986). As concentrações de *cis*-verbenol e verbenona obtidas pelas linhagens isoladas foram relativamente baixas, em torno de 7 mg/L e 2,2 mg/L, respectivamente (Tabela 3). O aumento da formação de verbenona ocorreu após 24 h de fermentação a 30°C e 150 rpm para a maioria das linhagens, exceto a LB-HORT que ocorreu nas primeiras horas. A linhagem LB-L1B2P atingiu a maior concentração de verbenona (Figura 7). Outros estudos similares relataram a degradação de α -pineno em *trans*-verbenol e verbenona em concentrações de apenas 4 mg/L e 6 mg/L por basidiomicetos (Busmann e Berger 1994), ou até 0,4 g/L e 0,3 g/L por *Hormonema* sp. (Van Dyk *et al.* 1998).

No presente trabalho ainda pode ser observada a formação de outros compostos como mirtenol, pinocarveol, pinocarvona, limoneno, óxido de α -pineno, e β -pineno também

foi observado utilizando diferentes linhagens. Em um estudo similar, os mesmos compostos mostrados na terceira coluna da Tabela 3 (exceto óxido de α -pineno) também foram identificados como metabólitos secundários durante a incubação de células de *Bacillus pallidus* BR425 com α -pineno, sendo carveol e carvona os compostos majoritários (Savithiry *et al.* 1998). Neste caso, as concentrações desses produtos foram significativamente aumentadas quando a bactéria foi submetida a incubação bifásica, enquanto, ao contrário, a carvona foi reduzida a quantidades traços (Savithiry *et al.* 1998).

Tabela 3. Produtos da biotransformação do α -pineno por linhagens de *Pseudomonas*. Condições experimentais estão descritas na Figura 7.

Linhagem	<i>cis</i> -Verbenol (mg/L)	Verbenona (mg/L)	Outros produtos de bioconversão
LB-L1B2P	5,63	2,18	pinocarvona, mirtenol, terpinolene
LB-HORT	6,46	1,92	óxido de α -pineno, β -pineno, limoneno, pinocarvona, mirtenol
LB-MANJ	-	-	limoneno, mirtenol
LB-SFC32P	6,04	2,00	isopinocarveol, mirtenol
LB-CP7P	6,78	1,46	-
LB-CP6P	-	-	β -pineno
LB-L1C1P	4,17	1,74	limoneno, verbenona, β -pineno
BRANCO	1,3	1,05	isopinocarveol

Os resultados apresentados neste trabalho para conversão de α -pineno estão de acordo com outros estudos em que rotas metabólicas similares foram descritas pelo uso de cultura de células vegetais de *Picea abies* em biotransformação de α -pineno com altas taxas de conversão a *trans*-verbenol, além de outros compostos predominantes como *cis*-verbenol, verbenona, *trans*-pinocarveol, mirtenol e α -terpineol (Lindmark-Henriksson *et al.* 2003).

Células em repouso de *Pseudomonas putida* também foram capazes de converter α -pineno em verbenol (35%), dihidrocarveol acetato (20%) e verbenona (10%) (Divyashree *et al.* 2006). Mirtenol e pinocarveol foram identificados como produtos minoritários da degradação de α -pineno por células de *Catharanthus roseus*, em que o α -terpineol foi obtido como principal composto (Petersen 2006). Em estudos anteriores, a observação de múltiplos metabólitos da oxidação do α -pineno foi explicado pela existência de múltiplas rotas metabólicas no micro-organismo ou pela capacidade da mesma enzima em oxidar mais de uma posição na molécula de α -pineno (Savithiry *et al.* 1998, Shukla e Bhattacharyya 1968, Dhavlikar *et al.* 1966).

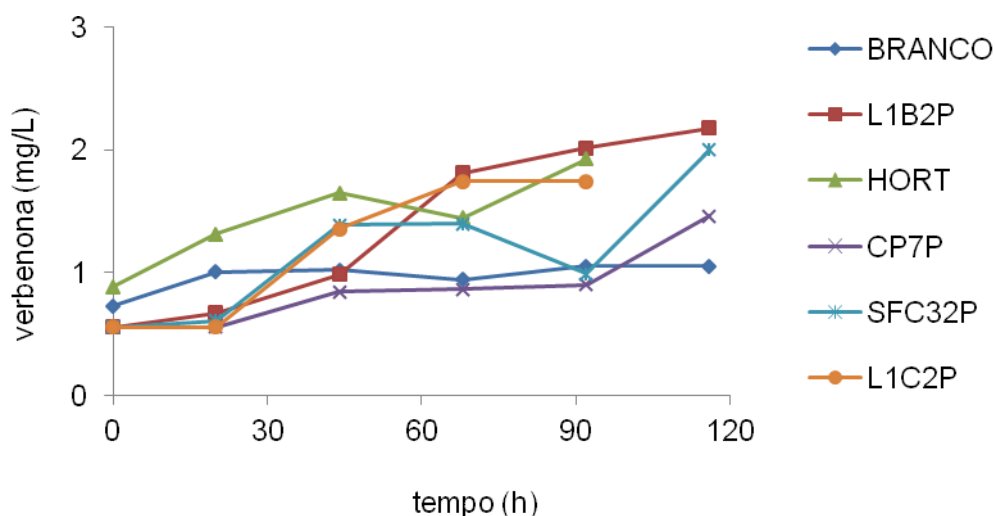


Figura 7. Produção de verbenona durante a biotransformação de α -pineno (pH não ajustado). Condições de fermentação: a cultura previamente crescida em meio MBP foi centrifugada, e a biomassa resultante foi transferida para tampão fosfato de potássio contendo 0,5% de terpeno como única fonte de carbono e incubada a 30°C e 150 rpm por 112 h.

Os produtos *cis*-verbenol e verbenona também foram identificados na amostra controle como produtos de auto-oxidação, porém em concentrações muito menores em comparação ao produzido pelos micro-organismos nas mesmas condições e tempo e não foi observado um aumento desses compostos ao longo do tempo (Figura 7). O isopinocarveol também foi detectado na amostra controle. Esse resultado está de acordo com os resultados apresentados por Lindmark-Henriksson *et al.* (2003) e Rothenberg *et al.* (1998), que também detectaram produtos de auto-oxidação quando o α -pineno foi colocado em meio nutriente

mas em concentrações muito menores ao produzido pelo micro-organismo. A auto-oxidação de α -pineno já vem sendo reportada na literatura desde a década de 60, e a identificação de verbenol, verbenona e sobrerol foi relatada entre os produtos de auto-oxidação (Battacharyya *et al.* 1960).

3.2.3. Biotransformação de Citronelol

A linhagem LB-L1B2P degradou o citronelol por uma via metabólica diferente das linhagens LB-HORT e LB-LARP3 (Figura 8). A linhagem LB-L1B2P foi capaz de degradar o citronelol a *cis*- e *trans*-óxido de rosa, com uma concentração total de óxido de rosa produzido atingindo valores de aproximadamente 30 mg/L. A produção de óxido de rosa é muito interessante do ponto de vista econômico pois aumenta o valor agregado de seu precursor, já que o valor de mercado do óxido de rosa é 25 vezes maior do que o do citronelol, de 0,27 a 17,60 \$/mL. Assim, a produção do óxido de rosa pela linhagem LB-L1B2P foi estudada separadamente e descrita com maiores detalhes no terceiro capítulo da dissertação que configurou um artigo já publicado, e por isso não será contemplada nos próximos itens.

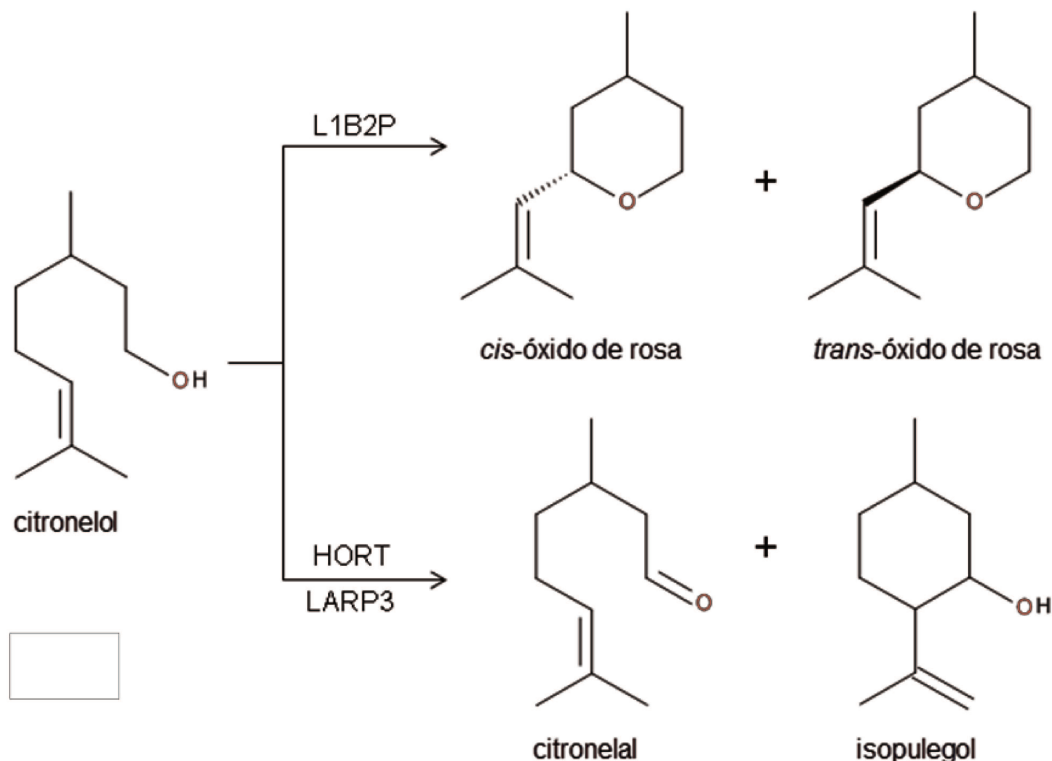


Figura 8. Biotransformação de citronelol pelas linhagens L1B2P, HORT e LARP3.

Por outro lado, o acúmulo de isopulegol e citronelal foi observado durante a biotransformação de citronelol pelas linhagens LB-HORT e LB-LARP3. A quantificação desses compostos foi baseada na curva de calibração do citronelol, sendo construída com diferentes concentrações deste substrato (0.05...a...). A maior concentração de isopulegol foi observada pela linhagem LB-LARP3, em torno de 50,68 mg/L (relativo a concentração de citronelol), e a maior concentração de citronelal foi obtida pela linhagem LB-HORT, em torno de 7,95 mg/L (relativo a concentração de citronelol) (Tabela 4). A cinética da biotransformação de citronelol foi acompanhada até 120 h, e observou-se que a linhagem LB-LARP3 acumulou isopulegol logo no início da fermentação com um pico em 24 h, enquanto o citronelal foi detectado no meio de biotransformação mas não apresentou um aumento ao longo da biotransformação. A linhagem LB-HORT, por sua vez, acumulou progressivamente ambos produtos isopulegol e citronelal, atingindo a concentração máxima em 72 h de biotransformação (Figura 9).

Tabela 4. Produção de compostos derivados do citronelol após 120 horas de biotransformação.

Linhagem	óxido de rosa (mg/L) <i>cis</i> e <i>trans</i> isômeros	β -citronelal (mg/L relative ao citronelol)	isopulegol (mg/L relative ao citronelol)
LB-L1B2P	29,67	-	-
LB-LARP3	-	1.53	50,68
LB-HORT	-	7.65	39,37

O acúmulo de citronelal como intermediário da degradação de citronelol está de acordo com resultados previamente relatados por bactérias do mesmo gênero, *P. aeruginosa* e *P. citronellolis* (Díaz-Pérez *et al.* 2004, Förster-Fromme *et al.* 2006, Förster-Fromme *et al.* 2010), o que pode indicar que as linhagens LB-HORT e LB-LARP3 usam a mesma rota catabólica descrita para essas bactérias (Figura 8). Segundo Förster-Fromme *et al.* (2006), o gene *AtuB* é responsável por codificar a primeira enzima da rota catabólica do citronelol, a citronelol desidrogenase, responsável por oxidar citronelol ao aldeído citronelal. No entanto,

o ácido citronílico é rapidamente formado a partir do citrônol, e é acumulado como produto da degradação de citrônol por linhagens de *Pseudomonas* (Tozoni *et al.* 2010, Förster-Fromme *et al.* 2010, Höschle *et al.* 2005, Aguilar *et al.* 2006).

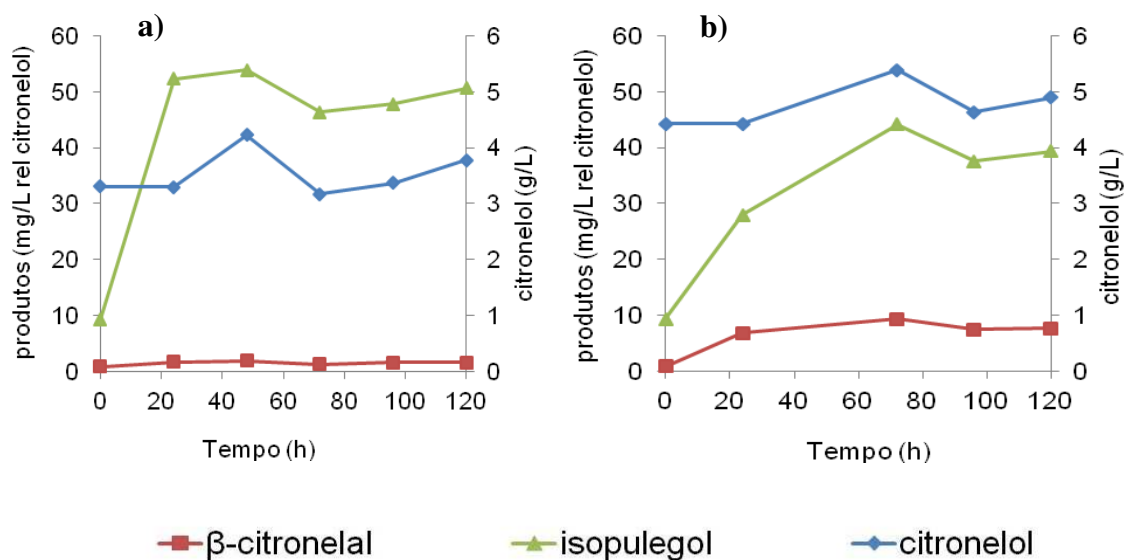


Figura 9. Biotransformação do citrônol e formação de β -citrônol e isopulegol pelas linhagens LB-LARP3 (a) e LB-HORT (b), durante fermentação a 30°C e 150 rpm. A concentração do isopulegol foi obtida relativo ao citrônol. Condições de fermentação: a cultura previamente crescida em meio MBP foi centrifugada, e a biomassa resultante foi transferida para tampão fosfato de potássio contendo 0,5% de terpeno como única fonte de carbono e incubada a 30°C e 150 rpm por 112 h.

A formação de isopulegol foi identificada no início da fermentação para ambas as linhagens, com um pico de produção que atingiu valores superiores a 50 mg/L em apenas 24 h pela linhagem HORT. Isopulegol pertence à família dos *p*-menthanes por apresentar o mesmo esqueleto carbônico, e podem existir na forma de 8 isômeros cuja mistura é convencionalmente utilizada como ingrediente em perfumaria, sendo que um dos principais componentes (-)-isopulegol é inodoro mas pode ser usada como um “cooling agent” (Serra *et al.* 2005). A formação de isopulegol através da ciclização de citrônol (substrato utilizado) é mais comumente citada e já foi relatada pelo uso de células vegetais de *Solanum aviculare* (Vanek *et al.* 2003), e fungos *Penicillium digitatum* (Babicka *et al.* 1955), e *Candida*

reukaufii (Kieslich *et al.* 1986). A formação de compostos como pulegol e isopulegol, seguido de hidrogenação a mentol por *Penicillium digitatum*, foi patenteado em 1952 por Babicka e colaboradores (1955).

O uso de citrônolol como substrato, por sua vez, já resultou em produtos como isopulegol por linhagens de *B.cinerea* (Brunerie *et al.* 1987), no entanto esse composto foi pouco citado na literatura como produto de biotransformação de citrônolol. Uma das primeiras publicações em biotransformação de citrônolol por *B. Cinerea* (Brunerie *et al.* 1987), resultou na formação de (E)-2,6-dimethyl-2-octene-1,8-diol e produto reduzido 2,6-dimethyl-1,8-octanediol, como produtos principais. Menores quantidades de isopulegol e outros metabólitos minoritários foram identificados.

A figura 10 mostra um exemplo de cromatograma com a formação de isopulegol e citrônolal derivados do citrônolol, em comparação com a amostra controle. Os produtos isopulegol e citrônolal foram detectados em concentrações traços no controle (ausência de micro-organismo), o que comprova que os produtos formados são oriundos do processo de biotransformação e não da auto-oxidação do substrato.

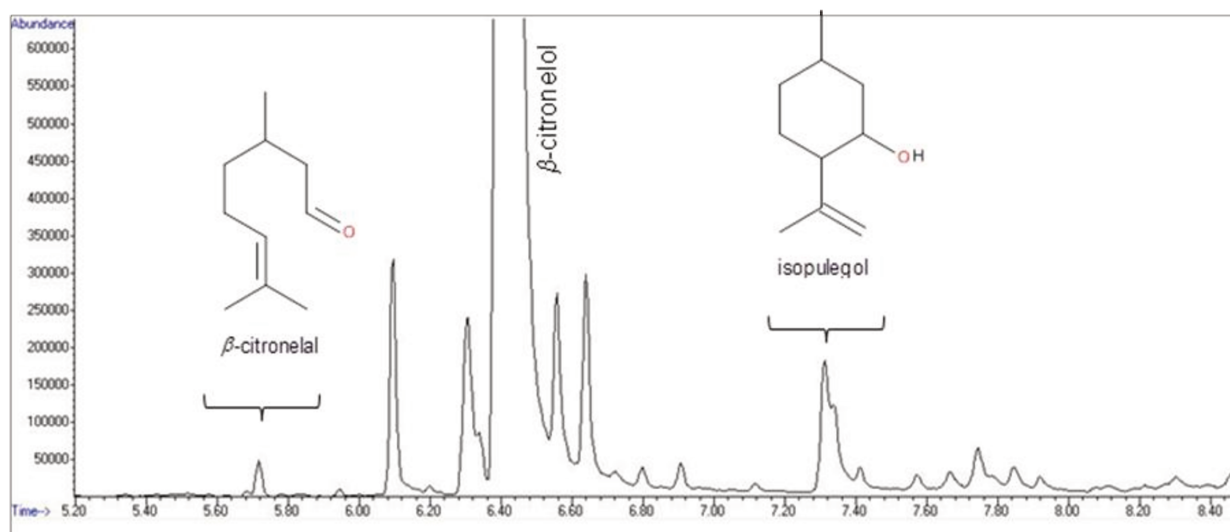


Figura 10. Cromatograma da biotransformação de β -citrônolol em β -citrônolal e isopulegol, pela linhagem HORT, após 120 horas de fermentação a 30°C e 150 rpm. Condições de fermentação estão descritas na Figura 9.

3.3. Efeito da variação do pH do meio de biotransformação

A variação do pH do meio de biotransformação foi avaliada por ser considerada uma variável importante e limitante para a sobrevivência e desenvolvimento de microorganismos do gênero *Pseudomonas*. A faixa de pH estudada foi entre 6.5 e 7.5 pelo fato de que uma grande variação de pH pode ser adversa ao crescimento satisfatório de bactérias desse gênero, que sobrevivem sobretudo a pH neutro, uma das poucas restrições desse gênero.

Outros fatores como a pressão osmótica e temperaturas muito elevadas também são desfavoráveis para seu crescimento, no entanto são pouco prováveis no presente processo, e por isso foram descartadas para avaliação nesse primeiro momento (Grimont 1998). Além disso, de forma geral, linhagens de *Pseudomonas* tem bom desenvolvimento em condições bem versáteis de temperatura (entre 4°C e 43°C), ambiente e fontes de nutrição, o que contribui para sua proliferação nos locais mais variados ou com alguma privação de nutrientes (Grimont 1998).

Essa avaliação de pH foi aplicada apenas às linhagens que apresentaram maior concentração de produtos a partir de cada um dos substratos. O crescimento microbiano foi acompanhado através de leitura em espectrofotômetro, assim como a concentração dos produtos e substrato remanescente no meio de cultura ao longo do tempo da biotransformação.

3.3.1. Crescimento microbiano

O crescimento celular durante a fase de biotransformação em pH 6,5, 7,0 e 7,5 foi avaliado pela leitura em triplicata de alíquotas da cultura submersa em espectrofotômetro a 600 nm ao longo de toda a fermentação. Para efeito de comparação entre os diferentes pH, as culturas previamente crescidas foram padronizadas a uma densidade óptica em torno de 3,00 ($DO_{600}=3,00$) para serem aplicadas à fase de biotransformação. Em artigo publicado por Tozoni *et al.* (2010), a avaliação do crescimento bacteriano em diferentes monoterpenóides também foi realizado através de leitura por absorbância a 580 nm.

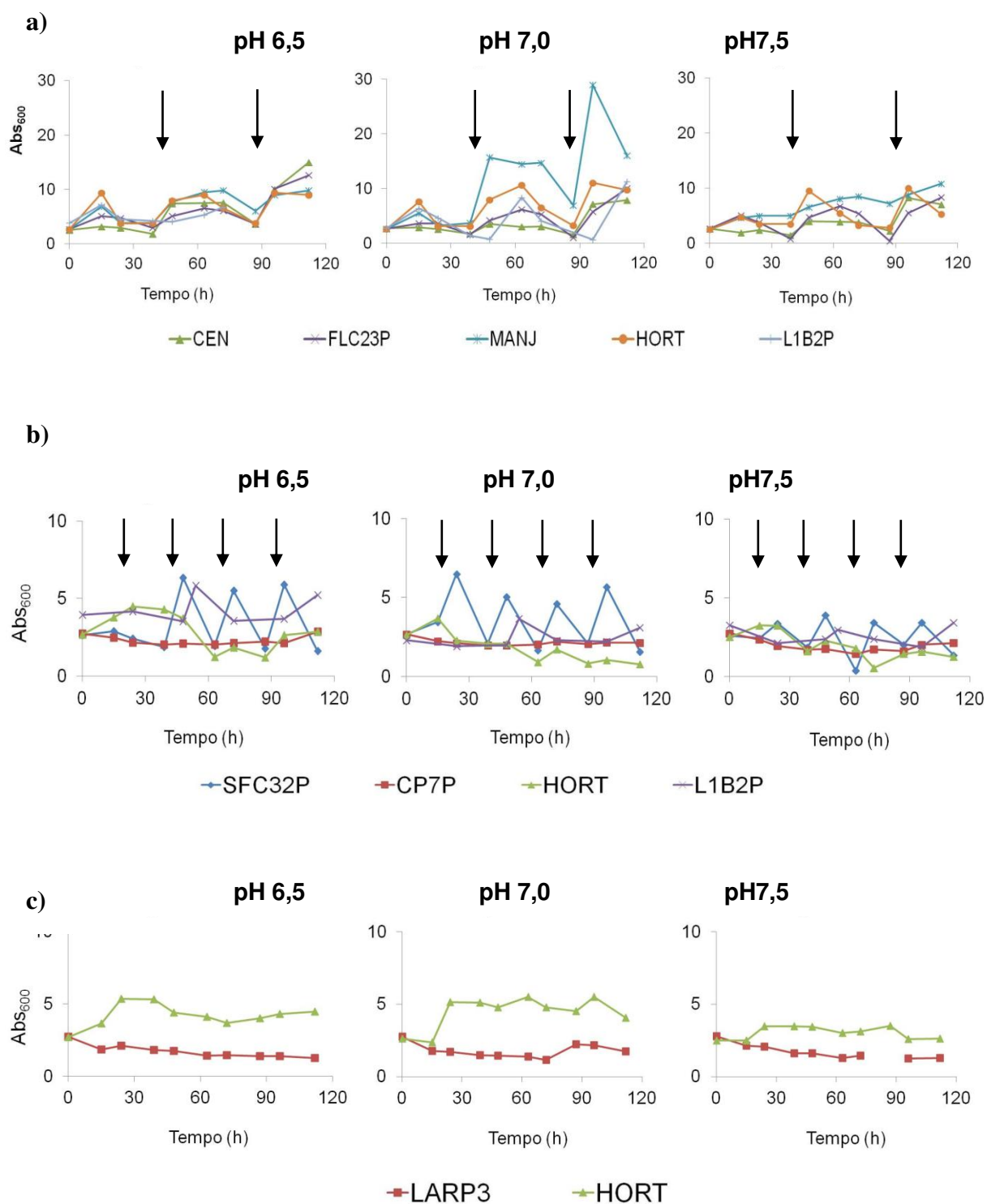


Figura 11. Crescimento microbiano durante fermentação em meio contendo 0,5% de limoneno (a), α -pineno (b), ou citrônolol (c) como única fonte de carbono. As setas indicam a reaplicação de terpeno ao longo da biotransformação. Condições de fermentação: a cultura previamente crescida em 200 mL de meio MBP foi centrifugada, e a biomassa resultante

(DO₆₀₀=3,00) foi transferida para três erlenmeyers contendo 50 mL de Tampão Fosfato de Potássio com diferentes pH (6,5, 7,0 e 7,5). Para biotransformação, foi adicionado 0,5% de terpeno como única fonte de carbono e mantido a 30°C e 150 rpm por 112 h.

A reaplicação do substrato ao meio de cultura durante a biotransformação provocou picos de crescimento microbiano de quase todas as linhagens crescidas em limoneno e α -pineno (Figura 11a e 11b). A reaplicação de citrônolol ao longo da fermentação não foi necessária devido a menor perda por volatilidade em comparação com os outros terpenos utilizados. A diferença de pH do meio de biotransformação não foi um fator limitante ao crescimento das linhagens, porém algumas apresentaram melhor adaptação ao meio a determinado pH, como a LB-L1B2P que cresceu três vezes mais em meio a pH 7,0 contendo limoneno como única fonte de carbono (Figura 11a).

Em meio contendo α -pineno como única fonte de carbono, o pH 7,5 apresentou o menor crescimento microbiano para todas as linhagens, sendo que LB-L1B2P e LB-HORT tiveram um crescimento celular mais satisfatório a pH 6,5, e LB-SFC32P iniciou crescimento celular mais rápido a pH 7,0 (Figura 11b). O mesmo foi observado para o meio contendo citrônolol, em que os pH 6,5 e 7,0 foram melhores para o crescimento de LB-HORT (Figura 11c). As linhagens LB-CP7P crescida em α -pineno e LB-LARP3 crescida em citrônolol não apresentaram uma evolução em relação ao crescimento celular, assim como pouca diferença em relação a variação do pH.

3.3.2. Formação de produtos em diferentes valores de pH

3.3.2.1. Limoneno

A linhagem LB-L1B2P apresentou concentrações maiores de *cis*- e *trans*-carveol quando submetida ao meio de biotransformação a pH 7,0, o que está coerente com o maior crescimento celular no mesmo pH apresentado anteriormente, apesar de a concentração de carvona ter sido menor. Embora a variação do pH não tenha influenciado o crescimento celular de LB-MANJ, o pH 7,5 foi mais satisfatório na formação dos produtos de bioconversão *cis*- e *trans*-carveol e carvona por essa linhagem, com aumento de 29%, 33% e 22% respectivamente, em comparação com o pH 6,5 (Tabela 5). Observou-se que os

diferentes valores de pH impactaram pouco na formação dos produtos pelas linhagens LB-CEN, LB-FLC32P e LB-HORT, assim como no crescimento celular.

Tabela 5. Concentração máxima de *cis*-carveol, *trans*-carveol e carvona derivados da biotransformação de limoneno em pH 6,5 a 7,5, após 112 h de fermentação. Condições de fermentação estão descritas na Figura 11.

Linhagem	Produtos (mg/L)	pH 6,5	pH 7,0	pH 7,5
LB-HORT	<i>cis</i> -carveol	366,95	327,88	365,63
	<i>trans</i> -carveol	227,46	205,77	246,13
	Carvona	193,04	179,24	188,01
LB-MANJ	<i>cis</i> -carveol	292,37	321,88	412,05
	<i>trans</i> -carveol	183,43	202,07	275,43
	Carvona	161,38	179,41	209,10
LB-L1B2P	<i>cis</i> -carveol	202,26	229,65	205,08
	<i>trans</i> -carveol	125,50	146,00	120,89
	Carvona	105,95	77,62	103,95
LB-CEN	<i>cis</i> -carveol	186,33	190,51	190,65
	<i>trans</i> -carveol	97,31	93,92	96,87
	Carvona	24,83	27,09	28,37
LB-FLC32P	<i>cis</i> -carveol	122,06	121,44	129,58
	<i>trans</i> -carveol	65,75	64,49	69,29
	Carvona	56,38	54,18	60,28

3.3.2.2. α -Pineno

Os compostos *cis*-verbenol e verbenona apresentaram concentrações maiores a pH 6,5 para as linhagens LB-HORT, LB-CP7P e LB-L1B2P (Tabela 6). Os produtos não foram encontrados quando LB-L1B2P foi crescida em meio a pH 7,0, da mesma forma que o aumento do crescimento microbiano também não foi observado. Por outro lado, a linhagem LB-SFC32P apresentou concentrações maiores de ambos produtos à pH 7,0, e esse resultado condiz com o aumento do crescimento microbiano logo após a adição do terpeno e foi mantido ao longo do tempo a medida que o substrato era reaplicado.

Tabela 6. Concentração máxima de verbenona e verbenol derivado da biotransformação de α -pineno em pH 6,5 a 7,5. Condições de fermentação estão descritas na Figura 11.

Linhagem	Produtos (mg/L)	pH 6,5	pH 7,0	pH 7,5
LB-HORT	<i>cis</i> -verbenol	9,68	9,53	6,46
	verbenona	3,03	3,03	0,5
LB-CP7P	<i>cis</i> -verbenol	9,45	7,10	6,78
	verbenona	1,66	1,29	1,46
LB-SFC32P	<i>cis</i> -verbenol	6,34	8,84	5,58
	verbenona	2,25	3,03	2,00
LB-L1B2P	<i>cis</i> -verbenol	7,87	n.d.	5,63
	verbenona	2,35	n.d.	2,01

3.3.2.3. Citronelol

A variação do pH do meio de biotransformação provocou diferenças muito pequenas na formação de isopulegol pelas linhagens LB-HORT e LB-LARP3. Com o melhor desenvolvimento celular de LB-HORT em meio com pH 6,5 e 7,0, a concentração de

isopulegol também foi maior nessa faixa de pH, ainda que discretamente. No caso de LB-LARP3, a produção de isopulegol foi maior em pH 7,0 e 7,5 (Tabela 7).

Tabela 7. Concentração máxima de isopulegol derivado da biotransformação de citrônol em pH 6,5 a 7,5. Condições de fermentação estão descritas na Figura 11.

Linhagem	Produtos (mg/L rel ao citrônol)	pH 6,5	pH 7,0	pH 7,5
LB-HORT	Isopulegol	38,77	39,37	36,62
	β -citrônol	7,94	9,28	5,52
LB-LARP3	isopulegol	53,92	63,31	65,40
	β -citrônol	1,88	1,57	1,88

3.4. Efeito da indução das linhagens na formação dos produtos

As mesmas linhagens descritas no item anterior, que tinham apresentado melhores resultados na formação de produtos, também foram submetidas a uma etapa de indução. Essa etapa foi realizada com o intuito de adaptar as células microbianas ao substrato, de forma a diminuir a toxicidade do terpeno durante o processo de biotransformação de fato. Em estudos biotecnológicos para produção de compostos de aroma através da biotransformação por micro-organismos, a toxicidade do substrato e do produto acumulado frequentemente representa limitações na tentativa de elevação de escala da produção (Limberger *et al.* 2007). O parâmetro $\log P_{ow}$ (coeficiente de partição octanol-água) representa o nível de toxicidade dos solventes orgânicos aos micro-organismos. Substâncias com o $\log P_{ow}$ entre 1-5 geralmente são considerados tóxicos para as células microbianas (Heipieper *et al.* 1994). No caso dos monoterpenos em geral, o valor $\log P_{ow}$ fica em torno de 2,5-5,0 como mostra a Tabela 8.

Segundo de Carvalho e colaboradores (2005), a composição da membrana celular pode ser significativamente influenciada pela fonte de carbono utilizada para o cultivo de células. As diferenças resultantes na composição da membrana pode levar as células à

hidrofobicidades diferentes na membrana e, portanto, causar diferenças na capacidade das células em absorver compostos hidrofóbicos/hidrofílicos levando a permeabilidade não específica. Compostos como os terpenóides aumentam a fluidez das membranas de células microbianas, causando perda de integridade celular, decréscimo de matéria seca e inativação da energia metabólica devido à dissipação da força próton motiva (gradiente eletroquímico de H^+ através da membrana) (Onken e Berger 1999a). Além disso, o aumento da fluidez da membrana pode prejudicar a manutenção de complexos enzimáticos ligados à membrana, como o complexo formado pelo citocromo P-450 mono-oxigenase e o NADPH-citocromo P-450 redutase, envolvido nas transformações oxidativas de terpenos e outros compostos lipofílicos (Onken e Berger 1999a).

Tabela 8. Valores de Log P_{ow} de alguns monoterpenos selecionados.

Monoterpeno	Log P_{ow}
α -Pineno	4,49
β -Pineno	4,42
Limoneno	4,83
Citronelol	3,50
Verbenona	2,14
Verbenol	2,55
Carvona	2,26
Carveol	2,82 (<i>cis</i>), 2,55 (<i>trans</i>)
Óxido de rosa	3,19
Isopulegol	2,72

Fonte: Griffin *et al.* (1999), van der Werf *et al.* (1997)

Para evitar ou minimizar a toxicidade dos terpenos às células microbianas, o terpeno pode ser adicionado a cultura de células após o crescimento máximo da biomassa. A adição sequencial de quantidades não-tóxicas do terpeno, a suplementação do substrato pela fase gasosa, ou o uso de um sistema bifásico orgânico-líquido também são medidas que podem prevenir a toxicidade de monoterpenos (Van der Werf *et al.* 1997). Mecanismos de adaptação dos micro-organismos ao substrato são em geral bem conhecidos por diminuir a fluidez da membrana em bactérias causada por solventes tóxicos, e também por manter um equilíbrio apropriado entre os componentes da membrana, e assim melhorar a resistência de micro-organismos a esses compostos (Weber and de Bont, 1996).

No presente trabalho, a etapa de indução foi investigada como uma forma de minimizar o efeito da toxicidade do substrato ao micro-organismo, tornar a célula microbiana mais tolerante a maiores concentrações de substrato e acúmulo de produtos, e assim aumentar a formação de compostos de aromas oriundos do processo de biotransformação. No entanto, a fase de indução não foi positiva nos experimentos apresentados nesse trabalho, visto que a capacidade das linhagens em biotransformar o substrato foi reduzida, comprovado pela diminuição da concentração dos produtos ao empregar as linhagens que passaram pela fase de indução.

Provavelmente, essa inibição da atividade de biotransformação foi devido a toxicidade do substrato provocada pela adição do terpeno durante a fase de crescimento celular. Segundo a metodologia adotada, ¼ da cultura celular previamente crescida ($DO_{600}=3,00$ aprox) em meio de cultura líquido foi transferida para outro meio onde a fonte de carbono foi substituída por 0,3% de terpeno para promover a adaptação das células (adaptado de Bicas et al. 2008). Após a fase de indução, a biomassa foi centrifugada e transferida para o meio de biotransformação, onde foi adicionado 0,5% de terpeno. Assim, é possível que a quantidade de biomassa submersa transferida para o meio de indução não tenha sido suficiente para garantir uma razão biomassa/terpeno adequada de forma que a toxicidade do substrato não provocasse a inibição do crescimento celular e consequentemente da atividade de biotransformação das bactérias. Outro aspecto que pode ter prejudicado a fase de indução é que o terpeno remanescente retido na biomassa após a centrifugação somado à quantidade de terpeno adicionado na biotransformação pode ter extrapolado o nível máximo de substrato tolerável pelas células microbianas.

3.4.1. Limoneno

O limoneno é conhecido por possuir um efeito inibidor em vários micro-organismos, sendo que alguns autores relatam ainda que o limoneno diminui a velocidade do processo de fosforilação oxidativa nas células (Chatterjee e Battacharyya 2001). Diferenças na produção de carvona, *cis*-carveol e *trans*-carveol por linhagens sem indução e por linhagens induzidas podem ser visualizadas nos Gráficos 5a e b, respectivamente. A formação dos produtos derivados da biotransformação do limoneno foi nitidamente reduzida quando as linhagens foram submetidas a fase de indução. Além disso observou-se também um atraso na formação inicial dos compostos pelas linhagens induzidas, por isso a biotransformação nesse caso foi acompanhada por mais tempo. Foi observado que a concentração dos produtos formados ficou estável até em torno de 63 h de fermentação, e foi aumentando lentamente com a reaplicação do limoneno na fase de biotransformação (Figura 6b).

Ao contrário, o experimento sem indução promoveu a formação dos produtos logo no início da biotransformação, que foi aumentada significativamente a medida que o limoneno era reaplicado. Além disso, a concentração final em um período de tempo menor, em torno de 112h, foi visivelmente maior atingindo valores superiores a 200 mg/L de carvona por exemplo (Figura 6a), se comparado aos experimentos com indução que atingiu valores de até 140 mg/L aproximadamente, após quase 222 h de biotransformação.

Foi observado o acúmulo de limoneno nas células microbianas durante a fase de indução após a centrifugação, de aproximadamente 20% e 48% da quantidade inicial adicionada para as linhagens LB-HORT e LB-MANJ, respectivamente. O limoneno remanescente na biomassa somado ao limoneno adicionado na fase de biotransformação pode ter sido inibitório. Bowen (1975) relatou a transformação de limoneno por *P. digitatum* e *P. italicum*, sendo que o último apresentou rendimento de até 80% de conversão com a adição de substrato a 0,5% (v/v), no entanto, a adição de maiores concentrações teve um efeito inibitório.

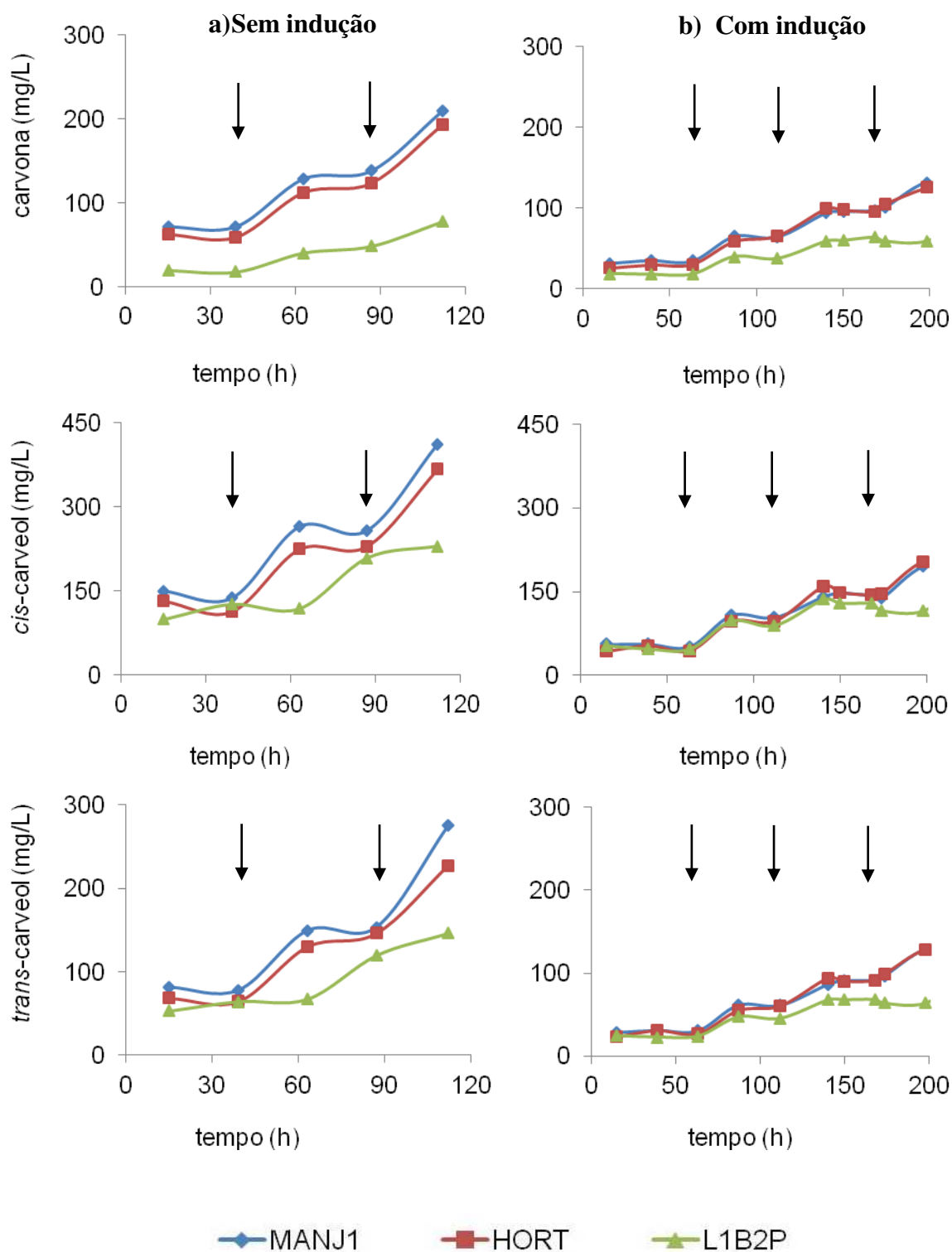


Figura 12. Produção de carvona, *cis*-carvol e *trans*-carveol pelas linhagens MANJ, HORT, L1B2P sem indução (a) e com indução (b). As setas indicam a reaplicação de limoneno ao meio de biotransformação. Condições de fermentação estão descritas na Figura 15.

No entanto, a aplicação da fase de indução foi positiva para a bioconversão de *R*-(+)-limoneno em *cis*- e *trans*-carveol e carvona pelo basidiomiceto *Pleurotus sapidus*, que demonstrou aumento do rendimento dos produtos com o pré-cultivo na presença de limoneno. Em contrapartida, o crescimento microbiano medido pelo peso seco diminuiu após a adição do limoneno durante o crescimento celular, o que significou que o pré-cultivo na presença de limoneno (adaptação das células) não melhorou a capacidade de crescimento do fungo e sua resistência à toxicidade do substrato, ainda que a formação dos produtos tenha sido maior. Esse aumento das concentrações dos produtos após a indução pode ter sido devido a adaptação geral do metabolismo e/ou à indução das enzimas pela presença de limoneno (Onken e Berger, 1999a).

3.4.2. α -Pineno

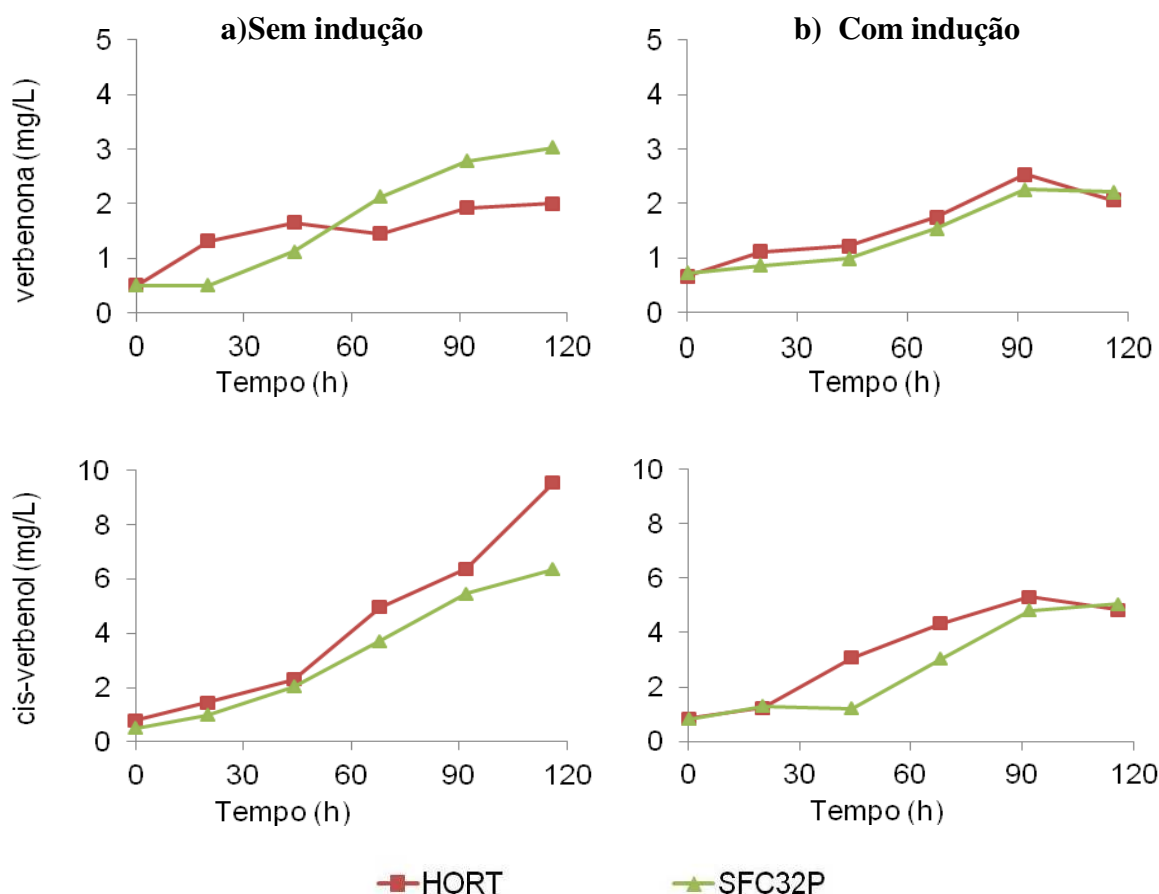


Figura 13. Produção de verbenona e *cis*-verbenol pelas linhagens HORT e SFC32P sem indução (a) e com indução (b). Condições de fermentação estão descritas na Figura 15.

A metodologia publicada por Bicas *et al.* (2008) relata o efeito positivo da adição de substratos terpênicos para o crescimento microbiano na formação de compostos derivados do α -pineno por células frescas e extratos enzimáticos de *P. rhodesiae* e *P. fluorescens*. Nesse caso, o α -pineno, óxido de α -pineno, β -pineno e a terebentina usados como fonte de carbono para o crescimento celular microbiano atuaram como agentes de indução celular para a degradação do α -pineno. No entanto, o mesmo resultado não foi observado pela metodologia utilizada no presente trabalho para indução das linhagens, sendo que a formação de verbenona e *cis*-verbenol pelas linhagens induzidas foi mais tardia e atingiu concentrações menores se comparado às linhagens não induzidas (Figura 13).

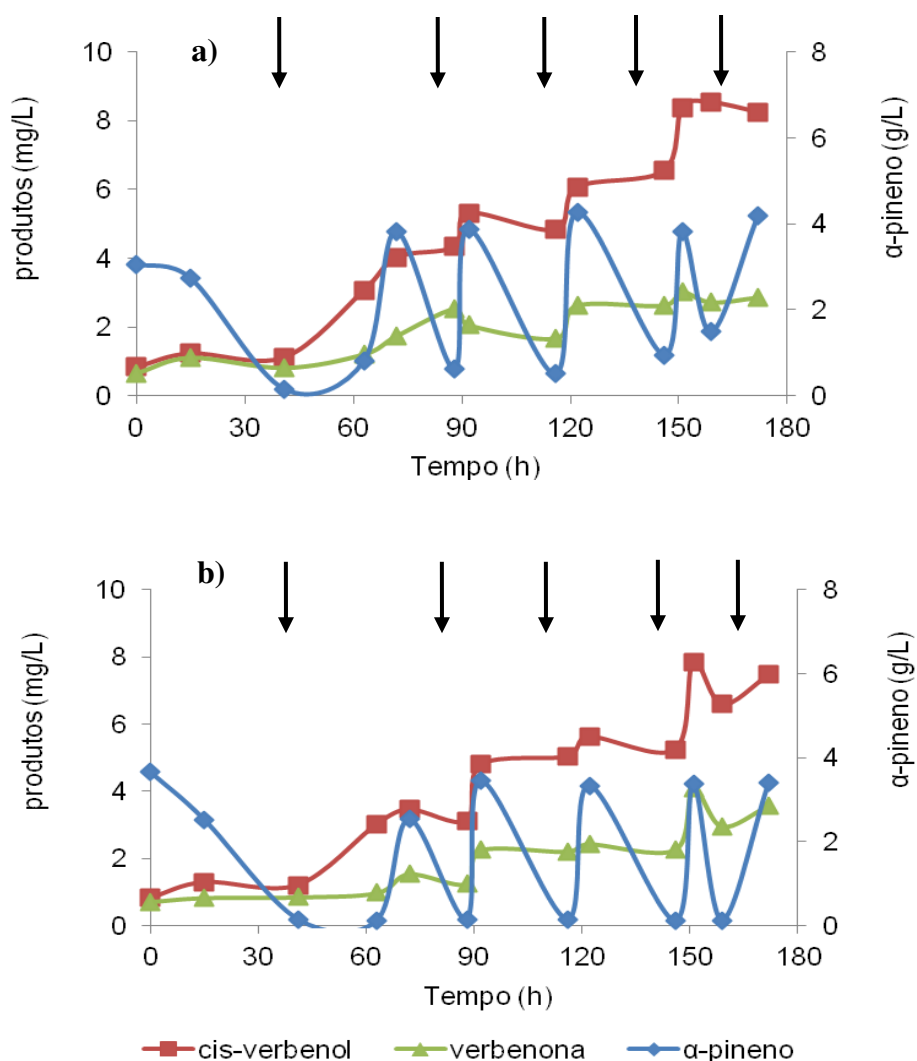


Figura 14. Decaimento do α -pineno e formação de verbenona e *cis*-verbenol pelas linhagens induzidas HORT (a) e SFC32P (b). Condições de fermentação estão descritas na Figura 15.

O decaimento do α -pineno e a formação dos produtos de bioconversão verbenol e verbenona foram acompanhados até o tempo de 120 h (Figura 14). As setas indicam a reaplicação do substrato ao longo do processo para manter o nível suficiente de terpeno. O α -pineno foi reaplicado após 48 h do início da biotransformação pelo fato de ter sido detectado uma quantidade de 55 % de substrato remanescente na biomassa após a centrifugação na fase de indução. Foi observado um aumento na concentração dos produtos a medida que o substrato era reaplicado, o que pode indicar que a redução da quantidade de α -pineno no meio pode ter diminuído a eficiência do processo de biotransformação (Figura 14).

3.4.3. Citronelol

A indução das linhagens na degradação do citronelol e formação de produtos derivados não foi positiva nos experimentos realizados no presente trabalho, possivelmente pela presença de citronelol remanescente na biomassa, em torno de 80%, ao iniciar a fase de biotransformação quando foi adicionado mais 0,5% de substrato ao meio (Figura 15).

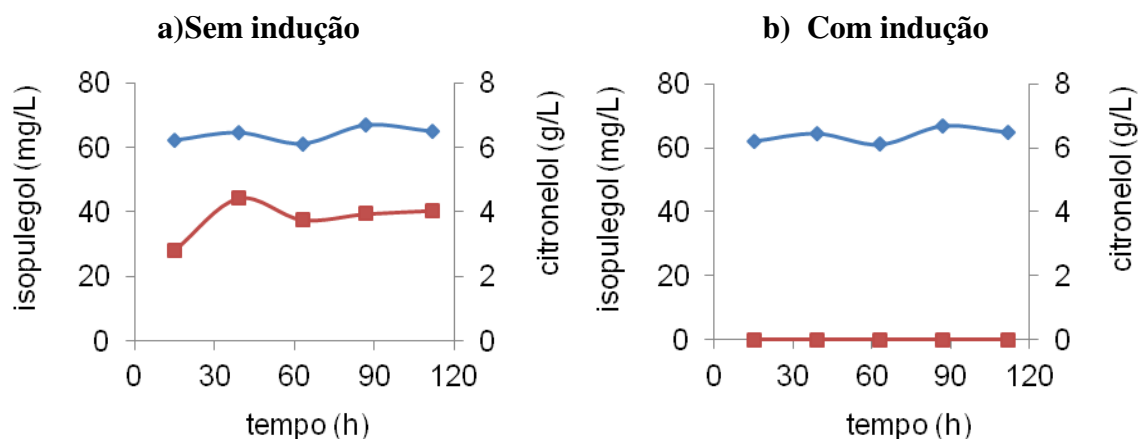


Figura 15. Decaimento do citronelol e produção de isopulegol pela linhagem HORT sem indução (a) e com indução (b). Condições de fermentação: 50 mL da cultura previamente crescida em 200 mL de MBP foi transferida para outro erlenmeyer contendo 150 mL de MBP sem glicose e 0,1% de terpeno para indução das linhagens. Após 24 h, a biomassa foi centrifugada e usada no processo de biotransformação descrito anteriormente.

Experimentos realizados por Tozoni *et al.* (2010) avaliaram o crescimento celular de *P. mendocina* IBPse 105 induzidas com 1 g/L de citrônolol que atingiu seu crescimento máximo em 5 a 7 g/L de citrônolol, e um decréscimo significativo a concentrações mais altas devido ao efeito tóxico de altas doses de monoterpenos que pode ter uma atividade antimicrobiana. No entanto, a linhagem *P. mendocina* IBPse 105 não induzida apresentou uma redução drástica no número de células viáveis ao entrar em contato com citrônolol e citrônolal (1 mg/L) (Tozoni *et al.* 2010).

4. Conclusão

O isolamento de linhagens do gênero *Pseudomonas* resultou na seleção de potenciais biocatalisadores para a biotransformação de monoterpenos. Das 34 linhagens isoladas, 7 bactérias foram capazes de transformar *R*-(+)-limoneno em *cis*- e *trans*-carveol e carvona, sendo a maior concentração obtida em torno de 412 mg/L, 275 mg/L e 209 mg/L respectivamente, após 112 h de fermentação pela linhagem LB-MANJ. α -Pineno, por sua vez, foi usado como fonte de carbono e energia por 7 linhagens e foi convertido em *cis*-verbenol e verbenona a concentrações menores que 10 mg/L por 5 linhagens. Nas outras 2 linhagens, os compostos predominantes foram limoneno, mirtenol e β -pineno. Apenas 3 linhagens foram capazes de metabolizar citrônolol em outros compostos derivados, como óxidos de rosa e isopulegol atingindo concentrações de até 29 mg/L e 50 mg/L, respectivamente. Apesar da comparação dos resultados obtidos usando meios de biotransformação com diferentes valores de pH não ter se mostrado significativa para a maioria das linhagens testadas, observou-se que a linhagem L1B2P triplicou o crescimento celular e aumentou a formação de carveol e carvona em pH 7,0. Todas as linhagens produziram uma concentração maior de metabólitos quando cultivadas sem a fase de indução, possivelmente pelo acúmulo de substrato no meio, que pode ter inibido o crescimento celular e capacidade de bioconversão das linhagens em teste. Etapas subsequentes como a otimização das variáveis do processo (temperatura, agitação, concentração do substrato e do inóculo), uso de meios bifásicos e elevação de escala em bioreator estão previstas para a continuidade deste estudo.

5. Referências bibliográficas

- Abraham, W. R., Stumpf, B., Kieslich, K. 1986. Microbial transformations of terpenoids with 1-*p*-menthene skeleton. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 24, 24-30.
- Acosta, M., Mazas, N., Mejías, E., Pino, J. 1996. Obtencion de aromatizantes mediante biotransformacion del limoneno por *Pseudomonas aeruginosa*. *Alimentaria: Revista de Tecnología e Higiene de los Alimentos*, 272, 73-7.
- Agrawal, R., Deepika Nazhat, U. A., Joseph, R. 1999. Strain improvement of *Aspergillus* sp. and *Penicillium* spp. by induced mutation for biotransformation of pinene to verbenol. *Biotechnology and Bioengineering*, 63, 249–252.
- Aguilar, J. A., Zavala, A. N., Diaz-Perez, C., Cervantes, C. and Diaz-Perez, A. L., Campos-Garcia, J. 2006. The atu and liu clusters are involved in the catabolic pathways for acyclic monoterpenes and leucine in *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Environmental Microbiology*, 72, 2070–2079.
- ARESB 2001. Produção nacional de goma resina de Pinus. Associação dos resinadores do Brasil, disponível em: <http://www.aresb.com.br/estatistica/index.html> Acessado em Julho de 2012.
- Babicka, J., Volf, J., Bebeda, J. 1955. Chech patent 84,320. Source: Chemical Abstracts, 50, 9686.
- Berger, R. G. 1997. Biotechnology of aroma compounds. In: *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 55.
- Berger, R. G. and Lange L. 2004. Flavors and Fragrances. In: *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine*. Tkacz J. S. and Lange L., eds, New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 341-347.
- Best, D.J., N. C. Floyd, A. Magalhaes, A. Burfield, and P. M. Rhodes. 1987. Initial enzymatic step in the degradation of α -pinene by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671. *Biocatalysis*, 1, 147–59.
- Bhattacharyya, P. K., Prema, B. R., Kulkarni, B. D., Pradhan, S. K. 1960. Microbiological transformation of terpenes: hydroxylation of *alpha*-pinene. *Nature*, 187, 689-690.
- Bicas, J. L. 2009. Estudos de obtenção de bioaromas pela biotransformação de compostos terpênicos. Tese de Doutorado, Universidade de Campinas, SP.

- Bicas J. L., Fontanille, P., Pastore, G.M., Larroche, C. 2008. Characterization of monoterpene biotransformation in two pseudomonads. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 1991-2001.
- Bicas, J. L., Fontanille, P., Pastore, G. M., Larroche, C. 2010. A bioprocess for the production of high concentrations of R -(+)- α -terpineol from R -(+)-limonene. *Process Biochemistry*, 45, 4, 481-486.
- Bowen, E. R. 1975. Potential by-products from microbial transformation of d-limonene. *Florida State Horticultural Society*, 304-308.
- Brunerie, P., Benda, I., Bock, G., Schreier, P. 1987. Bioconversion of citronellol by *Botrytis cinerea*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 27, 6-10.
- Busmann, D., Berger, R. G. 1994. Oxyfunctionalization of alpha- and beta-pinene by selected basidiomycetes. *Zeitschrift für Naturforschung. C. A journal of biosciences*, 49e, 545-552.
- Cadwallader K. R., Braddock, R. J., Parish, M. E., Higgins, D. P. 1989. Bioconversion of (+)-limonene by *Pseudomonas gladioli*. *Journal of Food Science*, 54, 1241-1245.
- Cantwell S. G., Lau E. P., Watt D. S., Fall R. R. 1978. Biodegradation of acyclic isoprenoids by *Pseudomonas* species, *Journal of Bacteriology*, 135, 324-333.
- Cheong, T. K., Oriel, P. J. 2000. Cloning and expression of the limonene hydroxylase of *Bacillus stearothermophilus* BR388 and utilization in two-phase limonene conversions. *Applied Biochemical and Biotechnology*, 84, 903-915.
- Chatterjee, T., Bhattacharyya, D. K. 2001. Biotransformation of limonene by *Pseudomonas putida*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55, 541-546.
- Chatterjee, T., De, B. K., Bhattacharyya, D. K. 1999. Bioconversions of citral and (+/-)-citronellal by *Saccharomyces cerevisiae*-2415. *Indian Journal of Chemistry. Section B, Organic including Medicinal*, 38, 1025-1029.
- Crowell, P. L. 1999. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. *Journal of Nutrition*, 129, 775-778.
- de Carvalho, C. C. C. R., van Keulen, F., da Fonseca, M. M. R. 2000. Production and recovery of limonene-1,2-diol and simultaneous resolution of a diastereomeric mixture of limonene-1,2-epoxide with whole cells of *Rhodococcus erythropolis* DCL14. *Biocatalysis and Biotransformation*, 18, 223-235.

- de Carvalho, C. C. C. R., da Fonseca, M. M. R. 2002a. Maintenance of cell viability in the biotransformation of (-)-carveol with whole cells of *Rhodococcus erythropolis*. Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic, 19, 389-398.
- de Carvalho, C. C. C. R., da Fonseca, M. M. R. 2002b. Influence of reactor configuration on the production of carvone from carveol by whole cells of *Rhodococcus erythropolis* DCL14. Journal of Molecular Catalysis. B. Enzymatic, 19, 377-387.
- de Carvalho, C. C. C. R., da Fonseca, M. M. R. 2003. Towards the bio-production of *trans*-carveol and carvone from limonene: induction after cell growth on limonene and toluene. Tetrahedron: Asymmetry, 14, 3925–3931.
- de Carvalho, C. C. C. R., Poretti, A., da Fonseca, M. M. R. 2005. Cell adaptation to solvent, substrate and product: a successful strategy to overcome product inhibition in a bioconversion system. Applied Microbiology and Biotechnology, 69, 268-275.
- de Carvalho, C. C. C. R., da Fonseca, M. M. R. 2006a. Biotransformation of terpenes. Biotechnology Advances, 24, 134–142.
- de Carvalho, C. C. C. R., da Fonseca, M. M. R. 2006b. Carvone: Why and how should one bother to produce this terpene. Food Chemistry, 95, 413–422.
- Demyttenaere, J. C. R., Van Belleghem, K., De Kimpe, N. 2001. Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-limonene by fungi and the use of solid phase microextraction for screening. Phytochemistry, 57, 2, 199-208.
- Demyttenaere, J. C. R., Vanoverschelde, J., De Kimpe, N. 2004. Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-citronellol by *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. and the use of solid phase microextraction for screening. Journal of Chromatography A, 1027, 137-146.
- Dhavalikar, R. S., Bhattacharyya, P. K. 1966. Microbiological Transformations of Terpenes. Part VIII. Fermentation of limonene by a soil Pseudomonad. Indian Journal of Biochemistry, 3, 144-157.
- Dhavalikar, R. S., Rangachari, P. N., Bhattacharyya, P. K. 1966. Microbiological Transformations of Terpenes Part IX. Pathways of degradation of limonene in a soil Pseudomonad. Indian Journal of Biochemistry., 3, 158-163.
- Diaz-Perez, A. L., Zavala-Hernandez, A. N., Cervantes, C., Campos-Garcia, J. 2004. The gnyRDBHAL cluster is involved in acyclic isoprenoid degradation in *Pseudomonas aeruginosa*. Applied Environmental Microbiology, 70, 5102–5110.

- Divyashree, M. S., George, J., Agrawal, R. 2006. Biotransformation of terpenic substrates by resting cells of *Aspergillus niger* and *Pseudomonas putida* isolates. *Journal of Food Science and Technology*, 43, 73–76.
- Draczyńska, B., Cagara, Cz., Siewiński, A., Rymkiewicz, A., Zabza, A., Leufvén, A., 1985. Biotransformation of pinenes; XVII. Transformation of α - and β -pinenes by means of *Armillariella mellea* (honey fungus), a parasite of woodlands. *Journal of Basic Microbiology*, 25, 487–492.
- Duetz, W. A., Bouwmeester, H., van Beilen, J. B., Witholt, B. 2003. Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts, and plants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61, 269-277.
- FAO. 1995. Flavors and fragrances of plant origin – Chapter 8: Turpentine from pine resin. FAO, Rome, Italy. Disponível em <<http://www.fao.org/docrep/V5350E/V5350E00.htm>>. Acessado em: Julho de 2012.
- Ferreira, J. P. R. J. 2001. Análise da cadeia produtiva e estrutura de custos do setor brasileiro de produtos resinosos. Dissertação de Mestrado, ESALQ, USP, Piracicaba, SP - Brasil.
- Fontanille, P., Le Flèche, A., Larroche, C. 2002. *Pseudomonas rhodesiae* PF1: a new and efficient biocatalyst for production of isonovalal from α -pinene oxide. *Biocatalysis and Biotransformation*, 20, 413–421.
- Fontanille, P., Larroche, C. 2003. Optimisation of isonovalal production from α -pinene oxide using permeabilized cells of *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60, 534–540.
- Förster-Fromme, K., Höschle, B., Mack, C., Bott, M., Armbruster, W., Jendrossek, D. 2006. Identification of genes and proteins necessary for catabolism of acyclic terpenes and leucine/isovalerate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Environmental Microbiology*, 72, 4819-4828.
- Förster-Fromme, K., Jendrossek, D. 2010. Catabolism of citronellol and related acyclic terpenoids in pseudomonads. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 859-869.
- Griffin, S., Wyllie, S. G., Markham, J. 1999. Determination of octanol-water partition coefficient for terpenoids using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A.*, 864, 2, 221-228.

- Grimont, P. A. D. 1998. Taxonomy of the genus *Pseudomonas*. Médecine et Maladies Infectieuses, 28, 65–71.
- Heipieper, H. J, Weber, F. J, Sikkema, J., Keweloh, H., Bont, J. A. M. de. 1994. Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. Trends in Biotechnology, 12, 409-415.
- Höschle, B., Gnau, V., Jendrossek, D. 2005. Methylcrotonyl-CoA and geranyl-CoA carboxylases are involved in leucine/isovalerate utilization (Liu) and in acyclic terpenes utilization (Atu) and are encoded by *liuB/liuD* and *atuC/atuF*, in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology, 151, 3649- 3646.
- Joglekar, S.S, Dhavalikar, R.S. 1969. Microbial transformation of terpenoids. I. Identification of metabolites produced by a pseudomonad from citronellal and citral. Applied Microbiology, 18, 1084.
- Johnson, T. L., Forbes, B. A., O'connor-Scarlet, M., Machinski, A., Mc Clatchey, K. D. 1985. Rapid method of MIC determinations utilizing tetrazolium reduction. American Journal of Clinical Pathology, 83, 3, 374-378.
- Kieslich, K., Abraham, W. R., Stumpf, B., Thede, B. E., Wahausen, P. 1986. Transformations of terpenoids In: Progress in Essential Oil Research. Proceedings of the International Symposium on Essential Oils Ed. Brunke, E.J., Walter de Gruyter, Berlin, 367-394.
- King, E. O., Ward, M. K., Raney, D. E., 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 44, 301-07.
- Limberger, R. P., Aleixo, A. M., Fett-Neto, A. G., Henriques, A. T. 2007. Bioconversion of (+)- and (-)- α -pinene to (+)- and (-)-verbenone by plant cell cultures of *Psychotria brachyceras* and *Rauvolfia sellowii*. Electronic Journal of Biotechnology, 10, 4, 501-507.
- Lindmark-Henriksson, M., Isaksson, D., Sjödin, K., Hogberg, H.-E., Vanek, T., Valterová, I. 2003. Transformation of α -pinene using *Picea abies* suspension culture. Journal of Natural Products, 66, 337-343.
- Madyastha, K. M., Renganathan, V. 1983. Bio-degradation of acetates of geraniol, nerol and citronellol by *P. incognita*: Isolation and identification of metabolites. Indian Journal of Biochemistry and Biophysics., 20, 136–140.
- Maróstica-Jr., M. R., Pastore, G. M. 2007. Biotransformação de limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas. Química Nova, 30, 382-387.

- Maróstica-Jr., M. R., Pastore, G. M., 2006, Biotransformation of citronellol in rose-oxide using cassava wastewater as a medium. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26, 690-696.
- Mazzaro, D. 2000. Orange oil, d-limonene market unsettled due to Brazilian delays. *Chemical Marketing Reports*, 258, 18-22.
- Molina, G. 2010. Prospecção de processos biotecnológicos de interesse industrial. Tese de mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, SP.
- Morrish, J. L. E. 2008. Enhancement of the Microbial Biotransformation of (-)-trans-carveol to (R)-(-)-carvone by *Rhodococcus erythropolis* DCL14 in Various Two Phase Partitioning Bioreactor Configurations. Thesis of Masters degree, Queen's University, Canada.
- Murdock, D. I., Allen, W. E. 1960. Germicidal effect of orange peel oil and d-limonene in water and orange juice. 1. Fungicidal properties against yeast. *Food Technology*, 14, 441-445.
- Noma, Y., Asakawa, Y. 2010. Chapter 14. Biotransformation of monoterpenoids by microorganisms, insects and mammals. In: *Handbook of essential oils*, Baser and Buchbauer Eds., Taylor & Francis Group Publishers, 585-736.
- Noma, Y., Yamasaki, S., Asakawa, Y. 1992. Biotransformation of limonene and related compounds by *Aspergillus cellulosa*. *Phytochemistry*, 31, 8, 2725-2727.
- Oda, S., Ohta, H. 1997. Double coupling of acetyl coenzyme A production and microbial esterification with alcohol acetyltransferase in an interface bioreactor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 83, 423-8.
- Ohara, M.T., Saito, T. 1993. Aplicação do cloreto de trifeniltetrazólio no teste de limite microbiano em medicamentos e cosméticos. *Caderno de Farmácia*, 9, 2, 85-94.
- Onken, J., Berger, R. G. J. 1999a. Effects of R-(+)-limonene on submerged cultures of the terpene transforming basidiomycete *Pleurotus sapidus*. *Journal of Biotechnology*, 69, 163-168.
- Onken, J., Berger, R. G. 1999b. Biotransformation of citronellol by the basidiomycete *Cystoderma carcharias* in an aerated-membrane bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 158-163.
- Peterson, R. Z. 2006. Biotransformação de terpenóides por culturas de células vegetais e fungos filamentosos. Tese de doutorado, Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre.

- Prema, B. R., Bhattacharyya, P. K. 1962a. Microbiological transformation of terpenes. II. Transformations of α -pinene. *Applied Microbiology*, 10, 524–528.
- Rama Devi, J., Bhattacharyya, P. K.. 1978. Molecular rearrangements in the microbiological transformations of terpenes and the chemical logic of microbial processes. *Journal Indian of Chemical Society*, 55, 1131–1137.
- Rapp, A., Mandery, H. 1988. Influence of *Botrytis cinerea* on the monoterpene fraction wine aroma. In: *Bioflavour'87. Analysis - Biochemistry - Biotechnology*, ed. Schreier P., Walter de Gruyter and Co., Berlin, 445–452.
- Ravid, U., Putievsky, E., Katzir, I., Lewinsohn, E., Dudai, N. 1997. Identification of (1*R*)-(+)-verbenone in essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. *Flavours and Fragrances Journal*, 12, 1109-1112.
- Rothenberg, G., Yayziv, Y., Sasson, Y. 1998. Comparative autoxidation of 3-carene and α -pinene: Factors governing regioselective hydrogen abstraction reactions. *Tetrahedron*, 54, 593-598.
- Rozenbaum, H. F., Patitucci, M. L., Antunes, O. A. C. Pereira, N. Jr. 2006. Production of aromas and fragrances through microbial oxidation of monoterpenes. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 23, 273–279.
- Savithiry, N., Gage, D., Fu, W., Oriel, P. 1998. Degradation of pinene by *Bacillus pallidus* BR425. *Biodegradation*, 9, 337–341.
- Schrader, J. 2007. Microbial flavour production. In Berger, R. G. (ed). *Flavours and fragrances - chemistry, bioprocessing, sustainability*. Springer, Heidelberg, 507–574.
- Schrader, J., Berger, R. G. 2001. Biotechnological production of terpenoid flavor and fragrance compounds, In: Rehm H.-J., Reed G. (2nd Ed), *Biotechnology*. Weinheim: Wiley-VHC, 373-422.
- Serra, S., Fuganti, C., Brenna, E. 2005. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. *Trends in Biotechnology*, 23, 193-198.
- Seubert, W., 1960. Degradation of isoprenoid compounds by microorganisms I. Isolation and characterization of an isoprenoid degrading bacterium, *Pseudomonas citronellolis* n. sp. *Journal of Bacteriology*, 79, 426–434.

- Seubert, W., Fass, E. 1964a. Studies on the bacterial degradation of isoprenoids. Iv. The purification and properties of betaisohexenylglutaconyl-CoA-hydratase and beta-hydroxy-beta-isohexenylglutaryl-CoA-lyase. *Biochemistry Z.*, 341, 23–34.
- Seubert, W., Fass, E. 1964b. Studies on the bacterial degradation of isoprenoids.V. The mechanism of isoprenoid degradation, *Biochemistry Z.*, 341, 35–44.
- Seubert, W., Remberger, U. 1963. Studies on the bacterial degradation of isoprenoids. Ii. The role of carbon dioxide. *Biochemistry Z.*, 338, 245–264.
- Seubert, W., Fass, E., Remberger, U. 1963. Studies on the bacterial degradation of isoprenoids. Iii. Purification and properties of geranyl carboxylase. *Biochemistry Z.* 338, 265–275.
- Shukla, O. P., Bhattacharyya, P. K. 1968. Microbiological transformations of terpenes: Part I - pathway of degradation of α - and β -pinene by a soil *Pseudomonad* (PL-strain). *Indian Journal of Biochemistry*, 5, 92-98.
- Shukla, O. P., Moholay, M. N. Bhattacharyya, P. K. 1968. Microbiological transformation of terpenes. X. Fermentation of α - and β -pinenes. *Indian Journal of Biochemistry*, 5, 79–91.
- Speelmans, G., Bijlsma, A., Eggink, G. 1998. Limonene bioconversion to high concentrations of a single and stable product, perillic acid, by a solvent-resistant *Pseudomonas putida* strain. *Applied Microbiology Biotechnology*, 50, 538-544.
- Surburg, H., Panten, J. 2006. *Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses*, 5nd Ed. Wiley-VCH, Weinheim.
- Toniazzo, G., De Oliveira, D., Dariva, C., Oestreicher, E. G. and Antunes, O. A. C. 2005. Biotransformation of (-)- β -pinene by *Aspergillus niger* ATCC 9642. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121–124, 837–844.
- Tozoni, D., Zacaria, J., Vanderlinde, R., Delamare, A. P. L., Echeverrigaray, S. 2010. Degradation of citronellol, citronellal and citronellyl acetate by *Pseudomonas mendocina* IBPse 105. *Journal of Biotechnology*, 13, 1-7.
- Trytek, M., Fiedurek, J. 2005. A novel psychrotrophic fungus, *Mortierella minutissima*, for D-limonene biotransformation. *Biotechnology Letters*, 27, 149–153.

- Van der Werf, M. J., Bont, J. A. M. de, Leak, D. J. 1997. Opportunities in microbial transformation of monoterpenes. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, 55, 147–177.
- Van der Werf, M. J., Swarts, H. J., de Bont, J. A. M. 1999. *Rhodococcus erythropolis* DCL14 contains a novel degradation pathway for limonene. *Applied Environmental Microbiology*, 65, 2092-2102.
- Van Dyk, M. S., Van Rensburg, E. 1998. Hydroxylation of (+)-limonene, (-)- α -pinene and (-)- β -pinene by a *Hormonema* sp. *Biotechnology Letters*, 20, 431-436.
- Vanek, T., Novotný, M., Podlipná, R., Saman, D., Valterová, I. 2003. Biotransformation of citronellal by *Solanum aviculare* suspension cultures: preparation of p-menthane-3,8-diols and determination of their absolute configurations. *Journal of Natural Products*, 9, 1239-41.
- Velankar, H. R., Heble, M.R. 2003. Biotransformation of (L)-citronellal to (L)-citronellol by free and immobilized *Rhodotorula minuta*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 6, 90-103.
- Vidya, C. M., Agrawal, A. 2003. Production of verbenol, a high valued food flavourant from a fusant strain of *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62, 421-422.
- Xu, M., Floyd, H. S., Greth, S. M., Chang, W.-C. L., Lohman, K., Stoyanova, R., Kucera, G. L., Kute, T. E., Willingham, M. C., Miller, M. S. 2004. Perillyl alcohol-mediated inhibition of lung cancer cell line proliferation: potential mechanisms for its chemotherapeutic effects. *Toxicology Applied Pharmacology*, 195, 232–246.
- Weber, F. J., de Bont, J. A. M. 1996. Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1286, 225-245.
- Wright, S. J., Caunt, P., Carter, D. and Baker, P. B. 1986. Microbial oxidation of α -pinene by *Serratia marcescens*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 23, 224–227.
- Yoo, S. K., Day, D. F. 2002. Bacterial metabolism of α - and β -pinene and related monoterpenes by *Pseudomonas* sp. strain PIN. *Process Biochemistry*, 37, 739–745.
- Yoo, S. K., Day, D. F., Cadwallader, K. R. 2001. Bioconversion α - and β -pinene by *Pseudomonas* sp. strain PIN. *Process Biochemistry*, 36, 925–932.

Yuri, T., Danbara, N., Tsujita-Kyutoku, M., Kiyozuka, Y., Senzaki, H., Shikata, N., Kanzaki, H., Tsubura, A. 2004. Perillyl alcohol inhibits human breast cancer cell growth in vitro and in vivo. *Breast Cancer Research and Treatment*, 84, 251–260.

CAPÍTULO 3

ARTIGO PUBLICADO

CHEMICAL ENGINEERING TRANSACTIONS, VOL 27, P. 295-300, 2012

BIOTRANSFORMATION OF CITRONELLOL IN ROSE OXIDE

BY *PSEUDOMONAS* SPP.

BIOTRANSFORMATION OF CITRONELLOL IN ROSE OXIDE BY *PSEUDOMONAS* SPP.

ABSTRACT

Rose oxide, a flavour-impact component, occurs in traces in some essential plant oils, such as Bulgarian rose oil, and it is considered one of the most important fragrance materials in creating rosy notes for perfumery. The biotechnological production of rose oxide by using citronellol as a precursor in biotransformation processes has called particular attention as an alternative to chemical synthesis and extraction from natural sources. The biotransformation of citronellol by strains of *Pseudomonas* spp. was reported in this paper. The main bioconversion products were *cis*- and *trans*-rose oxides, reaching the yield of 29.67 mg/L. In citotoxicity tests, the strain showed impressive terpene resistance, growing under high concentrations of citronellol. Auto-oxidation products were not detected in the control experiments. Thus, rose oxide production by *Pseudomonas* spp. appeared as a promising alternative for commercial production of this bioflavour.

1. Introduction

The flavour industry is definitely moving more towards the natural arena, which is growing faster than synthetic market space, mainly due to the preference of consumers for products or ingredients bearing the label 'natural'. Therefore, the biotechnological production of flavours appears as an interesting alternative to overcome the problems associated to chemical synthesis and extraction from natural sources (Ibdah *et al.*, 2010). Biotransformation has emerged as an advantageous method for production of bioflavors since they proceed under mild conditions, do not generate toxic wastes, and the products can be labelled as 'natural' (Berger, 2009). In addition, bioconversion processes are able to produce compounds not easily prepared by chemical methods (Bicas *et al.*, 2009). Besides, the enzymes are capable of regio- and enantioselective hydrolysis producing enantiomerically pure compounds, which is especially important when optical isomers of a

specific aroma compound exhibit different sensorial properties (Serra *et al.*, 2005, Ibdah *et al.*, 2010).

In this sense, the genus of *Pseudomonas* spp. appears to have great potential as biological agents in microbial transformation of terpenes, since they have few restrictions regarding environmental and nutritional conditions and have been subject of pioneering studies on terpene bioconversion. First studies on biotransformation of terpenes started 40-50 years ago, when Seubert (1960) reported the ability of a strain isolated from soil, *Pseudomonas citronellolis*, to use citronellol as sole carbon source. Strains of *Pseudomonas* including *P. mendocina*, *P. aeruginosa* and *P. fluorescens* were also reported to degrade citronellol (Cantwell *et al.*, 1978, Förster-Fromme and Jendrossek, 2006, Tozoni, 2010). In addition, the catabolic pathway of citronellol in *Pseudomonas* species was investigated and elucidated by several research groups (Seubert *et al.* 1963, Seubert and Remberger 1963, Seubert and Fass 1964a, b, Cantwell *et al.*, 1978, Förster-Fromme and Jendrossek, 2010).

Citronellol (3,7-dimethyl-6-octen-1-ol) is a linear monoterpene alcohol naturally occurring in about 70 essential oils, with prevalence in bulgarian rose oil and geranium oil (Rao *et al.*, 2004, Demyttenaere *et al.*, 2004). This monoterpene is an interesting flavour compound for food and flavour industries due to the presence of floral notes (Schrader and Berger 2001). It is also used as flavor agent in perfumes, cosmetics, detergents, and “biosafe” insect repellents. Citronellol is a natural compound which occurs as two isomeric optical forms. The *R*-(+)-isomer is commonly found in plant essential oils, while *S*-(-)-isomer is a natural constituent of geranium oil and citronella oil (Sousa *et al.*, 2006).

The bioconversion of citronellol led to production of several metabolites (Demyttenaere *et al.*, 2004, Onken and Berger, 1999, Tozoni *et al.*, 2010). However, there is particular interest in the biotechnological production of rose oxide, a high value flavour compound. Rose oxide ((4-methyl-2-(2-methyl-1-propenyl)-tetrahydropyran) is a chiral monoterpene ether found in traces in some essential oils of plants, such as Bulgarian rose, Geranium and Damask rose, and contributes immensely to the unique bloomy-green top notes of these essential oils (Onken and Berger, 1999; Wüst *et al.*, 1998, Babu *et al.*, 2008). Thus the biotechnological production of rose-oxide is especially interesting to flavour industry, since it is one of the most important components in creating rosy notes in perfumery.

The biotransformation of citronellol into rose-oxides, has already been reported and studied for several other microorganisms (Onken and Berger, 1999, Demyttenaere *et al.*, 2004, Maróstica and Pastore, 2006). To the best of our knowledge, bacterial biotransformation from citronellol into high value flavor compounds such as rose oxides by *Pseudomonas* spp. strains has not been published before.

This study investigated the production of rose oxide derived from biotransformation of citronellol by strains of *Pseudomonas* spp.

2. Material and Methods

2.1. Reagents and Standards

(+/-)-Citronellol was supplied by the Sigma-Aldrich Chemical Company and the (+/-)-*cis/trans*-Rose oxides from Fluka. All other chemicals and solvents were of the best available commercial grade.

2.2. Microorganisms and cultivation

Isolation of microorganisms from soil and fruit samples was carried out in selective-differential agar medium for *Pseudomonas*. Samples of soil, fruits and vegetables were incubated in liquid yeast-malt medium (YM: 1.0 % glucose, 0.5 % bacteriological peptone, 0.3 % malt extract, 0.3 % yeast extract) at 30 °C for 24 h. One full loop of 24-h-old cultures were transferred to petri dishes with solid medium agar containing 0.14 % MgCl₂, 1.0 % bacteriological peptone, 0.16 % K₂HPO₄·3H₂O, 1.5 % bacteriological agar and 0.2 % TTC solution (5 % of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride added to distilled water). The TTC was sterilized by filtering through 0.22 µm membrane filters (Millex® - Millipore) and added aseptically to the sterilized medium. The incubation temperature was 30 °C for 24 h. Colonies with purple coloration were selected and inoculated on petri dishes containing selective-differential King's B medium for *Pseudomonas* (KING: 2% proteose peptone n°3, 0.15 % MgSO₄·7H₂O, 1 % glycerol, 2 % bacteriological agar, pH 7.2, adapted from King *et al.*, 1954) and incubated at the same conditions. Single well isolated colonies were picked up for determination of morphology and correct isolation by Gram coloration method.

2.3. Cell culture preparation

Three full loops of a 24-h-old culture on a petri dish were transferred to a 500 mL conical flask containing MBP medium: 0.8 g glucose as carbon source, 0.2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4 mL Hutner solution (Fontanille, 2002), 8 mL of solution A (6.5 g K_2HPO_4 , 8.28 g KH_2PO_4 in 250 mL distilled water) and 188 mL distilled water (Bicas *et al.*, 2008). The incubation conditions were 30 °C and 150 rpm for 24 h.

2.4. Evaluation of terpene citotoxicity

A 5 mL aliquot of 24-h-old culture grown on liquid YM medium was transferred to 250 mL conical flasks containing 45 mL of YM liquid medium and citronellol was added at different concentrations (in %) of 0.1, 0.5, 1.0, 3.0, 7.0, 10.0, and incubated at 30 °C and 150 rpm. After 24 h, a 100 μL aliquot of each culture grown in different concentrations of citronellol were transferred to petri dishes with YM medium agar, and incubated at the same conditions.

2.5. Biotransformation experiments

Screening experiments were performed in order to evaluate the potential of microorganisms in terpene bioconversion. The biotransformation procedure was done by using phosphate buffer with addition of citronellol as carbon source. The cell culture was produced as described above, and the biomass was recovered by centrifuging the culture at 10.000 rpm and 5 °C for 10 min. The resulting biomass was resuspended in 20 mL of phosphate buffer (20 mmol L^{-1} , pH 7.5), and biotransformation was initiated by adding 100 μL citronellol directly in the culture flasks, under sterile conditions. Similarly, chemical blank (without microorganism) was realized to ensure the absence of chemical transformation reactions. After adding citronellol, samples of 500 μL of each culture and blank were periodically taken and extracted with 500 μL of Et_2O (decane was the internal standard), in order to follow the substrate consumption and product formation. This procedure was repeated at 24, 48, 72 and 96 h of experiment.

2.6. Analysis of the samples by GC-MS

The samples were analyzed in a gas chromatograph HP-7890 coupled with a mass spectrometer HP-5975 (GC-MS) (Agilent Technologies) equipped with split-splitless injector and a HP-5 MS capillary column of 30 m x 0.25 mm x 0.25 μm (J&W Scientific, Folsom, California, USA). Helium was the carrier gas, with a constant flow of 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ and split ratio of 1:10. The oven temperature settings used was as follow: initial temperature of 80°C for 2 min, rising at 20 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ until 220 $^{\circ}\text{C}$, then held for 6 min. The temperature in the injector was constant at 250 $^{\circ}\text{C}$. The temperatures of the quadrupole, the ionic source and the GC-MS interface were 150 $^{\circ}\text{C}$, 230 $^{\circ}\text{C}$ and 250 $^{\circ}\text{C}$, respectively. The MS system operated with an electron impact of 70 eV, an acceleration voltage of 1.1 kV, and scan range of m/z 40-500. The products were identified by comparison of their mass spectra and retention indexes with those of reference substances and by comparison with the US National Institute of Standards and Technology (NIST) mass spectral library (Version 2008). Product quantification was performed with a calibration curve at different concentrations of standard.

3. Results and Discussion

More than 34 strains of *Pseudomonas* were isolated from petroleum, soil, fruits and vegetables. All strains selected for biotransformation processes of citronellol were first developed on growth media with indicator and, selected strains produced a red color as a result of the precipitation of formazan following the reduction of TTC. Then the isolates were able to grow in selective-differential KING medium for *Pseudomonas* detection, and identified as Gram-negative bacilli bacterium through Gram coloration method.

The terpene-resistance of selected strain was evaluated in order to investigate the potential of such microorganism to surpass the terpene citotoxicity and eventually low transformation rates by the addition of higher concentrations of substrate. It is known that the toxicity of these terpenoid compounds for the microorganisms is one of the main problems in monoterpene bioconversions (Demyttenaere, 2001). The results demonstrated that the bacteria was able to grow under terpene concentrations ranging from 0.1% to 10%,

showing small differences between them and high resistance against terpene toxicity (Figure 1). This is an important variable for further process optimization.

The selected strains were screened for their ability to convert the substrate (*R*)-(+)- β -citronellol in aroma compounds, under liquid phase fermentation. From the GC-MS analysis of liquid phase extracts of bacterial cultures, it was observed that four strains of *Pseudomonas* spp. were able to grow on citronellol as sole carbon and energy source. Hence, it could be concluded that the given substrate was able to support bacterial growth when using terpene as sole carbon source.

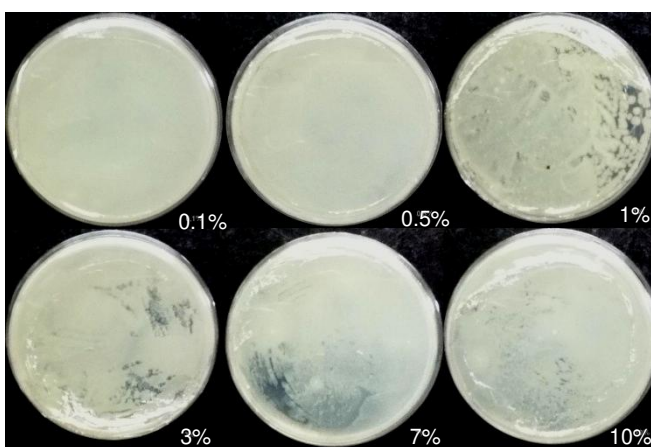


Figure 0-1. Terpene citotoxicity for L1B2P strain under different concentrations of citronellol, ranging from 0.1% to 10%, in YM medium agar.

The L1B2P strain was selected for continuing studies due to high resistance against citronellol toxicity (Figure 1) and higher bioconversion product concentration (Figure 2). It was observed that L1B2P strain converted (*R*)-(+)- β -Citronellol into (+)-*cis*-Rose oxide and (+)-*trans*-Rose oxide, in a *cis/trans* ratio of 65/35. Other derivative products such as dihydrocitronellol and β -Citronellal were identified as minor compounds (Figure 3). The *cis/trans* ratio in favor of *cis*- isomer can be explained by the enzymatic bacterial conversion, but also due to the fact that the *cis*-forms of rose oxide are thermodynamically more stable than the *trans*-forms (Demyttenaere *et al.*, 2004).

The product concentration peaked 1 day after addition of citronellol and then decreased. The oxidation of citronellol started right after the L1B2P strain was supplemented with citronellol, increased considerably over a period of 24 h, and then

decreased rapidly. The *cis*- and *trans*-rose oxide yield reached the concentration of approximately 29.67 mg/L after addition of citronellol. The final pH in the end of biotransformation process was 6.5.

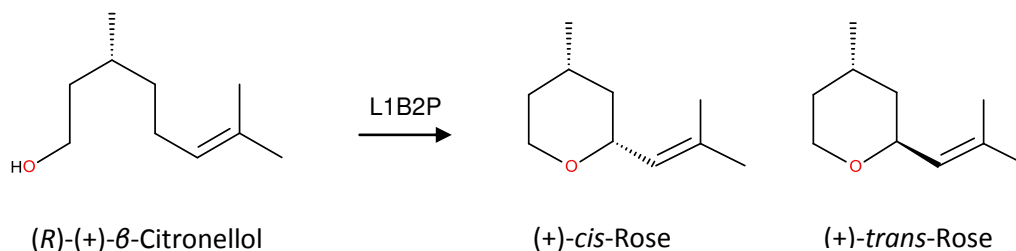


Figure 2. Enantioselective bioconversion of (R)-(+)-β-citronellol to *cis*- and *trans*-rose oxide by the *Pseudomonas* spp. strain L1B2P.

Previous investigations also demonstrated the conversion of citronellol into rose oxide by *Penicillium* sp., at concentrations varying from 30 to 70 mg/L for the *cis*- isomer, and 12 to 31 mg/L for the *trans*- isomer, approximately (Maróstica and Pastore, 2006). The same bioconversion of citronellol was performed by the basidiomycete *Cystoderma carcharias* in an aerated-membrane bioreactor, and rose oxide were detected in amounts of up to 10 mg day⁻¹ (Onken and Berger, 1999).

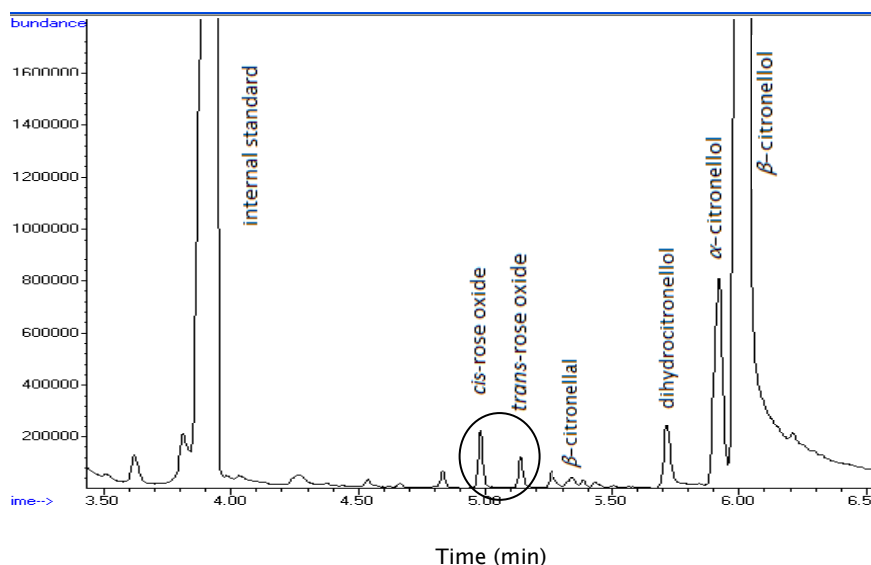


Figure 3. Chromatogram of citronellol degradation and rose oxide production by L1B2P. The biotransformation medium consisted of phosphate buffer and citronellol as sole carbon source.

4. Conclusion

The biotransformation of citronellol resulted in the production of *cis*- and *trans*-rose oxides as the main products. The utilization of the given terpene indicated that a metabolic pathway involving it was actually active in the corresponding bacterial strain. Besides, chemical blanks of the bioconversion experiments clearly indicated that the formation of the biotransformation products was not caused by chemical autoxidation but required an enzymatic step for the formation of *cis*- and *trans*-rose oxides. The selected *Pseudomonas* strain appeared to have impressive resistance in culture medium with high concentration of citronellol, showing great potential for further optimization of citronellol bioconversion. Rose oxide production by *Pseudomonas* spp. appeared as a promising alternative for commercial production of this bioflavour.

5. References

- Babu K.G.D., Singh B., Joshi V.P., Singh V., 2002, Essential oil composition of Damask rose (*Rosa damascena* Mill.) distilled under different pressures and temperatures, *Flav. Fragr. J.* 17, 136-140.
- Berger R.G., 2009, Biotechnology of flavours – the next generation, *Biotechnol. Lett.* 31, 1651-1659.
- Bicas J.L., Dionísio A.P., Pastore G.M., 2009, Bio-oxidation of Terpenes: An Approach for the Flavor Industry 109, 4518-4531.
- Bicas J.L., Fontanille P., Pastore G.M., Larroche C., 2008, Characterization of monoterpene biotransformation in two pseudomonads, *J. Appl. Microbiol.* 105, 1991-2001.
- Cantwell S.G., Lau E.P., Watt D.S., Fall R.R., 1978, Biodegradation of acyclic isoprenoids by *Pseudomonas* species, *J. Bacteriol.* 135, 324–333.
- Demyttenaere J.C.R., 2001, Biotransformation of Terpenoids by Microorganisms. In: Rahman A. (Ed) *Studies in Natural Products Chemistry* 25, 125-178, London: Elsevier.

- Demyttenaere J.C.R., Vanoverschelde J., De Kimpe N., 2004, Biotransformation of (*R*)-(+)- and (*S*)-(-)-citronellol by *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. and the use of solid phase microextraction for screening, J. Chromatogr. A 1027, 137-146.
- Fontanille P., 2002, Biotransformation de α -pinene oxyde en cis-2-methyl-5-isopropylhexa-2,5-dienal (isonovalal) par *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491, PhD Thesis, Université Blaise Pascal, France.
- Förster-Fromme K., Jendrossek D., 2006, Identification and characterization of the acyclic terpene utilization gene cluster of *Pseudomonas citronellolis*, FEMS Microbiol. Lett. 264, 220-5.
- Förster-Fromme K., Jendrossek D., 2010, Catabolism of citronellol and related acyclic terpenoids in pseudomonads, Appl. Microbiol. Biotechnol. 87, 859-869.
- Ibdah M., Lavid N., Lewinson E., Amit A., Dror N., 2010, Green routes to green notes, Chemical Engineering Transactions 20, 241-246.
- King E.O., Ward M.K., Raney D.E., 1954, Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein, J. Lab. Clin. Med. 44, 301-07.
- Maróstica-Jr M.R., Pastore G.M., 2006, Biotransformation of citronellol in rose-oxide using cassava wastewater as a medium, Ciênc. Tecnol. Aliment. 26, 690-696.
- Onken J., Berger R.G., 1999, Biotransformation of citronellol by the basidiomycete *Cystoderma carcharias* in an aerated-membrane bioreactor, Appl. Microbiol. Biotechnol. 51, 158-163.
- Rao B.R.R., Bhattacharya A.K., Mallavarapu G.R., Ramesh S., 2004, Yellowing and crinkling disease and its impact in the yield and composition of the essential oil of citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt.), Flav. Frag. J. 19, 344–350.
- Schrader J., Berger R.G., 2001. Biotechnological production of terpenoid flavor and fragrance compounds, In: Rehm H.-J., Reed G. (2nd Ed), Biotechnology. Weinheim: Wiley-VHC, 373-422.
- Serra S., Fuganti C., Brenna E., 2005, Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances, Trends Biotechnol. 23, 4, 193-198.
- Seubert W., 1960, Degradation of isoprenoid compounds by microorganisms I. Isolation and characterization of an isoprenoid degrading bacterium, *Pseudomonas citronellolis* n.sp., J. Bacteriol. 79, 426–434.

- Seubert W., Fass E., 1964a, Studies on the bacterial degradation of isoprenoids. Iv. The purification and properties of betaisohexenylglutaconyl-CoA-hydratase and beta-hydroxy-beta-isohexenylglutaryl-CoA-lyase, *Biochem. Z.* 341, 23–34.
- Seubert W., Fass E., 1964b, Studies on the bacterial degradation of isoprenoids.V. The mechanism of isoprenoid degradation, *Biochem. Z.* 341, 35–44.
- Seubert W., Remberger U., 1963, Studies on the bacterial degradation of isoprenoids. Ii. The role of carbon dioxide, *Biochem. Z.* 338, 245–264.
- Seubert W., Fass E., Remberger U., 1963, Studies on the bacterial degradation of isoprenoids. Iii. Purification and properties of geranyl carboxylase, *Biochem. Z.* 338, 265–275.
- Sousa D.P., Gonçalves J.C.R., Quintans-Júnior L., Cruz J.S., Araújo D.A.M., Almeida R.N., 2006, Study of anticonvulsant effect of citronellol, a monoterpene alcohol, in rodents, *Neurosci. Lett.* 401, 231–235.
- Tozoni D., Zacaria J., Vanderlinde R., Longaray Delamare A.P., Echeverrigaray S., 2010, Degradation of citronellol, citronellal and citronellyl acetate by *Pseudomonas mendocina* IBPse 105, *Electron. J. Biotechnol.* 13.
- Wüst M., Fuchs S., Rexroth A., Beck T., Mosandl A., 1998, Fragmentation of rose oxide in electron impact mass spectrometry, *Eur. J. Mass Spectrom.* 4, 163-166.

CONCLUSÃO GERAL

A primeira parte da Dissertação compreendeu uma ampla revisão bibliográfica sobre o potencial das *Pseudomonas* spp. na biotransformação de terpenos. O trabalho teve como intuito abordar os exemplos mais importantes e promissores para a produção de compostos de aroma utilizando este gênero de micro-organismos. Devido a importância desta revisão para a área e seu amplo caráter como material de referência, o trabalho foi recentemente submetido a revista científica indexada.

O foco prático desse trabalho foi demonstrar métodos de obtenção de compostos de aroma de alto valor agregado a partir de monoterpenos de baixo valor de mercado ou que estão presentes em subprodutos industriais. Nesse sentido, o uso da biotransformação de terpenos foi bem-sucedida e vantajosa para produção de compostos de aromas considerados “naturais”. O interesse por aromas naturais, principalmente aqueles obtidos por micro-organismos, tem aumentado o desenvolvimento de pesquisas que visam a seleção de linhagens com potencial para a produção desses compostos.

Neste enfoque, o isolamento de bactérias em meio seletivo e diferencial para *Pseudomonas* totalizou 34 linhagens, incluindo algumas do Laboratório de Bioaromas, das quais 9 micro-organismos foram capazes de utilizar e converter pelo menos um dos substratos terpênicos. O acúmulo de metabólitos de interesse configurou o principal foco desta investigação como etapa inicial da produção de bioaromas. Dois importantes compostos de aroma formados pela biotransformação de limoneno foram destacados: carveol e carvona. A concentração máxima desses compostos atingiu valores de até 412 mg/L, 275 mg/L e 209 mg/L, para *cis*- e *trans*-carveol e carvona, respectivamente. O α -pineno foi oxigenado de uma forma satisfatória por 5 linhagens, produzindo compostos interessantes como o verbenol e a verbenona, apesar das baixas concentrações obtidas em torno de 7 mg/L e 2 mg/L, respectivamente. A biotransformação de citrionelol resultou na formação de óxido de rosa e isopulegol como principais compostos derivados. A produção de óxido de rosa atingiu valores de até 29,67 mg/L, e foi detalhada no capítulo final devido a importância industrial desse composto no mercado mundial de aromas e fragrâncias. A variação de pH do meio de biotransformação foi impactante apenas para algumas linhagens,

que apresentaram aumento satisfatório no crescimento celular ou na formação de produtos. A etapa de indução das linhagens não foi eficiente para adaptação das células ao substrato, possivelmente devido ao acúmulo de substrato remanescente somado ao substrato adicionado para a fase de biotransformação, que pode ter atingindo níveis tóxicos para a célula.

As próximas etapas desse trabalho prevêm a otimização das variáveis envolvidas no processo (temperatura, agitação, composição do meio, concentração do substrato, quantidade do inóculo), a aplicação em bioreator para aumento da escala de produtividade e estudo da separação/recuperação dos produtos para inibição da citotoxicidade do substrato e produto acumulado. Neste contexto, a área biotecnológica deve ser desenvolvida de forma a contribuir para elucidação do potencial dos bioaromas e promover tecnologias que proporcionem ao país uma posição de destaque no cenário mundial.