

MICHELLE FERNANDES ALMEIDA

**PRODUÇÃO DE SURFACTINA PELA LINHAGEM GENETICAMENTE
MODIFICADA *Bacillus subtilis* LBBMA RI4914 Isrfa UTILIZANDO
GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Marcos Rogério Tótola

Coorientadores: Alex Gazolla de Castro
Tiago A. de Oliveira Mendes

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

A447p
2022

Almeida, Michelle Fernandes, 1992-

Produção de surfactina pela linhagem geneticamente modificada *Bacillus subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA utilizando glicerol como fonte de carbono / Michelle Fernandes Almeida. – Viçosa, MG, 2022.

1 tese eletrônica (134 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Marcos Rogério Totola.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Microbiologia, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.185>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Bacillus subtilis*. 2. Lipopeptídeos. 3. Glicerina.
4. Indústrias. I. Totola, Marcos Rogério, 1965-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 579.362

Bibliotecário(a) responsável: Renata de Fátima Alves CRB6/2578


MICHELLE FERNANDES ALMEIDA

**PRODUÇÃO DE SURFACTINA PELA LINHAGEM GENETICAMENTE
MODIFICADA *Bacillus subtilis* LBBMA RI4914 Isrfa UTILIZANDO GLICEROL
COMO FONTE DE CARBONO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia Agrícola para obtenção
do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 03 de março de 2022.

Assentimento:



Michelle Fernandes Almeida
Autora



Marcos Rogério Tótola
Orientador

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar o meu caminho, dando-me força, coragem e sabedoria para enfrentar os desafios.

Aos meus pais, Otacílio (*in memoriam*) e Maria Célia, que sempre me apoiaram e acreditaram em mim, por toda dedicação, amor e por não terem poupado esforços para que eu alcançasse os meus objetivos.

Ao meu irmão Gustavo, pelo amor mais puro.

Ao Anderson, pelo companheirismo, apoio e por tornar mais leves os momentos difíceis.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade de realização do curso.

Aos professores do Departamento de Microbiologia, por todo o conhecimento compartilhado, e aos funcionários do departamento, pela ajuda sempre que solicitados. Em especial à Letícia, sempre solícita e atenciosa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Marcos Rogério Tótola, pela confiança em mim depositada, não somente para a condução desse trabalho, mas para a gestão do laboratório; pelo suporte na realização dessa pesquisa, pelo apoio e compreensão nos momentos difíceis.

Ao meu coorientador e amigo, Alex Gazolla de Castro, por todo suporte intelectual e técnico para a condução desse trabalho, pela total disponibilidade em ajudar sempre que solicitado, pelos momentos de reflexão e inúmeras reuniões, e por me estender a mão sempre que precisei.

Ao meu coorientador, Tiago Antônio de Oliveira Mendes, pela disponibilidade em ajudar sempre que solicitado e pelas sugestões dadas para o direcionamento do trabalho.

Ao professor Paulo Roberto Cecon, pela ajuda na definição do delineamento experimental e nas análises estatísticas.

À técnica Nívea, sempre solícita, e ao estudante Eduardo, do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos, pelo suporte na realização da técnica HPLC.

Ao Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBioMol), da Universidade Federal de Viçosa, e às agências de fomento CAPES, CNPq, FINEP, FAPEMIG e SisNANO/MCTI, pelo fornecimento de recursos para a manutenção do mesmo. Em especial ao professor Humberto Josué de Oliveira Ramos e à técnica Cláudia Pontes, pelo suporte na realização da técnica UPLC-MS/MS e na análise dos dados.

Ao professor Sukarno Olavo Ferreira, pelo suporte na realização da técnica de Microscopia de Força Atômica.

Às empresas Petrobras Biocombustíveis S.A. e Olfar S.A., pelo fornecimento das amostras de glicerina bruta.

A todos os colegas e amigos do LBBMA que estiveram presentes nesse período de quatro anos, pelo apoio e incentivo, por tornarem o ambiente de trabalho agradável e pelos momentos de descontração nos cafés e almoços. Em especial, aos meus estagiários, Anderson e Luciana, pela ajuda nos experimentos e pela oportunidade de aprender a ensinar. À Maria Theresa, pela colaboração e parceria na realização de parte dos experimentos. Aos amigos Tati, Fernanda, Ariane, Maria, Sofia, Bruna Leão, Túlio e Alex pela amizade e apoio dentro e fora do ambiente de trabalho.

Às vizinhas de laboratório, Juliana, Katialaine, Yasmin e Nívea, pela cooperação, conversas, cafés e almoços compartilhados.

Aos familiares e amigos, por todo apoio e torcida.

A todos que contribuíram, de algum modo, para que eu chegasse até aqui.

RESUMO

ALMEIDA, Michelle Fernandes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2022. **Produção de surfactina pela linhagem geneticamente modificada *Bacillus subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA utilizando glicerol como fonte de carbono.** Orientador: Marcos Rogério Tótola. Coorientadores: Alex Gazolla de Castro e Tiago Antônio de Oliveira Mendes.

Neste trabalho, investigou-se o uso do glicerol como fonte de carbono para a biossíntese de surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA, visando à utilização da glicerina bruta, coproduto da fabricação de biodiesel, como substrato para produção industrial do lipopeptídeo. Para isso, as seguintes abordagens foram adotadas: (i) otimização de fatores que influenciam a síntese de surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA durante o cultivo em três fontes de carbono (glicose, glicerol ou glicose + glicerol), utilizando-se a Metodologia de Superfície de Resposta (RSM); (ii) avaliação do uso da lactose como indutor da expressão do operon *srfA*, em substituição ao isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG); (iii) confirmação da capacidade de *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA de crescer e sintetizar surfactina em meio mineral contendo glicerina bruta como fonte de carbono; (iv) avaliação da proporção das moléculas de surfactina produzidas e das propriedades físico-químicas e atividade antimicrobiana em função da fonte de carbono utilizada (glicose ou glicerol) e (v) investigação de alguns dos fatores que podem limitar a síntese de surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA a partir de glicerol. Condições ótimas de concentração do indutor IPTG, momento de indução, concentração da fonte de carbono e período de incubação foram definidas pela RSM e validadas experimentalmente para cada uma das fontes de carbono. Não foi observada diferença estatística na concentração de surfactina produzida a partir de glicose, glicerol ou ambos, quando *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA foi cultivada nas condições otimizadas pela RSM. No entanto, o uso das duas fontes concomitantemente não se mostrou vantajoso, e o rendimento de produção (g surfactina/ g substrato) foi maior no cultivo com glicerol como única fonte de carbono, indicando que a conversão desse composto em surfactina é mais eficiente do que a da glicose. A lactose não foi capaz de induzir a síntese de surfactina em *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA. A linhagem foi capaz de crescer e produzir surfactina quando cultivada em meio mineral contendo glicerina bruta como única fonte de carbono. As moléculas de surfactina produzidas a partir do cultivo em glicose ou glicerol apresentaram a mesma concentração e mantiveram estáveis sua atividade surfactante e emulsificante entre 4 e 121 °C e na faixa de pH de 7 a 12. Adicionalmente, as moléculas produzidas a partir das duas fontes de carbono apresentaram atividade antimicrobiana contra *Rhizoctonia* sp., *Staphylococcus aureus* ATCC 12692, *Citrobacter freundii* ATCC 8090 e *Bacillus cereus* ATCC 14579.

Concluiu-se que a fonte de carbono utilizada (glicerol ou glicose) não interfere na concentração das moléculas de surfactina produzidas, nem mesmo nas propriedades físico-químicas e na atividade biológica das mesmas. O uso do glicerol procedente da glicerina bruta, coproduto da indústria de biodiesel, como fonte de carbono para a produção de surfactina é uma abordagem promissora para redução dos custos e pode contribuir para viabilizar a produção industrial desse lipopeptídeo por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA. O estudo dos possíveis fatores limitantes demonstrou que a ação antimicrobiana da surfactina não representa um gargalo para a alta produção da molécula e que a adição de L-leucina ao meio de cultura reduz significativamente o tempo para se chegar ao pico de produção da surfactina. A diferenciação celular em endósporos ao longo de toda a fase de crescimento parece ser um fator que limita a produção de surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA. Desse modo, o aumento do *pool* intracelular de leucina e a inibição do processo de esporulação constituem possíveis estratégias para se aumentar a produtividade volumétrica e a concentração de surfactina sintetizada por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA e viabilizar sua produção em larga escala, utilizando-se o glicerol como substrato.

Palavras-chave: Surfactina. Lipopeptídeo. *Bacillus subtilis*. Glicerina bruta. Produção industrial.

ABSTRACT

ALMEIDA, Michelle Fernandes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2022. **Surfactin production by the genetically modified strain *Bacillus subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA using glycerol as carbon source.** Adviser: Marcos Rogério Tótola. Co-advisers: Alex Gazolla de Castro e Tiago Antônio de Oliveira Mendes.

This work focused on the use of glycerol as a carbon source for the biosynthesis of surfactin by *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA, aiming at the use of crude glycerin, a co-product from biodiesel industry, as substrate for the industrial production of the lipopeptide. For this, the following approaches were adopted: (i) optimization of factors that influence surfactin synthesis by *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA during cultivation on three different carbon sources (glucose, glycerol or glucose + glycerol), using the Response Surface Methodology (RSM); (ii) evaluation of the use of lactose as an inducer of *srfA* operon expression to replace the isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG); (iii) verification of the ability of *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA to grow and synthesize surfactin in mineral salt medium containing crude glycerin as carbon source; (iv) evaluation of the amount of surfactin molecules produced and of the physicochemical properties and antimicrobial activity in response to the carbon source used (glucose or glycerol); and (v) investigation of some of the factors that may limit surfactin synthesis by *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA from glycerol. Optimal conditions of IPTG concentration, induction time, carbon source concentration, and incubation period were defined by RSM and experimentally validated for each carbon source. No statistical difference was observed in the concentration of surfactin produced from glucose, glycerol or both, when *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA was cultivated under conditions optimized by RSM. However, the use of both carbon sources concomitantly did not prove to be advantageous, and the production yield (g surfactin/g substrate) was higher in the cultivation with glycerol as the only carbon source, implying that the conversion of this compound into surfactin is more efficient than that of glucose. Lactose was unable to induce surfactin synthesis in *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA. The strain was able to grow and produce surfactin when cultivated in mineral salt medium containing crude glycerin as the sole carbon source. The surfactin molecules obtained from cultivation in glucose or glycerol showed the same concentration and maintained their surface and emulsifying activity stable between 4 and 121 °C and in the pH range from 7 to 12. Furthermore, the molecules produced from the two carbon sources showed antimicrobial activity against *Rhizoctonia* sp., *Staphylococcus aureus* ATCC 12692, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, and *Bacillus cereus* ATCC 14579. It was concluded that the carbon source used (glycerol or glucose) does not affect the concentration of the surfactin molecules produced,

neither their physicochemical properties nor their biological activity. The use of glycerol from crude glycerin, a co-product of the biodiesel industry, as a carbon source for surfactin production is a promising approach to reduce costs and may contribute to increase the viability of industrial production of this lipopeptide by *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA. The study of possible limiting factors showed that the antimicrobial effect of surfactin does not represent a bottleneck for the high production of the molecule, and that the addition of L-leucine to the culture medium significantly reduces the time to reach the peak of surfactin production. Cell differentiation into endospores throughout the growth phase appears to be a factor limiting surfactin production by *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA. Thus, increasing the intracellular leucine pool and inhibiting the sporulation process are possible strategies to increase the rate and titer of surfactin synthesized by *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA and enable its production on a large scale using glycerol as a substrate.

Keywords: Surfactin. Lipopeptide. *Bacillus subtilis*. Crude glycerin. Industrial production.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	12
CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA	14
1.1 SURFACTANTES E BIOSSURFACTANTES.....	15
1.2 SURFACTINA.....	16
1.2.1 Estrutura da molécula e biossíntese pelo complexo enzimático Surfactina Sintetase.....	16
1.2.2 Biossíntese global da surfactina: da transcrição do operon <i>surfA</i> à degradação da surfactina no meio de cultura	21
1.2.3 Propriedades físico-químicas, atividades biológicas e a relação com a estrutura da surfactina	24
1.2.4 Produção em larga escala da surfactina: desafios e estratégias para a otimização	26
1.3 GLICERINA BRUTA COMO FONTE DE CARBONO PARA A BIOSÍNTESE DA SURFACTINA.....	27
1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
CAPÍTULO 2: OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE SURFACTINA POR BACILLUS SUBTILIS LBBMA RI4914 ISRFA PELA METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA	39
RESUMO.....	40
2.1 INTRODUÇÃO.....	41
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
2.2.1 Microrganismo.....	44
2.2.2 Delineamento Composto Central Rotacional e Metodologia de Superfície de Resposta	44
2.2.3 Validação experimental dos modelos estatísticos.....	45
2.2.4 Procedimento experimental	46
2.2.5 Produção de surfactina a partir de glicerina bruta da indústria de biodiesel ..	49
2.2.6 Avaliação do uso da lactose como indutor em substituição ao IPTG.....	50
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
2.3.1 Otimização da produção de surfactina pela Metodologia de Superfície de Resposta.....	52
2.3.2 Crescimento celular, produção de surfactina e consumo do substrato por <i>B. subtilis</i> LBBMA RI4914 IsrfA nas condições otimizadas.....	63
2.3.3 Utilização da glicerina bruta, coproduto da fabricação de biodiesel, como substrato para a produção de surfactina por <i>B. subtilis</i> LBBMA RI4914 IsrfA	66
2.3.4 Avaliação do uso da lactose como indutor em substituição ao IPTG.....	70
2.4 CONCLUSÕES.....	73

2.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
CAPÍTULO 3: CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E ESTRUTURAIS DA SURFACTINA PRODUZIDA POR BACILLUS SUBTILIS LBBMA RI4914 ISRFA A PARTIR DE GLICOSE E GLICEROL		
79		
RESUMO.....		80
3.1	INTRODUÇÃO.....	81
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	83
3.2.1	Microrganismos	83
3.2.2	Produção e recuperação da surfactina.....	83
3.2.3	Efeito da temperatura e do pH sobre a atividade da surfactina.....	84
3.2.4	Métodos analíticos	85
3.2.5	Atividade antimicrobiana da surfactina	87
3.2.6	Análise estatística	90
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	91
3.3.1	Efeito da temperatura e do pH sobre a atividade da surfactina.....	91
3.3.2	Atividade antimicrobiana.....	94
3.3.3	Quantificação das variantes de surfactina produzidas a partir de glicose ou glicerol.....	97
3.4	CONCLUSÕES.....	99
3.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
CAPÍTULO 4: INVESTIGAÇÃO DOS FATORES LIMITANTES DA PRODUÇÃO DE SURFACTINA POR BACILLUS SUBTILIS LBBMA RI4914 ISRFA EM MEIO MINERAL SUPRIDO COM GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO		
105		
RESUMO.....		106
4.1	INTRODUÇÃO.....	107
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	109
4.2.1	Microrganismos	109
4.2.2	Produção de surfactina e obtenção do extrato bruto	109
4.2.3	Efeito da suplementação do meio mineral com aminoácidos sobre a produção de surfactina	110
4.2.4	Teste de espalhamento de óleo em placa	111
4.2.5	Avaliação da viabilidade celular por quantificação de ATP.....	111
4.2.6	Avaliação da formação de endósporos	111
4.2.7	Avaliação da sensibilidade de <i>B. subtilis</i> LBBMA RI4914 IsrfA à surfactina	112
4.2.8	Análise morfológica das células de <i>B. subtilis</i> LBBMA RI4914 IsrfA e WT por Microscopia de Força Atômica (AFM)	112

4.2.9	Análise do perfil de ácidos graxos de <i>B. subtilis</i> LBBMA RI4914 IsrfA e WT	113
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	114
4.3.1	Efeito da suplementação do meio mineral com aminoácidos sobre a produção de surfactina por <i>B. subtilis</i> LBBMA RI4914 IsrfA	114
4.3.2	Crescimento, viabilidade celular, produção de surfactina e esporulação	118
4.3.3	Resistência de <i>B. subtilis</i> LBBMA RI4914 IsrfA à atividade antimicrobiana da surfactina	122
4.4	CONCLUSÕES	129
4.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	130
	CONCLUSÕES GERAIS	133

INTRODUÇÃO GERAL

Surfactantes são moléculas anfipáticas amplamente utilizadas em nosso cotidiano, sendo empregadas, por exemplo, nas indústrias farmacêutica, cosmética, petrolífera, alimentícia e de produtos de limpeza. Entretanto, alguns surfactantes apresentam as desvantagens de causarem impactos negativos ao meio ambiente, serem resistentes à degradação e pouco eficientes em condições extremas de fatores como pH, temperatura, salinidade, dentre outros. Em substituição aos surfactantes sintéticos, o uso de biossurfactantes, os quais são produzidos biologicamente por microrganismos, é uma alternativa vantajosa, em decorrência das propriedades apresentadas por essas moléculas tais como baixa toxicidade, alta degradabilidade, manutenção da atividade em condições extremas de pH, temperatura e salinidade, e compatibilidade com o meio ambiente.

A surfactina é considerada um dos melhores biossurfactantes estudados até o momento, dada a sua excelente atividade de superfície e ampla gama de propriedades físico-químicas e atividades biológicas. Dois fatores principais impossibilitam, atualmente, a produção industrial da surfactina e sua aplicação em larga escala. São eles o baixo rendimento de produção da molécula pelos microrganismos selvagens e o alto custo do processo de produção em escala comercial, em decorrência do meio de cultivo utilizado, do tempo de fermentação e dos elevados custos associados com as etapas de recuperação e purificação das moléculas produzidas em pequena quantidade.

A linhagem *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA, geneticamente melhorada para a produção de surfactina, foi desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa, por meio da substituição do promotor natural do operon responsável pela síntese da surfactina (*PsrfA*) por um promotor forte e induzido por IPTG (*Pgrac*), em busca de se contornar umas das limitações da produção de surfactina em larga escala. Para redução do custo do processo, a utilização de resíduos ou coprodutos industriais, tal como a glicerina bruta, pode ser uma estratégia promissora. A glicerina bruta constitui uma fonte de glicerol de baixo custo, uma vez que é obtida como coproduto da fabricação de biodiesel. O Brasil é o terceiro maior produtor de biodiesel do mundo, e a elevada produção desse biocombustível tem levado à coprodução de grandes quantidades de glicerina bruta.

A produção da surfactina a partir de substratos renováveis e resíduos de processos industriais, associada à aplicação da molécula em diversos setores industriais em substituição aos surfactantes sintéticos, engloba economia e sustentabilidade. Este trabalho apresenta uma abordagem para reduzir o custo da produção de surfactina, bem como um estudo de possíveis

fatores limitantes da síntese da molécula pela linhagem geneticamente modificada *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA, de modo a viabilizar a sua produção em escala industrial.

No primeiro capítulo, “Revisão de literatura”, são abordadas as características gerais dos surfactantes e biosurfactantes, em especial da surfactina. É feita uma descrição detalhada da via de biossíntese da surfactina nos microrganismos e são abordados os fatores relevantes para a síntese eficiente da molécula por bactérias do gênero *Bacillus*. A relação entre a composição molecular da surfactina, sua estrutura e propriedades físico-químicas e biológicas é apresentada. Adicionalmente, estratégias para se viabilizar a produção em escala industrial da molécula são abordadas.

No capítulo 2, “Otimização da produção de surfactina por *Bacillus subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA pela metodologia de superfície de resposta”, é apresentada a otimização de fatores que influenciam a produção de surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA a partir de três fontes de carbono: glicose, glicerol e ambas simultaneamente. O glicerol foi caracterizado como a melhor fonte de carbono para a produção de surfactina e, adicionalmente, foi demonstrada a capacidade de *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA de crescer e produzir surfactina utilizando a glicerina bruta como substrato.

O capítulo 3, “Caracterização das propriedades físico-químicas, biológicas e estruturais da surfactina produzida por *Bacillus subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA a partir de glicose e glicerol”, consiste em uma avaliação da influência da fonte de carbono sobre a quantidade e a qualidade das moléculas de surfactina produzidas. Este capítulo descreve as propriedades físico-químicas, sua estabilidade a diferentes condições de pH e temperatura, e atividade antimicrobiana das moléculas de surfactina produzidas por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA, a partir de glicose ou glicerol como únicas fontes de carbono.

Tendo-se concluído que *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA é capaz de produzir surfactina a partir da glicerina bruta, que a conversão do glicerol em surfactina é mais eficiente do que a da glicose, e que a fonte de carbono utilizada (glicose ou glicerol) não afeta as características funcionais das moléculas, o Capítulo 4, “Investigação dos fatores limitantes da produção de surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA em meio mineral suprido com glicerol como fonte de carbono”, traz um estudo experimental de fatores que podem limitar a síntese de surfactina pela linhagem geneticamente modificada em meio mineral contendo glicerol como fonte de carbono, em busca de se identificarem estratégias que contribuam para viabilizar a produção em larga escala da surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA a partir desse substrato.

CAPÍTULO 1

Revisão de Literatura

1.1 SURFACTANTES E BIOSSURFACTANTES

Surfactantes são moléculas anfífilas, compostas por uma porção hidrofílica e uma hidrofóbica, que se distribuem preferencialmente entre fases de diferentes polaridades tais como óleo/água, ar/água, reduzindo as tensões superficial e interfacial (Marchant & Banat, 2012; Carolin et al., 2021). A porção hidrofóbica dos surfactantes é composta de cadeias de hidrocarbonetos saturados ou insaturados, ou ácidos graxos (Marchant & Banat, 2012), enquanto a porção hidrofílica corresponde a um grupo polar iônico (catiônico ou aniônico), não iônico ou anfótero (Santos et al., 2016).

Os surfactantes apresentam propriedades como solubilização, detergência, capacidade emulsificante (Fenibo et al., 2019) e são comumente utilizados como agentes de limpeza; podendo ser aplicados também como dispersantes, emulsificantes e agentes espumantes em diversos setores incluindo as industriais cosmética, alimentícia, farmacêutica, petrolífera e têxtil (Sar et al., 2019). Eles podem também ser utilizados como agentes antimicrobianos, no biocontrole de pragas no setor agrícola bem como na remediação de ambientes contaminados por petróleo (Negin et al., 2017; Tripathy et al., 2018). Em decorrência da grande variedade de aplicações, os surfactantes sintéticos são produzidos em larga escala (Janek et al., 2021) e são indispensáveis ao cotidiano (Sajna et al., 2015). Entretanto, tais moléculas apresentam as desvantagens de serem tóxicas ao meio ambiente e, em alguns casos, não biodegradáveis (Naughton et al., 2019). Biossurfactantes são moléculas anfífilas produzidas por microrganismos tais como bactérias, fungos filamentosos e leveduras (Banat et al., 2010; Carolin et al., 2021). Em decorrência de suas vantagens comparadas aos surfactantes sintéticos, tais como alta biodegradabilidade, baixa toxicidade e manutenção da atividade em condições extremas de pH, temperatura e salinidade, os biossurfactantes são substitutos ideais para os surfactantes químicos para uma grande diversidade de aplicações (Marchant and Banat, 2012; Moshtagh, 2019; Liu et al., 2020). Adicionalmente, outra vantagem do ponto de vista econômico e sustentável, é a produção microbiana de biossurfactantes utilizando recursos renováveis, contribuindo para evitar o impacto ambiental negativo dos surfactantes convencionais (Naughton et al., 2019; Mohanty et al., 2021).

Os biossurfactantes abrangem um amplo conjunto de moléculas com estruturas químicas distintas, e são classificados principalmente de acordo com seu peso molecular, propriedades físico-químicas e modo de ação (Banat et al., 2010; Mohanty et al., 2021). Eles podem ser divididos em dois grupos: os de baixo peso molecular, que incluem lipopeptídeos e glicolipídeos; e os de alto peso molecular, que incluem polissacarídeos e lipoproteínas (Gudiña

et al., 2013; Santos et al., 2016). Dentre os biossurfactantes mais estudados destacam-se os lipopeptídeos, os quais apresentam uma ampla gama de propriedades terapêuticas e biotecnológicas (Carolin et al., 2021). Os lipopeptídeos são uma classe de biossurfactantes muito conhecida por suas propriedades antimicrobianas (Sajna et al., 2015), e compreende moléculas compostas por uma porção lipídica ligada a um peptídeo, incluindo as famílias das surfactinas, iturinas e fengicinas, as quais são principalmente sintetizadas por *Bacillus* sp. (Walia & Cameotra, 2015).

1.2 SURFACTINA

1.2.1 Estrutura da molécula e biossíntese pelo complexo enzimático Surfactina Sintetase

A surfactina foi primeiramente identificada por Arima et al. (1968) a partir do sobrenadante de uma cultura de *Bacillus subtilis* e sua estrutura foi caracterizada em 1969 pela elucidação de sua sequência de aminoácidos (Kakinuma et al., 1969^a) e de sua cadeia de ácidos graxos (Kakinuma et al., 1969^b), sendo classificada como um lipopeptídeo. A molécula da surfactina é constituída por um heptapeptídeo cíclico ligado a um ácido graxo β -hidróxi com uma cadeia que pode variar de 11 a 17 átomos de carbono (Jacques, 2011; Moro et al., 2018). A estrutura do heptapeptídeo inclui os aminoácidos hidrofílicos aspartato (Asp) e glutamato (Glu), e os aminoácidos hidrofóbicos valina (Val) e leucina (Leu), os quais constituem a sequência peptídica típica Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu com a sequência quirál LLDLLDL (Figura 1) (Jacques, 2011; Santos et al., 2019).

Variações dessa sequência são encontradas, principalmente nos aminoácidos das posições 2, 4 e 7 da cadeia peptídica (Figura 1). A surfactina é sintetizada como uma mistura de moléculas, as quais incluem diferentes isoformas, que se diferem na composição de aminoácidos da porção peptídica, e séries homólogas, que apresentam variações no número de carbonos e isomeria da cadeia lipídica, a qual pode ter uma configuração linear ou ramificada, *iso* ou *anteiso* (Deleu et al., 1999; Seydlová et al., 2011; Théâtre et al., 2021).

Desse modo, quando falamos em surfactina, estamos nos referindo a um conjunto de moléculas que formam a família das surfactinas. Embora compartilhem características estruturais comuns, há uma grande diversidade estrutural em decorrência do tipo de aminoácido na cadeia peptídica e do comprimento e isomeria da cadeia lipídica (Ongena & Jacques, 2008). Essa diversidade de moléculas resulta, principalmente, do mecanismo biossintético da surfactina (Jacques, 2011; Théâtre et al., 2021) e é dependente do microrganismo produtor, dos

componentes do meio de cultura e das condições de cultivo (Seydlová et al., 2011; Jacques, 2011; Santos et al., 2019).

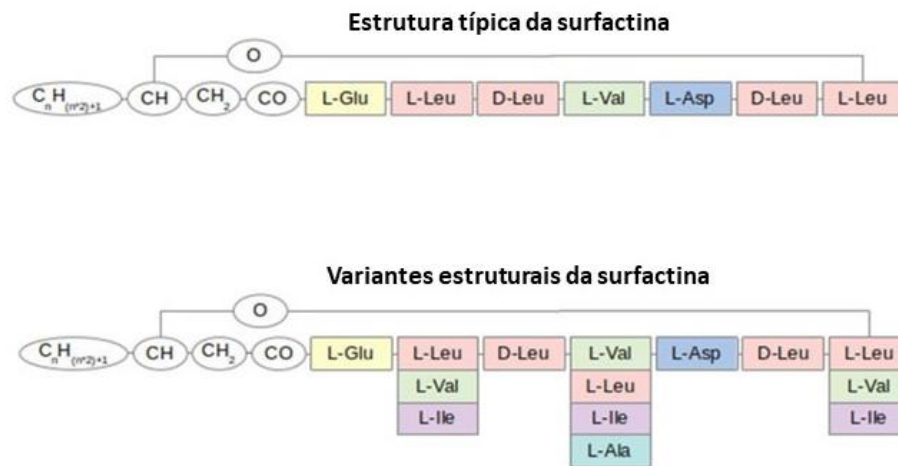


Figura 1. Variantes estruturais da surfactina produzidas em decorrência do mecanismo de biossíntese, do microrganismo produtor e dos componentes do meio de cultura. Fonte: Adaptado de Théâtre et al., 2021.

A surfactina é sintetizada pela via de biossíntese de peptídeos não ribossomais, a qual envolve um complexo enzimático multimodular composto pelas enzimas peptídeo sintetases não ribossomais (NRPS) (Nakano et al., 1991; Cosmina et al., 1993; Menkhaus et al., 1993). Complexos multienzimáticos dessa classe catalisam a polimerização de pequenos peptídeos lineares ou cíclicos pela via de síntese não ribossomal (Sussmuth & Mainz, 2017), e são constituídos de módulos repetidos (Théâtre et al., 2021). As enzimas NRPS que constituem o complexo enzimático responsável pela síntese da surfactina (surfactina sintetase) são codificadas pelo operon *srfA* (Nakano et al., 1991; Cosmina et al., 1993).

O operon *srfA* possui aproximadamente 27 kb e contém quatro genes, *srfAA*, *srfAB*, *srfAC* e *srfAD* (Figura 2), controlados pelo promotor *PsrfA* (Nakano et al., 1991; Sun et al., 2009). Três desses genes codificam para as enzimas peptídeo sintetases não-ribossomais, SrfAA, SrfAB e SrfAC, as quais compreendem uma sequência total de sete módulos, sendo cada módulo responsável pela incorporação de um aminoácido na cadeia de heptapeptídeo. A ordem dos módulos é colinear com a sequência peptídica produzida (Théâtre et al., 2021). SrfAA e SrfAB contêm três módulos cada, enquanto SrfAC apresenta apenas um (Walia & Cameotra, 2015) (Figura 2). Cada unidade modular contém pelo menos três domínios catalíticos responsáveis pela adenilação (Domínio A), formação de tioéster (Domínio T ou

proteína carreadora de peptidil (PCP)) e condensação (Domínio C) de um aminoácido específico (Marahiel et al., 1997). Os domínios de epimerização (E), localizados nos módulos M3 e M6, realizam a conversão estereoquímica dos resíduos de L-Leucina para seu isômero D-Leu (Peypoux et al., 1999; Hu et al., 2019) (Figura 2).

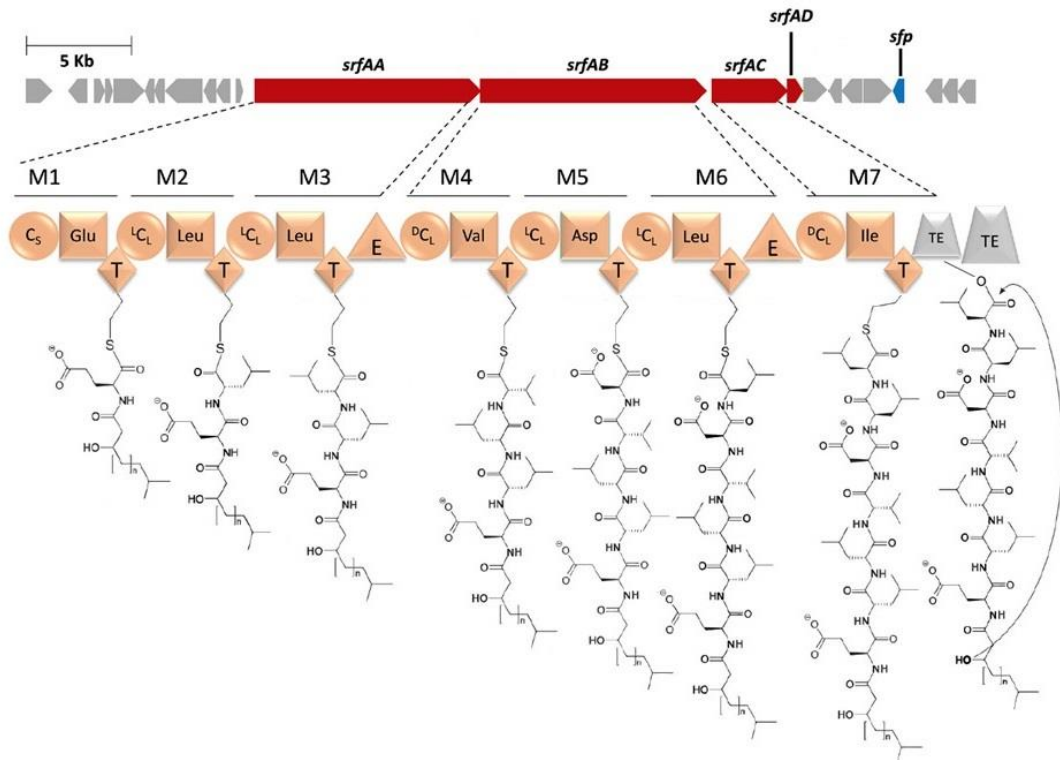


Figura 2. Operon *srfA*, organização das enzimas peptídeo sintetases não ribossomais (NRPS) e biossíntese da surfactina pelas NRPS. Os genes do operon *srfA* estão representados em vermelho. Em azul, está representado o gene que codifica para a fosfopanteteína transferase, essencial para a biossíntese da surfactina. A organização dos domínios de SrfAA-SrfAC e SrfAD está representada em laranja e cinza, respectivamente. Fonte: Adaptado de Théâtre et al., 2021.

As enzimas NRPS necessitam sofrer modificação pós-traducional para se tornarem funcionais (Martínez-Núñez & López, 2016). A modificação envolve a incorporação do cofator 4'-fosfopanteteína (proveniente da coenzima A) ao resíduo de serina no domínio T através de uma ligação fosfodiéster (Shaligram & Singhal, 2010). A aproximadamente 4 kb *downstream* ao operon *srfA* está localizado o gene *sfp*, essencial para a biossíntese da surfactina (Figura 2). Esse gene codifica para a fosfopanteteína transferase, requerida para a conversão do domínio T do complexo biossintético da surfactina de sua forma inativa (apo-forma) para a forma ativa (holo-forma), por meio da incorporação do cofator 4'-fosfopanteteína (Quadri et al., 1998).

A primeira etapa da biossíntese da surfactina consiste no reconhecimento e ativação do aminoácido específico pelo domínio de adenilação. O domínio A catalisa a ativação do substrato como aminoacil adenilato através da hidrólise de ATP dependente de Mg^{2+} e liberação de pirofosfato (Seydlová & Svobodová, 2008; Sussmuth & Mainz, 2017). O aminoácido ativado (aminoacil adenilato) é então ligado covalentemente ao cofator 4'-fosfopanteteína presente no domínio T via ligação tioéster (Shaligram & Singhal, 2010). O cofator 4'-fosfopanteteína é flexível e os aminoácidos ligados a ele são transferidos de um domínio a outro para as reações catalíticas subsequentes. A ligação peptídica entre dois aminoácidos adjacentes é catalisada pelo domínio de condensação do módulo receptor, onde a ligação ao aminoácido ou à cadeia peptídica nascente *upstream* é estabelecida (Sussmuth & Mainz, 2017) (Figura 2).

Os domínios C do subtipo $^L C_L$ catalisam a formação da ligação peptídica entre dois L-aminoácidos enquanto os domínios $^D C_L$ catalisam a formação da ligação peptídica entre um L-aminoácido e uma cadeia peptídica crescente contendo um D-aminoácido na extremidade (Théâtre et al., 2021). A ocorrência dos D-aminoácidos na molécula da surfactina é possibilitada pela presença dos domínios E nos módulos M3 e M6 e dos domínios $^D C_L$ nos módulos M4 e M7 (Figura 2) (Théâtre et al., 2021).

A repetição da ativação do substrato, ligação como tioéster ao domínio T, alongação da cadeia peptídica e translocação ao módulo *downstream* leva à formação da cadeia peptídica completa, ligada ao cofator 4'-fosfopanteteína no último módulo localizado na subunidade SrfAC (Chiocchini, 2006). Tal subunidade catalisa a condensação do último resíduo de aminoácido, bem como a liberação do heptapeptídeo resultante a partir do complexo biossintético, pela ação do domínio de tioesterase (TE-I) fundido à SrfAC. O peptídeo é liberado por uma reação intramolecular com um nucleófilo interno, formando um peptídeo cíclico (Chiocchini, 2006; Chen et al., 2015).

O grupo tiol do cofator 4'-fosfopanteteína ligado a qualquer domínio T pode sofrer modificações com pequenas moléculas presentes nas células tais como acetilação e succinilação, o que leva ao bloqueio da linha de montagem pelas NRPS pelo impedimento da ligação dos aminoácidos ativados ao cofator (Koglin et al., 2008). Adicionalmente, o bloqueio do cofator 4'-fosfopanteteína com grupos acil pode ocorrer pela ação da enzima Sfp ao utilizar derivados de acil-CoA como doadores de 4'-fosfopanteteína para ativação das NRPS, neste caso, bloqueando a síntese do peptídeo pela preparação incorreta das NRPS, uma vez que o cofator não se encontra livre para se ligar ao aminoácido (Schwarzer et al., 2002).

Além do bloqueio do cofator 4'-fosfopanteteína, a incorporação errônea de um aminoácido em qualquer etapa da síntese, afeta severamente a eficiência do sistema, criando um gargalo que pode resultar no acúmulo de intermediários não processados. Por exemplo, quando o domínio A incorpora um aminoácido que não é reconhecido pelo domínio C, a formação da ligação peptídica é impedida, e o módulo carregado estará bloqueado até que o aminoácido incorreto seja hidrolisado (Yeh et al., 2004).

As tarefas de vigilância e reparo da linha de montagem da surfactina são realizadas pela enzima SrfAD, uma tioesterase do tipo II (Kraas et al., 2010), codificada pelo último gene do operon *srfA*. Essa enzima foi caracterizada como sendo responsável por eliminar os aminoácidos incorporados incorretamente nas NRPS, (Yeh et al., 2004) e pela regeneração do cofator 4'-fosfopanteteína funcional nos domínios holo-T das NRPS por meio da hidrólise dos grupos acil ligados a ele (Schwarzer et al., 2002; Koglin et al., 2008). Desse modo, a atividade dos módulos que estavam bloqueados, pela incorporação de aminoácidos não processáveis pela maquinaria ou pela presença de um grupo acil, é restaurada.

Além dessa função de reparo, a tioesterase do tipo II também parece estar envolvida no carregamento do ácido graxo β -hidroxi no primeiro domínio C (Steller et al., 2004; Koglin et al., 2008). A porção lipídica da surfactina é introduzida diretamente no início da biossíntese. O módulo de iniciação da enzima SrfAA (M1) contém um domínio C especial, conhecido como *C-starter* (C_S ; do português $C_{\text{iniciador}}$) (Figura 2), o qual é responsável pela ligação covalente do ácido graxo β -hidroxi CoA-ativado ao primeiro aminoácido glutamato (Menkhaus et al., 1993; Kraas et al., 2010; Théâtre et al., 2021). A diversidade de cadeias de ácido graxo encontradas nas moléculas de surfactina ocorre em decorrência da distinta especificidade do domínio C_S com relação ao comprimento da cadeia do seu substrato, ácido graxo 3-OH (Hu et al., 2019; Théâtre et al., 2021).

Assim como o domínio C_S para os ácidos graxos, nem todos os domínios de adenilação são específicos, alguns aceitam resíduos de aminoácidos com estruturas similares. Os domínios de adenilação dos módulos 1, 3, 5 e 6 apresentam alta especificidade, os quais reconhecem os resíduos de aminoácidos L-Glu, L-Leu, L-Asp e L-Leu, respectivamente (Bonmatin et al., 2003; Jacques, 2011; Théâtre et al., 2021). Ressalta-se que os módulos 3 e 6 contêm o domínio de epimerização (E), que transforma os aminoácidos L-Leu incorporados em D-Leu. Em contrapartida, os domínios de adenilação dos módulos 2, 4 e 7 são capazes de aceitar diferentes resíduos de aminoácidos alifáticos como substrato (Bonmatin et al., 2003; Jacques, 2011), tais como L-leucina, L-valina ou L-isoleucina ou ainda L-alanina para o módulo 4 (Figura 1), sendo

este o que apresenta maior variabilidade de substratos (Peypoux et al., 1999). Desse modo, a diversidade de moléculas de surfactina produzidas pelos microrganismos é decorrente, principalmente, do mecanismo de biossíntese (Théâtre et al., 2021).

1.2.2 Biossíntese global da surfactina: da transcrição do operon *srfA* à degradação da surfactina no meio de cultura

Zhi et al. (2017) e Zhou et al. (2018), por meio da análise do transcriptoma de *Bacillus amyloliquefaciens* MT45 e *Bacillus velezensis* BS-37 (linhagens naturalmente superprodutoras de surfactina), sugeriram a divisão do mecanismo biossintético da surfactina em módulos que são importantes para a produção eficiente da molécula por *Bacillus* spp., os quais incluem o suprimento de precursores; a transcrição do operon *srfA* e montagem da surfactina pelas NRPS; a exportação da surfactina e a resistência da linhagem produtora à ação antimicrobiana da molécula (Figura 3). Além destes, Théâtre et al. (2021) inclui a degradação da surfactina como sendo um estágio importante para o rendimento de produção da molécula pelas bactérias (Figura 3).

O primeiro módulo se refere ao suprimento dos precursores que compõem a estrutura da molécula, por meio das vias de biossíntese de aminoácidos e de ácidos graxos. O conteúdo intracelular desses precursores afeta significativamente a eficiência de produção de surfactina uma vez que as NRPS competem com o metabolismo primário da célula para utilização dos mesmos como substrato para a síntese da surfactina (Zhi et al., 2017; Zhou et al., 2018; Hu et al., 2019). A maioria das moléculas variantes de surfactina produzidas apresentam em sua estrutura ácidos graxos de cadeia ramificada (Youssef et al., 2005). O metabolismo de ácidos graxos é dividido em síntese de ácidos graxos de cadeia linear e síntese de ácidos graxos de cadeia ramificada (Zhou et al., 2018). O acetil-CoA é a molécula precursora para a síntese de ácidos graxos de cadeia linear, enquanto os precursores dos ácidos graxos de cadeia ramificada são produtos do catabolismo dos aminoácidos L-valina, L-leucina e L-isoleucina (Kaneda, 1977).

O metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada exerce um efeito significativo na síntese da surfactina, uma vez que leucina e valina constituem a estrutura mais comumente encontrada da surfactina e isoleucina pode ser encontrada nas variantes estruturais da molécula (Figura 1) (Jacques, 2011; Zhou et al., 2018; Théâtre et al., 2021). Além disso, os aminoácidos de cadeia ramificada, leucina, valina e isoleucina, são também importantes para a síntese da surfactina, pois fornecem precursores para a biossíntese dos ácidos graxos de cadeia ramificada

(Kaneda, 1977; Hu et al., 2019). Ainda, as vias biossintéticas dos aminoácidos glutamato e aspartato são também importantes (Zhou et al., 2018).

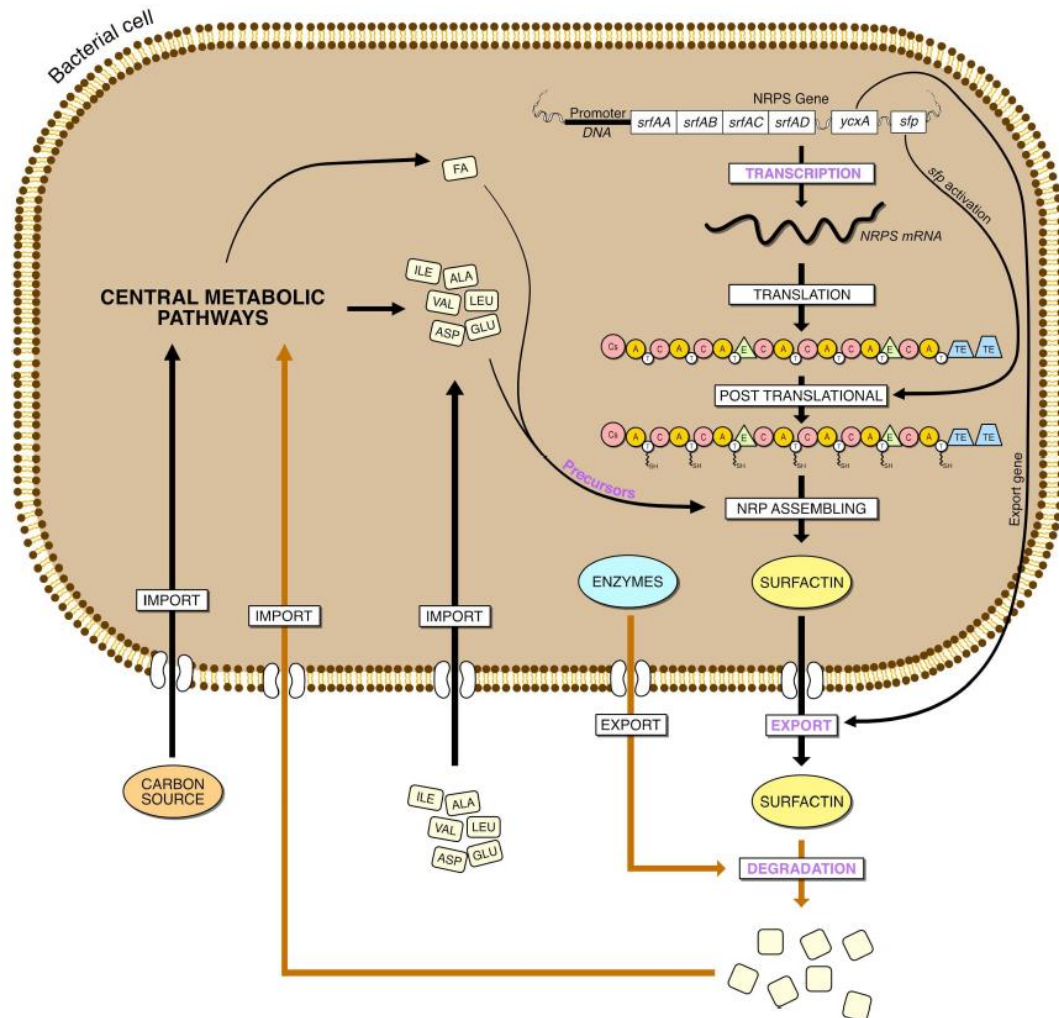


Figura 3. Etapas envolvidas na biossíntese da surfactina em *Bacillus* spp. As principais etapas estão em roxo; as setas em laranja representam vias hipotéticas. Fonte: Théâtre et al., 2021.

O segundo módulo relevante para a produção de altas concentrações de surfactina envolve a montagem da surfactina catalisada pelas enzimas NRPS e a transcrição do operon *srfA*. A expressão do operon *srfA* é regulada por uma série de reguladores transcricionais (Hu et al., 2019). Sua transcrição é regulada positivamente por um mecanismo de *quorum sensing*, o qual utiliza dois peptídeos sinais: ComX e CSF (fator de competência e esporulação). Quando em altas concentrações no meio de cultura, esses peptídeos sinais atuam através de duas vias de sinalização para ativar a transcrição do operon *srfA* (Hamoen et al., 2003; Hu et al., 2019). Em adição a esses mecanismos, a expressão do operon é regulada negativamente por vários reguladores globais tais como CodY (Serror & Sonenshein, 1996; Chumsakul et al., 2011), Rap

(Auchtung et al., 2006), SinI (López et al., 2009) e SpX (Zhang et al., 2006). Para desvincular a expressão do operon *surfA* desse sistema de regulação complexo e eliminar o efeito de *quorum sensing* sobre a produção de surfactina, a substituição do promotor *surfA* por promotores fortes e induzíveis tem sido relatada (Sun et al., 2009; Jiao et al., 2017; Almeida, 2018).

O terceiro módulo está relacionado com a resistência da linhagem produtora de surfactina à ação antimicrobiana da molécula. Em decorrência de sua natureza anfifílica, a surfactina pode interagir com a membrana fosfolipídica das células, provocando sua perturbação ou, até mesmo, a perda de sua integridade (Théâtre et al., 2021). A excreção da surfactina, por meio de transportadores que são bombas de efluxo, é outra etapa importante para a superprodução da molécula (Théâtre et al., 2021). As bombas evitam a acumulação intracelular da surfactina e, desse modo, parecem funcionar como um mecanismo de auto resistência (Tsuge et al., 2001).

Embora o mecanismo envolvido na exportação da surfactina não seja bem esclarecido, alguns transportadores envolvidos com o efluxo da molécula foram identificados em *Bacillus* sp., os quais incluem YerP (Tsuge et al., 2001), SwrC, YcxA e KrsE (Li et al., 2015) e AcrB (Wu et al., 2019). O operon *liaRSFGHI* também parece estar envolvido com a resistência da linhagem produtora à ação da surfactina (Wu et al., 2019), uma vez que foi caracterizado como responsável por codificar para proteínas associadas com a resistência à daptomicina, um análogo estrutural da surfactina (Zhi et al., 2017).

Por fim, Théâtre et al. (2021) consideram como um fator importante para a eficiência de produção de surfactina por *Bacillus* spp. a degradação da molécula pelas células produtoras. Nitschke & Pastore (2004) e Maass et al. (2016) observaram uma redução de 59 e 73%, respectivamente, na concentração de surfactina durante o processo de fermentação. Esse mecanismo de degradação da surfactina pode ter ocorrido por meio da utilização da surfactina como fonte de carbono pelas células após o esgotamento da fonte de carbono do meio, ou em decorrência do seu efeito inibitório para as células em alta concentração (Maass et al., 2016). Outra explicação foi sugerida por Nitschke & Pastore (2004), os quais relacionaram a degradação da surfactina com o aumento da atividade de protease no meio de cultura, sugerindo que as enzimas produzidas estariam envolvidas no processo. Ambos os processos de excreção e degradação da surfactina foram pouco pesquisados até o momento. No entanto, eles podem exercer grande influência sobre a concentração final de surfactina obtida (Théâtre et al., 2021).

1.2.3 Propriedades físico-químicas, atividades biológicas e a relação com a estrutura da surfactina

A estrutura da surfactina é composta por uma porção hidrofílica e uma porção hidrofóbica que caracterizam a sua natureza anfifílica. A natureza anfifílica da molécula associada à grande diversidade de variantes sintetizadas pelos microrganismos é responsável pela ampla gama de propriedades físico-químicas e atividades biológicas da surfactina (Théatre et al., 2021). A estrutura única da surfactina confere a essa molécula uma significativa atividade de superfície, por exemplo, a capacidade de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 27 mN m⁻¹ (Arima et al., 1968), sendo a surfactina considerada um dos melhores tensoativos estudados até o momento. Além disso, a surfactina possui propriedade emulsificante (Long et al., 2017), espumante e de dispersão (Razafindralambo et al., 1996; Fei et al., 2020), e apresenta maior estabilidade estrutural e funcional quando exposta a uma ampla faixa de temperatura, pH e salinidade, comparada aos demais lipopeptídeos conhecidos (Jiao et al., 2017).

Outra propriedade apresentada pela surfactina é a capacidade de autoagregação dos monômeros formando estruturas tais como micelas (Rodrigues et al., 2015; Théatre et al., 2021). A concentração micelar crítica (CMC) é definida como a concentração mínima necessária para iniciar a formação de micelas, e constitui uma importante propriedade, responsável pelas habilidades de detergência e solubilização (Ying, 2006). Surfactantes que apresentam baixas CMCs são considerados mais eficientes (Rodrigues, 2015). As surfactinas apresentam baixos valores de CMC, em torno de 20 mg L⁻¹ (Wang et al., 2018; Santos et al., 2019).

Adicionalmente, em decorrência de sua natureza anfifílica, a surfactina é capaz de interagir com as membranas celulares e apresenta uma grande variedade de atividades biológicas tais como atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral, antibiofilme, antitumoral, anti-inflamatória e hemolítica (Chen et al., 2015; Wu et al., 2017; Liu et al., 2019; Nanjundan et al., 2019). Quando se encontra em concentrações abaixo ou iguais à CMC, a surfactina pode inserir-se na membrana fosfolipídica e, em concentrações acima da CMC, ela causa a sua solubilização (Deleu et al., 2013).

As propriedades físico-químicas citadas fazem da surfactina apropriada para ser utilizada em formulações de produtos cosméticos, farmacêuticos e de limpeza (Lai et al., 2009; Yang et al., 2020; Drakontis & Amin, 2020); para melhorar a recuperação de petróleo nos campos de exploração e para aumentar a taxa de biodegradação de hidrocarbonetos e a remoção de metais em ambientes terrestres e aquáticos (Liu et al., 2015; Wang et al., 2020). Além disso, as atividades biológicas já descritas para a molécula tornam a surfactina um composto de grande

interesse para as indústrias médica, farmacêutica, agrícola e alimentícia. O Quadro 1 apresenta uma relação entre as atividades exercidas pela surfactina e suas potenciais aplicações biotecnológicas.

Quadro 1. Potenciais aplicações biotecnológicas da surfactina

Áreas de aplicação	Atividades exploradas	Referência
Farmacêutica/Médica	Antiviral	Yuan et al., 2018
	Antibacteriana	Louiseau et al., 2015
	Antitumoral	Cao et al., 2010
	Anti-inflamatória	Zhao et al., 2017
	Antibiofilme e antiadesiva	Moryl et al., 2015
	Emulsificante	Ohadi et al., 2020
Cosmética	Antienvelhecimento e antioxidante	Lu et al., 2016
	Espumante e emulsificante	Lu et al., 2016
Ambiental	Tensoativa, emulsificante, solubilizante	Wang et al., 2020
	Quelante	Mulligan et al., 1999
Alimentícia	Emulsificante	Zouari et al., 2016
	Antimicrobiana, antibiofilme	Araujo et al., 2016
	Antibiofilme e antiadesiva	Gomes & Nitschke, 2012
Indústria de petróleo	Tensoativa, emulsificante, dispersante	Liu et al., 2015
Agrícola	Indutor de resistência sistêmica em plantas	Ongena e Jacques, 2008
	Antifúngica	Krishnan et al., 2019
	Antibacteriana	Preecha et al., 2010
Limpeza	Detergência, emulsificante	Fei et al., 2020

Fonte: Dados da pesquisa do autor (2022).

As variações na estrutura molecular da surfactina, tanto na porção peptídica quanto na cadeia lipídica, são determinantes das atividades apresentadas pela molécula (Araujo et al., 2016; Théâtre et al., 2021). A atividade de superfície da molécula é determinada pela interação da cadeia de hidrocarbonetos e da sequência peptídica, sendo que quanto mais distantes forem os domínios polares e apolares na molécula, mais forte é a atividade (Liu et al., 2020). O comprimento e isomeria da cadeia de ácido graxo bem como a proporção de cada variante de surfactina produzida são os principais fatores que impactam as propriedades físico-químicas e atividades biológicas da surfactina (Dhali et al., 2017; Hu et al., 2019; Théâtre et al., 2021).

Em seu estudo, Wang et al. (2018) mostraram que a molécula de surfactina contendo ácido graxo de 15 carbonos apresentou melhor atividade de superfície comparada às moléculas com 13 e 14 carbonos. Esses autores concluíram que quanto maior for a cadeia de ácido graxo na isoforma da surfactina, melhor é atividade de superfície em termos de redução da tensão superficial e valor de CMC (mais baixo). O efeito do comprimento da cadeia lipídica na propriedade espumante não segue a mesma tendência que a observada anteriormente, visto que a surfactina contendo ácido graxo com 14 carbonos apresentou maior capacidade de formação

de espuma do que as que possuem ácidos graxos com 13 ou 15 carbonos (Razafindralambo et al., 1998; Youssef et al., 2011). Com relação à alteração na porção peptídica da molécula de surfactina, foi demonstrado que a linearização do peptídeo cíclico leva a uma distorção estrutural na molécula, reduzindo ou abolindo sua atividade de superfície (Liu et al., 2020) e sua atividade hemolítica (Dufour et al., 2005).

1.2.4 Produção em larga escala da surfactina: desafios e estratégias para a otimização

Em decorrência de suas variadas propriedades físico-químicas e biológicas, a surfactina tem atraído considerável atenção para aplicações industriais. No entanto, seu processo fermentativo atual é oneroso e não atende às necessidades para uma produção em escala industrial (Hu et al., 2019). A surfactina não consegue competir comercialmente com os surfactantes químicos em decorrência do elevado custo do processo de produção (Hu et al., 2019; Silva et al., 2019; Zanotto et al., 2019), o qual está relacionado com o baixo rendimento de produção pelos microrganismos, longo tempo de fermentação, composição do meio de cultura e alto custo do processamento *downstream* que envolve a recuperação e purificação da molécula (Farias et al., 2021).

O tipo de matéria-prima utilizada para a produção do biosurfactante pode contribuir consideravelmente para o valor final do produto (Silva et al., 2019). Estima-se que o meio de cultura utilizado para a produção de surfactina, e de biosurfactantes em geral, representa de 30 a 50% do custo total de produção (Zanotto et al., 2019; Farias et al., 2021). O custo envolvido nos processos de recuperação e purificação da surfactina é o mais significativo do ponto de vista econômico e pode representar até 60% do valor total do processo produtivo (Zanotto et al., 2019). No entanto, o dispêndio com a purificação pode ser evitado em situações nas quais o biosurfactante é aplicado em sua forma bruta, como na área ambiental e agrícola (Santos et al. 2016).

Para superar os desafios da produção industrial da surfactina e possibilitar o estabelecimento da mesma como um produto comercial economicamente competitivo, linhagens de *Bacillus* spp. geneticamente modificadas têm sido desenvolvidas como estratégia para aumentar a biossíntese desse lipopeptídeo e, conseqüentemente, alcançar rendimento adequado para a escala industrial (Santos et al., 2019). Diferentes abordagens têm sido descritas na literatura tais como a superexpressão de peptídeos sinais específicos (ComX e CSF (Jung et al., 2012)) e de transportadores da surfactina (Li et al., 2015), e a substituição do promotor *surfA* nativo por promotores fortes e induzíveis (Sun et al., 2009; Jiao et al., 2017; Almeida, 2018), as quais aumentaram eficientemente a biossíntese da surfactina.

Wu et al. (2019) aplicaram diferentes estratégias em uma mesma linhagem de *B. subtilis* por meio de uma abordagem sistemática de engenharia metabólica e alcançaram o título de 12,8 g L⁻¹ de surfactina. Foram realizadas a deleção de genes envolvidos com a formação de biofilme e biossíntese de outros metabólitos (potenciais vias competitivas), a superexpressão de proteínas envolvidas com a exportação da surfactina, a engenharia da via de biossíntese de ácidos graxos para aumentar o suprimento desse precursor e a superexpressão do operon *urfA*.

Buscando minimizar os custos da produção de surfactina, estudos têm sido realizados utilizando coprodutos ou resíduos industriais como substrato para o processo fermentativo, os quais constituem matérias-primas de baixo custo (Gudiña et al., 2015; Moya Ramírez et al., 2015; Paraszkiwicz et al., 2018; Janek et al., 2021; Mohanty et al., 2021). De acordo com Zanotto et al. (2019), o uso de resíduos agroindustriais constitui uma das melhores estratégias para reduzir o custo total de produção de surfactina. Além de ser importante para a economia do processo, essa abordagem possibilita uma produção mais sustentável da molécula e apresenta como vantagem a grande quantidade de substratos renováveis e de baixo custo disponíveis atualmente (Théatre et al., 2021; Mohanty et al., 2021).

Fatores como fonte de carbono, fonte de nitrogênio, pH, temperatura, aeração, velocidade de agitação e período de incubação afetam a produção de surfactina pelos microrganismos (Chen et al., 2015; Jahan et al., 2020). A fonte de carbono influencia a quantidade e a qualidade das moléculas produzidas (Fenibo et al., 2019). O estabelecimento de condições ótimas de fermentação visando maximizar a produtividade da surfactina também é importante para reduzir os custos do processo e viabilizar a produção em larga escala (Moshtagh et al., 2019). Nesse sentido, a otimização das condições de cultivo, bem como o uso de substratos de baixo custo, tais como resíduos agroindustriais, por linhagens com alto potencial de produção, podem contribuir para tornar o processo de produção de surfactina sustentável e economicamente viável (Mohanty et al., 2021).

1.3 GLICERINA BRUTA COMO FONTE DE CARBONO PARA A BIODIESEL DA SURFACTINA

A glicerina bruta é coproduto da fabricação de biodiesel. O biodiesel é produzido pelo processo de transesterificação de triglicerídeos provenientes de óleos vegetais e/ou gordura animal com um álcool primário, metanol ou etanol, o qual gera dois produtos: o éster (biodiesel) e a glicerina (Figura 4) (Pinto et al., 2005; ANP, 2021^a). O teor de glicerina obtido no processo corresponde a aproximadamente 10% em massa do biocombustível produzido (Yang et al.,

2012; EPE, 2021). O termo glicerina bruta ou glicerina loira se refere ao coproduto da produção de biodiesel, que possui aproximadamente 80% de glicerol em sua composição (Mota & Pestana, 2011; EPE, 2021). Glicerol é uma classificação para a glicerina refinada (EPE, 2021).

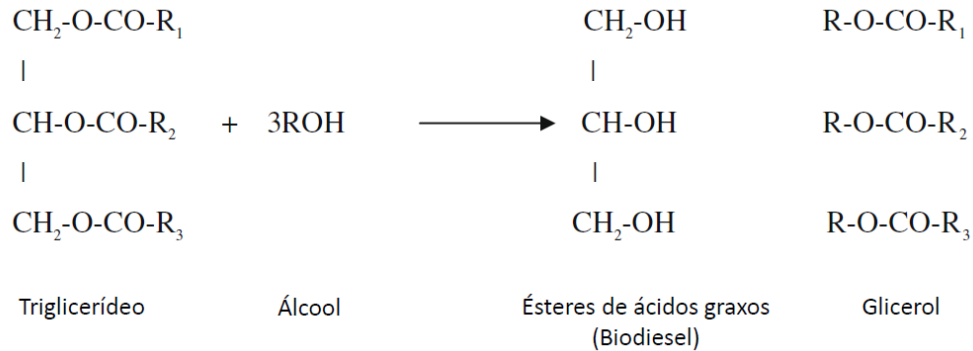


Figura 4. Obtenção de biodiesel e glicerol pelo processo de transesterificação. Fonte: Adaptado de Leung et al., 2010.

O Brasil encontra-se entre os três maiores produtores de biodiesel do mundo, após Indonésia e Estados Unidos (EPE, 2021). Em 2020, o país produziu 6,4 bilhões de litros de biodiesel (ANP, 2021^b) e estima-se que tenham sido produzidos 640 mil toneladas de glicerina bruta. O rápido desenvolvimento da indústria de biodiesel foi acompanhado por um aumento no estoque de glicerina bruta, o que tem resultado em grande oferta e baixo valor comercial desse composto (Zhan et al., 2018; Janek et al., 2021). Com isso, a glicerina tem ganhado atenção no cenário biotecnológico, se tornando um substrato de grande interesse para processos de fermentação microbiana (Chen et al., 2014; Sousa et al., 2014; Kalantari et al., 2017; Zhan et al., 2018).

A glicerina bruta constitui uma fonte de carbono e energia bastante atrativa para a produção de surfactina, de modo a contribuir para a redução do custo do processo de produção. A conversão desse coproduto em produtos de maior valor agregado contribui para tornar a cadeia produtiva de biodiesel mais rentável, além de reduzir o impacto ambiental pela acumulação da glicerina (Mota & Pestana, 2011; Zhou et al., 2018).

B. subtilis é capaz de importar e metabolizar o glicerol (Figura 5) (Sousa et al., 2014; Kalantari et al., 2017). Em *Bacillus* spp., o glicerol entra nas células por difusão facilitada através da proteína de membrana pertencente à família das aquaporinas, GlpF (Darbon et al., 2002; Fujita, 2009). Quando se encontra no citosol, o glicerol é convertido a glicerol-3-fosfato por uma reação dependente de ATP, catalisada pela enzima glicerol quinase (GlpK). O glicerol-3-fosfato não é substrato para GlpF e, dessa forma, permanece internalizado na célula, sendo

oxidado a dihidroxicetona fosfato pela glicerol-3-fosfato desidrogenase (GlpD) (Darbon et al., 2002; Zhan et al., 2018; Zhou et al., 2018).

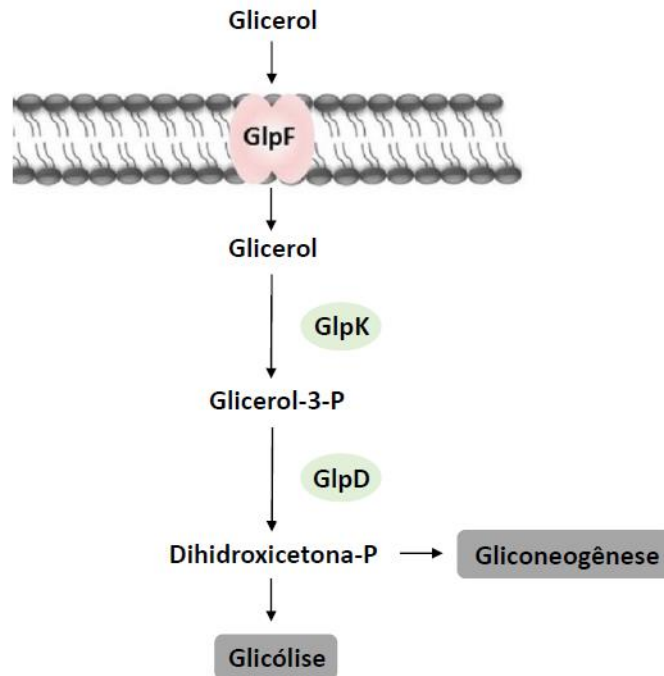


Figura 5. Via de assimilação do glicerol por *Bacillus* spp. Fonte: Adaptado de Zhou et al., 2018.

A partir desse ponto, o fluxo catabólico do glicerol bifurca entre a glicólise, em direção ao ciclo do ácido tricarboxílico, e a gliconeogênese, em direção à via das pentose fosfato (PPP) (Zhan et al., 2018). Seguindo-se o fluxo da via glicolítica, ocorrerá a síntese de piruvato, oxaloacetato e acetil-CoA, que podem ser utilizados como precursores para as vias de biossíntese dos aminoácidos valina e leucina; glutamato e aspartato; e de ácidos graxos, respectivamente, os quais compõem as moléculas de surfactina (Zhou et al., 2018). O fluxo pela via de gliconeogênese é importante para a geração de glicose-6-fosfato e, conseqüentemente, produção de pentose fosfato e NADPH, pela PPP, necessários para os processos biossintéticos celulares (Zhan et al., 2018) bem como para a síntese da surfactina, uma vez que NADPH é requerido para a biossíntese de ácidos graxos (Diomandé et al., 2015).

Desse modo, embora o glicerol não seja a fonte de carbono preferencial de *Bacillus* spp., ele pode ser utilizado em vias catabólicas, gerando energia e precursores necessários para o crescimento e homeostase celular, e para a síntese de metabólitos como a surfactina.

1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, M. F. *Bacillus subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA: uma nova linhagem geneticamente melhorada para produção de surfactina. 77f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2018.

Araujo, L. V.; Guimarães, C. R.; Marquita, R. L. S.; Santiago, V. M. J.; Souza, M. P. S.; Nitschke, M.; Freire, D. M. G. Rhamnolipid and surfactin: Anti-adhesion/antibiofilm and antimicrobial effects. *Food Control*, v. 63, p. 171-178, 2016.

Arima, K.; Kakinuma, A.; Tamura, G. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 31, p. 488-494, 1968.

Auchtung, J. M.; Lee, C. A.; Grossman, A. D. Modulation of the ComA-dependent quorum response in *Bacillus subtilis* by multiple rap proteins and Phr peptides. *J Bacteriol.*, v. 188, p.5273–5285, 2006.

ANP, 2021^a. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustível. Disponível em: <https://www.gov.br/anp/pt-br/assuntos/producao-e-fornecimento-de-biocombustiveis/biodiesel>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2022.

ANP, 2021^b. Informações de Mercado - Biodiesel. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, Rio de Janeiro. Disponível em: <https://www.gov.br/anp/pt-br/assuntos/producao-e-fornecimento-de-biocombustiveis/biodiesel/informacoes-de-mercado>. Acesso em: 10 de Fevereiro de 2022.

Banat, I. M.; Franzetti, A.; Gandolfi, I.; Bestetti, G.; Maria G. Martinotti, M. G.; Fracchia, L.; Smyth, T. J.; Marchant, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 87, p. 427-444, 2010.

Bonmatin, J. M.; Laprevote, O.; Peypoux, F. Diversity among microbial cyclic lipopeptides: Iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. *Comb. Chem. High Throughput Screening*, v. 6, p. 541-556, 2003.

Carolin, F.; Kumar, P. S.; Ngueagni, P. T. A review on new aspects of lipopeptide biosurfactant: Types, production, properties and its application in the bioremediation process. *Journal of Hazardous Materials*, v. 407, 2021.

Cao, X.; Wang, A.; Wang, C.; Mao, D.; Lu, M.; Cui, Y.; Jiao, R. Surfactin induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through a ROS/JNK-mediated mitochondrial/caspase pathway. *Chemico-Biological Interactions*, v. 183, p. 357-362, 2010.

Chen, X.; Tian, K.; Niu, D.; Shen, W.; Algasan, G.; Singh, S.; Wang, Z. Efficient bioconversion of crude glycerol from biodiesel to optically pure d-lactate by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Green Chem.*, v. 16, p. 342-350, 2014.

Chen, W.; Juang, R.; Wei, Y. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*, v. 103, p. 158–169, 2015.

Chiocchini, C. The surfactin biosynthetic complex of *Bacillus subtilis*: COM domain-mediated biocombinatorial synthesis, and single step purification of native multi-modular NRPSs and multi-enzyme complexes. 144f. Dissertation - Marburg, Lahn, 2006.

- Chumsakul, O.; Takahashi, H.; Oshima, T.; Hishimoto, T.; Kanaya, S.; Ogasawara, N.; Ishikawa, S. Genome-wide binding profiles of the *Bacillus subtilis* transition state regulator AbrB and its homolog Abh reveals their interactive role in transcriptional regulation. *Nucleic Acids Res.*, v. 39, p. 414–28, 2011.
- Cosmina, P.; Rodriguez, F.; Ferra, F.; Grandi, G.; Perego, M.; Venema, G.; Sinderen, D. Sequence and analysis of the genetic locus responsible for surfactin synthesis in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, v. 8(5), p. 821-831, 1993.
- Darbon, E.; Servant, P.; Poncet, S.; Deutscher, J. Antitermination by GlpP, catabolite repression via CcpA and inducer exclusion triggered by P~GlpK dephosphorylation control *Bacillus subtilis glpFK* expression. *Molecular Microbiology*, v. 43(4), p. 1039–1052, 2002.
- Deleu, M.; Razafindralambo, H.; Popineau, Y.; Jacques, P.; Thonart, P.; Paquot, P. Interfacial and emulsifying properties of lipopeptides from *Bacillus subtilis*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 152, p. 3-10, 1999.
- Deleu, M.; Lorent, J.; Lins, L.; Brasseur, R.; Braun, N.; El Kirat, K.; *et al.* Effects of surfactin on membrane models displaying lipid phase separation. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, v. 1828, p. 801–815, 2013.
- Diomandé, S. E.; Nguyen-The, C.; Guinebretière, M.; Broussolle, V.; Brillard, J. Role of fatty acids in *Bacillus* environmental adaptation. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, 2015. doi: 10.3389/fmicb.2015.00813
- Dhali, D.; Coutte, F.; Arias, A. A.; Auger, S.; Bidnenko, V.; Chataigné, G.; Lalk, M.; Niehren, J.; Sousa, J.; Versari, C.; Jacques, P. Genetic engineering of the branched fatty acid metabolic pathway of *Bacillus subtilis* for the overproduction of surfactin C14 isoform. *Biotechnol. J.*, v. 12, p. 1-10, 2017.
- Drakontis, C. E. & Amin S. Biosurfactants: Formulations, Properties, and Applications, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2020.03.013>, 2020.
- Dufour, S.; Deleu, M.; Nott, K.; Wathélet, B.; Thonart, P.; Paquot, M. Hemolytic activity of new linear surfactin analogs in relation to their physico-chemical properties. *BBA-Gen Subjects.*, v.1726, p. 87–95, 2005.
- EPE, 2021. Análise de Conjuntura dos Biocombustíveis - Ano 2020. Empresa de Pesquisa Energética, Rio de Janeiro. Fonte: www.epe.gov.br
- Farias, C. B. B.; Almeida, F. C. G.; Silva, I. A.; Souza, T. C.; Meira, H. M.; Silva, R. C. F. S., *et al.* Production of green surfactants: Market prospects. *Electronic Journal of Biotechnology.*, v. 51, p. 28–39, 2021.
- Fei, D.; Zhou, G.; Yu, Z.; Gang, H.; Liu, J.; Yang, S.; Ye, R.; Mu, B. Low-toxic and nonirritant biosurfactant surfactin and its performances in detergent formulations. *J Surfact Deterg.*, v. 23, p. 109–118, 2020.
- Fenibo, E. O.; Douglas, S. I.; Stanley, H. O. A review on microbial surfactants: production, classifications, properties and characterization. *Journal of Advances in Microbiology*, v. 18(3), p. 1-22, 2019.

- Gomes, M. Z. V. & Nitschke, M. Evaluation of rhamnolipid and surfactin to reduce the adhesion and remove biofilms of individual and mixed cultures of food pathogenic bacteria. *Food Control*, v. 25, p.441–47, 2012.
- Gudiñã, E. J.; Rangarajan, V.; Sen, R.; Rodrigues, L. R. Potential therapeutic applications of biosurfactants. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 34 (12), 2013.
- Gudiña, E. J.; Fernandes, E. C.; Rodrigues, A. I.; Teixeira, J. A.; Rodrigues, L. R. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium. *Front. Microbiol.*, v. 6 (59), 2015.
- Hamoen, L. W.; Venema, G.; Kuipers, O. P. Controlling competence in *Bacillus subtilis*: Shared use of regulators. *Microbiology*, v. 149, p. 9–17, 2003.
- Hu, F.; Liu, Y.; Li, S. Rational strain improvement for surfactin production: enhancing the yield and generating novel structures. *Microb Cell Fact*, v. 18(42), p. 1-13, 2019.
- Jacques, P. Surfactin and other lipopeptides from *Bacillus* spp. In: Soberón-Chávez, G. (Editor) *Biosurfactants*, v. 20, p. 57-91. Springer-Verlag: Berlin, 2011.
- Janek, T.; Gudiña, E. J.; Połomska, X.; Biniarz, P.; Jama, D.; Rodrigues, L. R.; Rymowicz, W.; Lazar, Z. Sustainable Surfactin Production by *Bacillus subtilis* Using Crude Glycerol from Different Wastes. *Molecules*, 26, 3488, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26123488>
- Jiao, S.; Li, X.; Yu, H.; Yang, H.; Li, X., Shen, Z. In situ enhancement of surfactin biosynthesis in *Bacillus subtilis* using novel artificial inducible promoters. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 114(4), p. 832-842, 2017.
- Jung, J.; Yu, K. O.; Ramzi, A.B.; Choe, S.H.; Kim, S.W.; Han, S. O. Improvement of surfactin production in *Bacillus subtilis* using synthetic wastewater by overexpression of specific extracellular signaling peptides, comX and phrC. *Biotechnol Bioeng*, v. 109(9), p. 2349–2356, 2012.
- Kalantari, A.; Chen, T.; Ji, B.; Stancik, I. A.; Ravikumar, V. Conversion of glycerol to 3-hydroxypropanoic acid by genetically engineered *Bacillus subtilis*. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 1-11, 2017.
- Kakinuma, A.; Hori, M.; Isono, M.; Tamura, G.; Arima, K. Determination of amino acid sequence in surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*. *Agric. Biol. Chem.*, v. 33, p. 971–972, 1969^a.
- Kakinuma, A.; Sugino, H.; Isono, M.; Tamura, G.; and Arima, K. Determination of fatty acid in surfactin and elucidation of the total structure of surfactin. *Agric. Biol. Chem.*, v. 33, p. 973–976, 1969^b.
- Kaneda, T. Fatty acids of the genus *Bacillus*: an example of branched-chain preference. *Bacteriol.Rev.*, v. 41, p. 391–418, 1977.
- Koglin, A.; Lohr, F.; Bernhard, F.; Rogov, V. V.; Frueh, D. P.; Strieter, E. R. *et al.* Structural basis for the selectivity of the external thioesterase of the surfactin synthetase. *Nature*, v. 454, p. 907–911, 2008.

Kraas, F. I.; Helmetag, V.; Wittmann, M.; Strieker, M.; Marahiel, M. A. Functional dissection of surfactin synthetase initiation module reveals insights into the mechanism of lipoinitiation. *Chemistry & Biology*, v. 17, p. 872-880, 2010.

Krishnan, N.; Velramar, B.; Velu, R. K. Investigation of antifungal activity of surfactin against mycotoxigenic phytopathogenic fungus *Fusarium moniliforme* and its impact in seed germination and mycotoxicosis. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 155, p. 101–107, 2019.

Lai, C.; Huang, Y.; Wei, Y.; Changa, J. Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, v. 167, p. 609–614, 2009.

Li, X., Yang, H., Zhang, D., Li, X., Yu, H., and Shen, Z. Overexpression of specific proton motive force-dependent transporters facilitate the export of surfactin in *Bacillus subtilis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 42, p. 93–103, 2015.

Liu, Q.; Lin, J.; Wang, W.; Huang, H.; Li, S. Production of surfactin isoforms by *Bacillus subtilis* BS-37 and its applicability to enhanced oil recovery under laboratory conditions. *Biochem. Eng. J.*, v. 93, p. 31–37, 2015.

Liu, J.; Li, W.; Zhu, X.; Zhao, H.; Lu, Y.; Zhang, C.; Lu, Z. Surfactin effectively inhibits *Staphylococcus aureus* adhesion and biofilm formation on surfaces. *Appl Microbiol Biotechnol.*, v. 103(11), p. 4565-4574, 2019.

Liu, K.; Sun, Y.; Cao, M.; Wang, J.; Lu, J. R.; Xu, H. Rational design, properties, and applications of biosurfactants: a short review of recent advances. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 45, p. 57-67, 2020.

López, D.; Vlamakis, H.; Losick, R.; Kolter, R. Paracrine signaling in a bacterium. *Genes Dev.*, v. 23, p. 1631–1638, 2009.

Loiseau, C.; Schlüsselhuber, M.; Bigot, R.; Bertaux, J.; Berjeaud, J. M.; Verdon, J. Surfactin from *Bacillus subtilis* displays an unexpected anti-*Legionella* activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 99, p. 5083–5093, 2015.

Long, X.; He, N.; He, Y.; Jiang, J.; Wu, T. Biosurfactant surfactin with pH-regulated emulsification activity for efficient oil separation when used as emulsifier. *Bioresource Technology*, v. 241, p. 200–206, 2017.

Lu, J.; Wang, H.; Xu, X. Applications of surfactin in cosmetic products. Applicants: Jenn-Kan Lu; UMO International Co., Ltd., New Taipei City (TW). US 2016/0030322 A1. Filed date: July 31, 2014. Publication date: February 4, 2016.

Maass, D.; Moya Ramírez, I.; García Román, M.; Jurado Alameda, E.; Ulson de Souza, A. A.; Borges Valle, J. A., et al. Two-phase olive mill waste, (alpeorujo) as carbon source for biosurfactant production. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, v. 91, p. 1990–1997, 2016.

Marchant, R. & Banat, I. M. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. *Trends in Biotechnology*, v. 30(11), 2012.

Martínez-Nuñez, M. A. & López, V. E. L. Nonribosomal peptides synthetases and their applications in industry. *Sustain Chem Process*, v. 4(13), p. 1-8, 2016.

Menkhaus, M.; Ullrich, C.; Kluge, B.; Vater, J.; Vollenbroich, D.; KAMP, R.M. Structural and functional organization of the surfactin synthetase multienzyme system. *J Biol Chem*, v. 268, p. 7678-7684, 1993.

Mohanty, S. S.; Koul, Y.; Varjani, S.; Pandey, A.; Ngo, H. H.; Chang, J.; Jonathan W. C. Wong, J. W. C.; Bui, X. A critical review on various feedstocks as sustainable substrates for biosurfactants production: a way towards cleaner production. *Microbial Cell Factories.*, v. 20 (120), 2021. doi: 10.1186/s12934-021-01613-3.

Moryl, M.; Spętana, M.; Dziubek, K.; Paraszkiwicz, K.; Różalska, S.; Grażyna A. Płaza, G. A.; Różalski, A. Antimicrobial, antiadhesive and antibiofilm potential of lipopeptides synthesised by *Bacillus subtilis*, on uropathogenic bacteria. *Acta Biochim Pol*, v. 62(4), p. 725-732, 2015.

Moro, G. V.; Almeida, R. T. R.; Napp, A. P.; Porto, C.; Pilau, E. J.; Ludtke, D. S.; Moro, A. V.; Vainstein, M. H. Identification and ultra-high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry characterization of biosurfactants, including a new surfactin, isolated from oil-contaminated environments. *Microbial Biotechnology*, v. 11(4), p. 759–769, 2018.

Moshtagh, B.; Hawboldt, K.; Zhang, B. Optimization of biosurfactant production by *Bacillus Subtilis* N3-1P using the brewery waste as the carbon source. *Environmental Technology*, v. 40 (25), p. 3371-3380, 2019.

Mota, C. J. A.; Pestana, C. F. M. Co-produtos da Produção de Biodiesel. *Rev. Virtual Quim.*, v. 3 (5), p. 416-425, 2011.

Moya Ramírez, I.; Tsaousi, K.; Rudden, M.; Marchant, R.; Jurado Alameda, E.; García Román, M.; *et al.* Rhamnolipid and surfactin production from olive oil mill waste as sole carbon source. *Bioresour. Technol.*, v. 198, p. 231–236, 2015.

Mulligan, C. N.; Yong, R. N.; Gibbs, B. F.; James, S.; Bennett, H. P. J.. Metal removal from contaminated soil and sediments by the biosurfactant surfactin. *Environ. Sci. Technol.*, v. 33., p. 3812–20, 1999.

Nakano, M. M.; Magnuson, R.; Myers, A.; Curry, J.; Grossman, A. D.; Zuber, P. *srfA* is an operon required for surfactin production, competence development, and efficient sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, v. 173(5), p. 1770-1778, 1991.

Nanjundan, J.; Ramasamy, R.; Uthandi, S.; Ponnusamy, M. Antimicrobial activity and spectroscopic characterization of surfactin class of lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* SR1. *Microbial Pathogenesis*, v. 128, p. 374–380, 2019.

Naughton, P. J.; Marchant, R.; Naughton, V.; Banat, I. M. Microbial biosurfactants: current trends and applications in agricultural and biomedical industries. *Journal of Applied Microbiology*, v. 127, p. 12-28, 2019.

Negin, C.; Ali, S.; Xie, Q. Most common surfactants employed in chemical enhanced oil recovery. *Petroleum*, v. 3, p. 197–211, 2017.

Nitschke, M.; & Pastore, G. M. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using cassava-processing effluent. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 112, 163–172, 2004.

Ohadi, M.; Shahravan, A.; Dehghannoudeh, N.; Eslaminejad, T.; Banat, I. M.; Dehghannoudeh, G. Potential use of microbial surfactant in microemulsion drug delivery system: a systematic review. *Drug Des. Devel. Ther.*, v. 14, p. 541–550, 2020.

Ongena, M. & Jacques, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.*, v. 16, p. 115–125, 2008.

Paraszkiewicz, K.; Bernat, P.; Kuśmierska, A.; Chojniak, J.; Płaza, G. Structural identification of lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* strains grown on the media obtained from renewable natural resources. *J. Environ. Manage.*, v. 209, p. 65–70, 2018.

Peypoux, F.; Bonmatin, J. M.; Wallach, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl Microbiol Biotechnol.*, v. 51, p. 553-563, 1999.

Pinto, A. C.; Guarieiro, L. L. N.; Rezende, M. J. C.; Ribeiro, N. M.; Torres, E. A.; Lopes, W. A.; Pereira, P. A. P.; Andrade, J. B. Biodiesel: An Overview. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 16, (6), p. 1313-1330, 2005.

Preecha, C.; Sadowsky, M. J.; Prathuangwong, S. Lipopeptide surfactin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 is required for biocontrol efficacy against *Xanthomonas axonopodis* pv. *Glycines*, *Kasetsart Journal - Natural Science*, v. 44 (1), p. 84–99, 2010.

Quadri, L. E. N.; Weinreb, P. H.; Lei, M.; Nakano, M. M.; Zuber, P.; Walsh, C. T. Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases. *Biochemistry*, v. 37, p. 1585-1595, 1998.

Razafindralambo, H.; Paquot, M.; Baniel, A.; Popineau, Y.; Hbid, C.; Jacques, P.; Thonart, P. Foaming properties of surfactin, a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis*. *J Am Oil Chem Soc.*, v. 73, p. 149–151, 1996.

Razafindralambo, H.; Popineau, Y.; Deleu, M.; Hbid, C. *et al.* Foaming properties of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis*: Effect of lipid and peptide structural attributes. *J. Agric. Food Chem.*, v. 46, p. 911–916, 1998.

Rodrigues, L. R. Microbial surfactants: Fundamentals and applicability in the formulation of nano-sized drug delivery vectors. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 449, p. 304–316, 2015.

Sajna, K. V.; Höfer, R.; Sukumaran, R. K.; Gottumukkala, L. D.; Pandey, A. White Biotechnology in Biosurfactants in *Industrial Biorefineries and White Biotechnology*, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63453-5.00016-1>

Santos, D. K. F.; Rufino, R. D.; Luna, J. M.; Santos, V. A.; Sarubbo, L. A. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, p. 401, 2016.

Santos, V. S. V.; Silveira, E.; Pereira, B. B. Toxicity and applications of surfactin for health and environmental biotechnology. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, v. 21, p. 382-399, 2019.

Sar, P.; Ghosh, A.; Scarso, A.; Saha, B. Surfactant for better tomorrow: Applied aspect of surfactant aggregates from laboratory to industry. *Res. Chem. Intermed.*, v. 45, p. 6021–6041, 2019.

- Serror, P.; Sonenshein, A. L. CodY is required for nutritional repression of *Bacillus subtilis* genetic competence. *J Bacteriol.*, v. 178, p. 5910–5915, 1996.
- Seydlová, G.; Cabala, R.; Svobodová, J. Surfactin – novel solutions for global issues. *Biomedical Engineering, Trends, Research and Technologies*, v. 13, p. 305-330, 2011.
- Seydlová, G. & Svobodová, J. Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications. *Cent. Eur. J. Med.*, v. 3(2), p. 123-133, 2008.
- Schwarzer, D.; Mootz, H. D.; Linne, U.; Marahiel, M. A. Regeneration of misprimed nonribosomal peptide synthetases by type II thioesterases. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99, 14083–14088, 2002.
- Shaligram, N. S. & Singhal, R. S. Surfactin – A Review on biosynthesis, fermentation, purification and applications. *Food Technol. Biotechnol.*, v. 48(2), p. 119–134, 2010.
- Silva, R. C. F. S.; Almeida, D. G.; Brasileiro, P. P. F.; Rufino, R. D.; Luna, J. M.; Sarubbo, L. A. Production, formulation and cost estimation of a commercial biosurfactant. *Biodegradation*, v. 30, p. 191–201, 2019.
- Sousa, M.; Dantas, I. T.; Felix, A. K. N.; Sant'Ana, H. B.; Melo, V. M. M.; Gonçalves, L. R. B. Crude glycerol from biodiesel industry as substrate for biosurfactant production by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, v.57 (2), p. 295-301, 2014.
- Steller, S.; Sokoll, A.; Wilde, C.; Bernhard, F.; Franke, P.; Vater, J. Initiation of surfactin biosynthesis and the role of the SrfD thioesterase Protein. *Biochemistry*, v. 43, p.11331-11343, 2004.
- Sun, H.; Bie, X.; Lu, F.; Lu, Y.; Wu, Y.; Lu, Z. Enhancement of surfactin production of *Bacillus subtilis* fmbR by replacement of the native promoter with the Pspac promoter. *Can. J. Microbiol.*, v. 55, p. 1003-1006, 2009.
- Sussmuth, R. D. & Mainz, A. Nonribosomal peptide synthesis - principles and prospects. *Angew. Chem. Int. Ed.*, v. 56, p. 3770-3823, 2017.
- Théâtre, A.; Cano-Prieto, C.; Bartolini, M.; Laurin, Y.; Deleu, M.; Niehren, J.; *et al.* The surfactin-like lipopeptides from *Bacillus* spp.: natural biodiversity and synthetic biology for a broader application range. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 9:623701, 2021. doi: 10.3389/fbioe.2021.623701
- Tripathy, D. B.; Mishra, A.; Clark, J.; Farmer, T. Synthesis, chemistry, physicochemical properties and industrial applications of amino acid surfactants: A review. *Comptes Rendus Chim.*, v. 21, p. 112–130, 2018.
- Tsuge, K.; Ohata, Y.; Shoda, M. Gene yerP, involved in surfactin self resistance in *Bacillus subtilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 45, p. 3566–3573, 2001.
- Varvaresou, A., and Iakovou, K. Biosurfactants in cosmetics and biopharmaceuticals. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 61, p. 214–223, 2015.
- Yang, F.; Hanna, M. A.; Sun, R. Value-added uses for crude glycerol—a byproduct of biodiesel production. *Biotechnology for Biofuels*, v. 5(13), p. 1-12, 2012.

- Yang, Z.; Zu, Y.; Zhu, J.; Jin, M.; Cui, T.; Long, X. Application of biosurfactant surfactin as a pH-switchable biodemulsifier for efficient oil recovery from waste crude oil. *Chemosphere*, v. 240, p. 1-8, 2020.
- Yeh, E.; Kohli, R. M.; Bruner, S. D.; Walsh, C. T. Type II thioesterase restores activity of a NRPS module stalled with an aminoacyl-S-enzyme that cannot be elongated. *ChemBioChem*, v. 5, p. 1290–1293, 2004.
- Ying, G. G. Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. *Environ. Int.*, v. 32, p. 417–431, 2006.
- Youssef, N. H.; Wofford, N.; McInerney, M. J. Importance of the long-chain fatty acid beta-hydroxylating cytochrome P450 enzyme YbdT for lipopeptide biosynthesis in *Bacillus subtilis* strain OKB105. *Int J Mol Sci.*, v. 12, p. 1767–1786, 2011.
- Yuan, L.; Zhang, S.; Wang, Y.; Li, Y.; Wang, X.; Yang, Q. Surfactin inhibits membrane fusion during invasion of epithelial cells by enveloped viruses. *J. Virol.*, v. 92, p. 1–19, 2018.
- Walia, N. K. & Cameotra, S. S. Lipopeptides: Biosynthesis and Applications. *J Microb Biochem Technol*, v. 7(2), p. 103-107, 2015.
- Wang, Q.; Yu, H.; Wang, M.; Yang, H.; Shen, Z. Enhanced biosynthesis and characterization of surfactin isoforms with engineered *Bacillus subtilis* through promoter replacement and *vitreoscilla* hemoglobin co-expression. *Process Biochemistry*, v. 70, p. 36-44, 2018.
- Wang, X., Cai, T., Wen, W., Ai, J., Ai, J., Zhang, Z., *et al.* Surfactin for enhanced removal of aromatic hydrocarbons during biodegradation of crude oil. *Fuel*, v. 267, 2020. 117272. doi: 10.1016/j.fuel.2020.117272
- Wu, Q.; Zhia, Y.; Xua, Y. Systematically engineering the biosynthesis of a green biosurfactant surfactin by *Bacillus subtilis* 168. *Metabolic Engineering*, v. 52, p. 87–97, 2019.
- Zanotto, A. W.; Valério, A.; Andrade, C. J.; Pastore, C. M. New sustainable alternatives to reduce the production costs for surfactin 50 years after the discovery. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 103, p. 8647-8656, 2019.
- Zhan, Y.; Sheng, B.; Wang, H.; Shi, J.; Cai, D.; Yi, L.; Yang, S.; Wen, Z.; Ma, X.; Chen, S. Rewiring glycerol metabolism for enhanced production of poly- γ -glutamic acid in *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol Biofuels*, v. 11(306), p. 1-14, 2018.
- Zhang, Y.; Nakano, S.; Choi, S. Y.; Zuber, P. Mutational analysis of the *Bacillus subtilis* RNA polymerase σ C-terminal domain supports the interference model of Spx-dependent repression. *J. Bacteriol.*, v. 188, p. 4300–4311, 2006.
- Zhao, H.; Shao, D.; Jiang, C.; Shi, J.; Li, Q.; Huang, Q. *et al.* Biological activity of lipopeptides from *Bacillus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 101, p. 5951–5960, 2017.
- Zhi, Y.; Wu, Q.; Xu, Y. Genome and transcriptome analysis of surfactin biosynthesis in *Bacillus amyloliquefaciens* MT45. *Scientific Reports*, v. 7, p. 1-13, 2017.
- Zhou, D.; Hu, F.; Lin, J.; Wang, W.; Li, S. Genome and transcriptome analysis of *Bacillus velezensis* BS-37, an efficient surfactin producer from glycerol, in response to d-/l-leucine. *MicrobiologyOpen.*, v. 7, p. 1-14, 2018.

Zouari, R.; Besbes, S.; Ellouze-Chaabouni, S.; Ghribi-Aydi, D. Cookies from composite wheat-sesame peels flours: dough quality and effect of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant addition. *Food Chem.*, v. 194, p. 758–769, 2016.

CAPÍTULO 2

Otimização da produção de surfactina por *Bacillus subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA pela metodologia de superfície de resposta

Otimização da produção de surfactina por *Bacillus subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA pela metodologia de superfície de resposta

RESUMO

Biossurfactantes são biologicamente produzidos por microrganismos, sendo biodegradáveis e compatíveis com o meio ambiente, o que os tornam substitutos ideais para os surfactantes químicos. A surfactina apresenta significativa atividade de superfície e ampla gama de aplicações nas áreas terapêutica, alimentícia, agrícola, ambiental e de cosméticos. No entanto, o baixo rendimento e alto custo do processo de produção são fatores que limitam sua produção em larga escala. O uso da glicerina bruta, coproduto da fabricação de biodiesel, como fonte de carbono pode contribuir para a redução do custo de produção da surfactina. Nesse sentido, a metodologia de superfície de resposta (RSM), combinada com o delineamento composto central rotacional (DCCR), foi utilizada para se otimizar a síntese da surfactina pela linhagem geneticamente modificada *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA em meio mineral contendo glicerol, glicose ou ambos simultaneamente como fontes de carbono. O uso de lactose em substituição ao IPTG, indutor do promotor *P_{grac}* inserido no genoma da linhagem para controlar a expressão do operon *srfA*, também foi avaliado. Condições ótimas de concentração de IPTG, momento de indução, concentração da fonte de carbono e período de incubação foram definidas pela RSM e validadas experimentalmente, para cada uma das fontes de carbono. As concentrações de surfactina produzidas em meio mineral contendo glicose, glicerol ou ambas as fontes simultaneamente, nas condições otimizadas, não diferiram estatisticamente ($\approx 3 \text{ g L}^{-1}$). Entretanto, o uso das duas fontes concomitantemente não se mostrou adequado, em decorrência da repressão catabólica exercida pela glicose sobre a via de utilização do glicerol. O rendimento de produção (g surfactina/ g substrato) foi maior quando glicerol foi utilizado como fonte de carbono, indicando que essa fonte de carbono é mais eficiente do que a glicose. *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA é capaz de crescer e produzir surfactina a partir de glicerina bruta. A lactose não foi capaz de induzir a síntese de surfactina por essa linhagem. Nossos resultados comprovam que o uso da glicerina bruta, coproduto da indústria de biodiesel, como fonte de carbono para a produção de surfactina, é uma abordagem promissora para redução dos custos e aumento da viabilidade da produção industrial desse lipopeptídeo.

2.1 INTRODUÇÃO

Surfactantes são moléculas anfifílicas amplamente utilizadas nas indústrias farmacêutica, cosmética, petrolífera, alimentícia, de produtos de limpeza, entre outras (Sar et al., 2019). Entretanto, tais moléculas apresentam as desvantagens de serem tóxicas ao meio ambiente e, em alguns casos, de serem não biodegradáveis (Moro et al., 2018; Naughton et al., 2019). Biossurfactantes são moléculas anfifílicas produzidas por microrganismos (Banat et al., 2010). Em decorrência de suas vantagens comparadas aos surfactantes sintéticos, tais como alta biodegradabilidade, baixa toxicidade e manutenção da atividade em condições extremas de pH, temperatura e salinidade, essas biomoléculas são substitutas ideais para os surfactantes químicos para uma grande diversidade de aplicações (Marchant & Banat, 2012; Moshtagh, 2019; Liu et al., 2020).

A surfactina é um biossurfactante lipopeptídeo produzido, principalmente, por *Bacillus subtilis* (Drakontis & Amin, 2020). Ela é capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 27 mN m⁻¹ (Long et al., 2017), sendo considerada um dos melhores tensoativos estudados até o momento. Além disso, apresenta potencial para aplicação nas áreas médica, farmacêutica, cosmética, agrícola, ambiental, entre outras (Chen et al., 2015). No entanto, a surfactina não consegue competir comercialmente com os surfactantes químicos, visto que sua produção em larga escala ainda é pouco desenvolvida em decorrência do baixo rendimento de produção pelos microrganismos e elevado custo do processo de produção (Hu et al., 2019; Silva et al., 2019; Zanotto et al., 2019).

Em busca de solucionar essa limitação, muitos pesquisadores têm utilizado a engenharia genética para aumentar a produção de surfactina (Jung et al., 2012; Li et al., 2015; Jiao et al., 2017; Wu et al., 2019). A linhagem geneticamente modificada *Bacillus subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA foi desenvolvida por meio da substituição do promotor natural do operon responsável pela síntese da surfactina (*PsrfA*) por um promotor forte e induzível (*Pgrac*), e apresenta alto rendimento de produção de surfactina (Almeida, 2018). A otimização das condições de cultivo, bem como o uso de substratos de baixo custo, tais como resíduos agroindustriais, por linhagens com alto potencial de produção, podem contribuir para tornar o processo de produção de surfactina sustentável e economicamente viável (Mohanty et al., 2021).

O rápido desenvolvimento da indústria de biodiesel foi acompanhado por um aumento no estoque de glicerina bruta, uma vez que a produção desse biocombustível gera cerca de 10% (m/m) de glicerina bruta como principal coproduto (Yang et al., 2012; EPE, 2021). Isso tem

resultado em grande oferta e baixo valor comercial desse composto (Zhan et al., 2018; Janek et al., 2021). O Brasil encontra-se entre os três maiores produtores de biodiesel do mundo, após Indonésia e Estados Unidos (EPE, 2021). Em 2020, o país produziu 6,4 bilhões de litros de biodiesel (ANP, 2021) e estima-se que tenham sido produzidos 640 mil toneladas de glicerina bruta. O termo glicerina bruta ou glicerina loira se refere ao coproduto da produção de biodiesel, que possui aproximadamente 80% de glicerol em sua composição (Mota & Pestana, 2011; EPE, 2021). Glicerol é uma classificação para a glicerina refinada (EPE, 2021).

A glicerina bruta é um substrato atrativo para a produção de surfactina. *Bacillus subtilis* é capaz de, eficientemente, importar e metabolizar o glicerol (Sousa et al., 2014; Kalantari et al., 2017). Em *Bacillus* sp., o glicerol entra nas células por difusão facilitada através da proteína de membrana GlpF (Darbon et al., 2002; Fujita, 2009). Intracelularmente, o glicerol é convertido a dihidroxicetona fosfato a qual é direcionada para as vias glicolítica e gliconeogênese (Darbon et al., 2002; Zhan et al., 2018; Zhou et al., 2018). Além de contribuir para a redução do custo do processo de produção de surfactina, o uso do glicerol como substrato é importante para dar uma destinação a esse resíduo industrial e contribuir para a valorização da cadeia produtiva do biodiesel (Zhan et al., 2018; Zhou et al., 2018).

O estabelecimento de condições ótimas de fermentação para maximizar a produtividade da surfactina é importante para a redução dos custos do processo de produção em larga escala (Moshtagh et al., 2019). Uma vez que os bioprocessos envolvem um grande número de parâmetros inter-relacionados, o monitoramento de cada parâmetro separadamente é demorado e oneroso (Singh et al., 2018). Para analisar o efeito de diversos fatores sobre um processo e determinar as condições para a obtenção de uma resposta ótima, o delineamento composto central rotacional (DCCR), associado à metodologia de superfície de resposta (RSM), é uma combinação bastante eficiente (Moshtagh et al., 2019). Essa combinação fornece uma representação adequada do processo avaliado com a execução de um número menor de unidades experimentais, reduzindo assim o tempo de experimentação e o gasto de consumíveis (Swaminathan, 1997; Kumar et al., 2015; Moshtagh et al., 2019).

Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo investigar o uso da glicerina bruta como fonte de carbono para a produção de surfactina pela linhagem geneticamente modificada *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA. Para isso, a metodologia de superfície de resposta e o delineamento composto central rotacional foram utilizados para otimizar a síntese de surfactina. Os efeitos da fonte de carbono (glicose, glicerol ou ambos simultaneamente), concentração de isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), momento de indução e período de incubação para

maximizar a produção de surfactina foram avaliados e validados experimentalmente. Adicionalmente, a capacidade da linhagem em utilizar a glicerina bruta, proveniente da indústria de biodiesel, foi investigada, bem como a utilização de lactose em substituição ao indutor IPTG.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Microrganismo

Bacillus subtilis LBMMA RI4914 IsrfA é uma linhagem geneticamente melhorada para a produção de surfactina, pertencente ao Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente. A abordagem utilizada para a obtenção dessa linhagem consistiu na substituição do promotor nativo do operon *srfA*, responsável pela síntese da surfactina, pelo promotor forte e induzido por IPTG, *Pgrac* (Almeida, 2018).

Análise prévia por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (UPLC-MS/MS) demonstrou que essa linhagem não produz os lipopeptídeos pertencentes às famílias de fengicina e iturina, produzindo somente surfactina.

2.2.2 Delineamento Composto Central Rotacional e Metodologia de Superfície de Resposta

A fim de otimizar a produção de surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA, o efeito da concentração de IPTG, momento de indução, fonte de carbono e período de incubação foi avaliado. Dois fatores foram investigados por vez usando-se o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), com três repetições no ponto central. Para determinar a fonte de carbono que fornece o maior rendimento de surfactina, a otimização foi realizada para glicose, glicerol ou ambos simultaneamente.

Primeiramente, o efeito e interação da concentração de IPTG e momento de indução (estágio do crescimento, medido pela densidade óptica a 600 nm, para adição do IPTG) foram investigados (Ensaio 1). Com essas condições determinadas, a concentração da fonte de carbono e o período de incubação foram avaliados (Ensaio 2). Finalmente, a combinação de glicose e glicerol no meio de cultivo foi analisada (Ensaio 3). Para a realização do primeiro ensaio, a concentração da fonte de carbono (glicose ou glicerol) foi de 40 g L⁻¹ e as unidades experimentais foram mantidas incubadas por um período de 48 horas. Para o Ensaio 3, o tempo de cultivo foi de 120 horas e a concentração de IPTG utilizada foi a mesma definida para o cultivo em glicerol (Ensaio 1).

Os níveis das variáveis independentes estudados em cada ensaio estão apresentados na Tabela 1, enquanto a matriz do planejamento experimental está descrita na Tabela 2. O diâmetro do halo, obtido pelo teste de espalhamento de óleo em placa, e a concentração de surfactina, determinada por UPLC-MS/MS, foram as variáveis resposta. A relação entre as variáveis independentes e suas respostas foram ajustadas a uma equação polinomial de segunda ordem.

Utilizando-se o software SAEG versão 9.1 (UFV, 2007), os coeficientes das equações foram calculados e os modelos ajustados foram avaliados por análise de variância (ANOVA). As superfícies de resposta foram geradas usando-se o software SigmaPlot versão 11.0. As condições ótimas foram definidas derivando-se as equações de regressão e também pela análise das superfícies de resposta.

Tabela 1. Níveis das variáveis independentes do Delineamento Composto Central Rotacional

Variáveis Independentes		Níveis				
		-1.41	-1	0	+1	+1.41
Ensaio 1	IPTG (mM)	0,1	0,23	0,55	0,87	1,0
	D.O. _{600nm}	0	0,29	1	1,71	2,0
Ensaio 2	Carbono (g L ⁻¹)	20	26	40	54	60
	Período de incubação (h)	24	38	72	106	120
Ensaio 3	Glicose (g L ⁻¹)	0	1,5	5	8,5	10
	Glicerol (g L ⁻¹)	20	24	35	45,5	50

Tabela 2. Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional para os três ensaios

Unidade Experimental	Variável 1	Variável 2	Ensaio 1		Ensaio 2		Ensaio 3	
			IPTG (mM)	D.O. _{600nm}	Carbono (g L ⁻¹)	Tempo (h)	Glicose (g L ⁻¹)	Glicerol (g L ⁻¹)
1	-1	-1	0,23	0,29	26	38	1,5	24
2	-1	+1	0,23	1,71	26	106	1,5	45,5
3	+1	-1	0,87	0,29	54	38	8,5	24
4	+1	+1	0,87	1,71	54	106	8,5	45,5
5	0	-1,41	0,55	0	40	24	5	20
6	0	+1,41	0,55	2,0	40	120	5	50
7	0	0	0,55	1,0	40	72	5	35
8	0	0	0,55	1,0	40	72	5	35
9	0	0	0,55	1,0	40	72	5	35
10	-1,41	0	0,1	1,0	20	72	0	35
11	+1,41	0	1,0	1,0	60	72	10	35

2.2.3 Validação experimental dos modelos estatísticos

Para validação experimental dos resultados obtidos para otimização da produção de surfactina por RSM, as condições definidas como ótimas para o cultivo em glicose, glicerol e glicose + glicerol foram reproduzidas em delineamento inteiramente casualizado, com 3 repetições. Alíquotas foram retiradas ao longo do tempo de cultivo para avaliação do crescimento, por meio da leitura da densidade óptica a 600 nm (D.O._{600nm}), empregando-se o

espectrofotômetro Genesys 10S UV-Vis (Thermo Scientific); da produção de surfactina, pelo teste de espalhamento de óleo em placa; e do consumo de glicose e glicerol, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Ao final do cultivo, a concentração de surfactina para cada uma das condições foi determinada por UPLC-MS/MS. Os resultados foram expressos pela média das três repetições \pm desvio padrão. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparados pelo teste de Bonferroni a 5 % de probabilidade.

2.2.4 Procedimento experimental

2.2.4.1 Produção de surfactina

A linhagem *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA, armazenada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, foi reativada em meio TSA (Difco™ Tryptic Soy Agar), composto por hidrolisado pancreático de caseína (15 g L^{-1}); hidrolisado papaico de soja (5 g L^{-1}); cloreto de sódio (5 g L^{-1}) e ágar bacteriológico (15 g L^{-1}). A placa de Petri foi incubada *overnight* a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para a produção de biossurfactante, uma colônia foi transferida para um frasco Erlenmeyer de 125 mL contendo 30 mL de TSB (Difco™ Tryptic Soy Broth), composto por hidrolisado pancreático de caseína (15 g L^{-1}); hidrolisado papaico de soja (5 g L^{-1}) e cloreto de sódio (5 g L^{-1}), seguindo-se incubação sob agitação de 200 rpm, a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, por aproximadamente 15 horas. Posteriormente, uma alíquota da cultura foi transferida para frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 30 mL de meio mineral, de modo a se obter uma D.O._{600nm} de 0,05, e as unidades experimentais, descritas na Tabela 2, foram incubadas sob agitação de 200 rpm, a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

O meio mineral foi suplementado com glicose e/ou glicerol (Êxodo Científica) como fontes de carbono, nas concentrações definidas no item 2.2.2, e era composto por (g L^{-1}): K_2HPO_4 (13,9); KH_2PO_4 (2,7); extrato de levedura (0,05); NaNO_3 (4,24); glicose e/ou glicerol e 50 mL da solução de micronutrientes composta por (g L^{-1}): EDTA (0,5); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (3,0); $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,5); NaCl (1,0); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,1); $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,1); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1); $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,01); $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,01); NaSeO_4 (0,01); $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,01); $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,02). O meio foi acrescido de IPTG nos momentos e concentrações determinados no item 2.2.2. O período de incubação foi calculado após a adição do IPTG.

2.2.4.2 Recuperação da surfactina e obtenção do extrato bruto

A surfactina foi recuperada por precipitação ácida, segundo método descrito por Vater et al. (2002) com modificações. As culturas foram centrifugadas a $7.840 \times g$ por 15 minutos em

temperatura ambiente. O sobrenadante foi submetido à precipitação ácida pelo ajuste do pH para 2,0 utilizando-se HCl 6 mol L⁻¹, seguindo-se armazenamento a 4 °C por aproximadamente 20 horas. O precipitado foi recuperado por centrifugação a 7.840 x g por 15 minutos e ressuspenso em água destilada, ajustando-se o pH da solução para 7,0 com NaOH 6 mol L⁻¹ e, posteriormente, liofilizado para obtenção do extrato bruto.

2.2.4.3 Teste de espalhamento de óleo em placa

O teste de espalhamento de óleo em placa foi realizado conforme descrito por Morikawa et al. (2000), com modificações. Para o ensaio, uma placa de Petri (150 x 20 mm) foi preenchida com 70 mL de água destilada e 20 µL de petróleo foram adicionados sobre a superfície da água. Posteriormente, 10 µL do sobrenadante da cultura foram adicionados à superfície do óleo e o diâmetro do halo claro formado no filme de óleo foi determinado após 30 segundos, com o auxílio de uma régua.

2.2.4.4 Quantificação da surfactina por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (UPLC-MS/MS)

Para o preparo das amostras, os extratos brutos foram solubilizados em uma solução de água deionizada (Milli-Q) e acetonitrila (40:60 v/v), para uma concentração final de 100 µg mL⁻¹. As soluções foram centrifugadas a 13.000 x g por 10 minutos e os sobrenadantes foram filtrados em filtro com membrana de acetato de celulose de 0,22 µm (Filtrilo) diretamente nos *vials*, os quais foram armazenados a -20 °C. A curva padrão de surfactina foi preparada pela diluição de uma solução estoque (10 mg mL⁻¹) de surfactina (Sigma-Aldrich), em solução de água deionizada (Milli-Q) e acetonitrila (40:60 v/v), de modo a se obterem as concentrações finais de 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,5625; 0,78125 e 0,3906 µg mL⁻¹. As soluções padrão foram filtradas em filtro com membrana de acetato de celulose de 0,22 µm (Filtrilo) diretamente nos *vials* e armazenadas a -20 °C.

A quantificação da surfactina foi realizada utilizando-se o cromatógrafo de fase líquida acoplado ao espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo (modelo 6430 - Agilent), instalado no Núcleo de Análise de Biomoléculas da Universidade Federal de Viçosa. Cinco microlitros de cada amostra e solução padrão foram injetados no cromatógrafo líquido UPLC (modelo 1200 Infinity series). As análises foram realizadas utilizando-se uma coluna Zorbax RRHD SB-CN (150 x 3 mm x 1,8 µm), com fluxo de 0,3 mL min⁻¹, à temperatura de 30 °C, e fase móvel constituída de (A) água deionizada acrescida de 0,1 % de ácido fórmico (v/v) e (B) acetonitrila acrescida de 0,1 % de ácido fórmico (v/v). O gradiente de eluição utilizado foi: 0-

1,5 min, 45-55% (A-B); 1,5-8 min, 30-70%; 8-14 min, 0-100%; 14-16 min, 0-100%; 16-18 min, 45-55%.

O espectrômetro de massas foi operado no modo ESI positivo e a detecção das moléculas de surfactina foi realizada usando-se o método de monitoramento de reações múltiplas (MRM), seguindo as transições listadas na Tabela 3.

Tabela 3. Transições MRM, tempos de retenção e energia de colisão utilizados para análise das moléculas de surfactina por UPLC-MS/MS

Íon precursor [M + H] ⁺ (<i>m/z</i>)	Íon Produto (<i>m/z</i>)	Tempo de retenção (min)	Energia de colisão (eV)
1050.7	699.4	5,38	35
	685.3	5,38	35
	610.4	5,38	35
	596.4	5,38	35
	441.3	5,38	35
1036.7	685.3	5,25	35
	582.4	5,25	35
	596.4	5,25	35
	677.4	5,25	35
	699.4	5,25	35
1022.7	582.4	5,03	35
	664.4	5,03	35
	685.4	5,03	35
	596.4	5,18	35
	671.4	5,18	35
1008.7	441.3	4,89	35
	568.4	4,89	35
	685.4	4,89	35
	582.4	5,04	35
	671.4	5,04	35
994.6	441.3	4,75	35
	554.4	4,75	35
	685.3	4,75	35

Os dados foram processados utilizando-se o software Skyline versão 21.1 conforme descrito por Vital et al. (2019). A transição entre íon precursor e íon produto que apresentou maior intensidade de sinal foi selecionada para a quantificação de cada molécula. Foram construídas curvas padrão para cada íon precursor detectado, com base na abundância relativa de cada molécula no padrão. A abundância relativa de cada molécula foi calculada de acordo com a área encontrada para cada transição escolhida para a quantificação, considerando a soma das áreas de todas as transições, em cada ponto da curva, como 100%. A concentração de cada molécula de surfactina nas amostras foi determinada com base em sua respectiva curva padrão.

A concentração final de surfactina corresponde à soma das concentrações de todas as moléculas detectadas.

2.2.4.5 Avaliação do consumo de glicose e glicerol por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA

A concentração de glicose e glicerol nos meios de cultura obtidos a partir do ensaio de validação do modelo estatístico foi determinada utilizando-se um cromatógrafo líquido LC-20AT (Shimadzu) acoplado a um detector de índice de refração RID-20A (Shimadzu). Alíquotas foram retiradas das culturas a cada 24 horas e centrifugadas a 10.000 x g por 5 minutos para remoção das células. O sobrenadante foi filtrado em filtro com membrana de acetato de celulose de 0,22 µm x 13 mm (Filtrilo) e armazenado a - 20° C até ser analisado.

A análise foi realizada em coluna de troca iônica Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm x 9 µm), com fase móvel constituída de H₂SO₄ 5 mM, fluxo de 0,6 mL min⁻¹ a 60°C. A concentração dos compostos foi determinada com base nas curvas padrão de glicose (2,5 a 40 g L⁻¹) e glicerol (2,19 a 35 g L⁻¹).

2.2.5 Produção de surfactina a partir de glicerina bruta da indústria de biodiesel

A capacidade de *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA crescer e produzir surfactina a partir de glicerina bruta como substrato foi investigada utilizando-se dois lotes de glicerina bruta fornecidos pelas empresas Petrobras Biocombustível S.A. – PBio (Montes Claros, MG) e Olfar S.A. – Alimento e Energia (unidade de Porto Real, RJ). As características das amostras de glicerina estão apresentadas na Tabela 4.

A condição definida como ótima pela RSM para o cultivo em glicerol foi reproduzida utilizando-se as glicerinas provenientes das indústrias de biodiesel. Para isso, uma colônia de *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA foi transferida para tubos de vidro contendo 5 mL de TSB (Difco™ Tryptic Soy Broth), seguindo-se incubação a 30 °C sob agitação de 200 rpm por aproximadamente 18 horas. Em seguida, uma alíquota da cultura foi transferida para frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 30 mL de meio mineral (composição descrita no item 2.2.4.1) e glicerina bruta como única fonte de carbono. Os frascos foram incubados a 30 °C, sob agitação de 200 rpm por 120 horas. Após 12 horas de cultivo, o IPTG (0,78 mM) foi adicionado ao meio para indução da produção de surfactina. Duas soluções contendo glicerol 50 % (m/v) foram preparadas diluindo-se as amostras de glicerina bruta em água destilada. As soluções foram autoclavadas a 121 °C por 15 minutos e adicionadas ao meio mineral autoclavado para se obter a concentração desejada de glicerol.

O crescimento das culturas foi avaliado ao longo do tempo pela leitura da D.O._{600nm} e a produção de surfactina, pelo teste de espalhamento de óleo em placa. Os ensaios foram realizados em delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições. Os resultados foram expressos pela média \pm desvio padrão.

Tabela 4. Características das amostras de glicerina bruta fornecidas pelas empresas Petrobras Biocombustível S.A. e Olfar S.A.

Característica	Glicerina PBio S.A.	Glicerina Olfar S.A.	Unidade
Matéria Orgânica Não Glicerina	5,54	3,47	% (m/m)
Glicerol Total	75	80,0253	% (m/m)
Massa específica a 20 °C	1,2447	1,25	g/cm ³
Umidade	14,627	14,1	% (m/m)
pH	7	5	NA
Cinzas em glicerina	4,83	2,4175	% (m/m)
Teor de ácido graxo	NI	0	%

*NI = não informado; NA = não aplicável

2.2.6 Avaliação do uso da lactose como indutor em substituição ao IPTG

Para investigar o uso da lactose em substituição ao IPTG como indutor para a síntese da surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA, foi realizado um ensaio utilizando-se o delineamento composto central rotacional para investigar o efeito da concentração de lactose e do momento de adição da mesma ao meio de cultura (medido pela D.O._{600nm}) sobre a produção de surfactina. Os níveis das variáveis independentes e a matriz do planejamento experimental estão apresentados nas Tabelas 5 e 6, respectivamente. A variável resposta foi o diâmetro do halo obtido pelo teste de espalhamento de óleo em placa.

O cultivo do microrganismo foi realizado conforme descrito no item 2.2.4.1. A fonte de carbono utilizada foi o glicerol comercial, de acordo com a concentração e tempo de cultivo definidos pela otimização por RSM. Um tratamento controle, contendo lactose como única fonte de carbono, foi também incluído no experimento.

Tabela 5. Níveis das variáveis independentes usados no DCCR para investigação do uso da lactose como indutor

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Lactose (mM)	1	4,5	13	21,5	25
D.O._{600nm}	0	0,29	1	1,71	2,0

Tabela 6. Matriz do DCCR para investigação do uso da lactose como indutor

Unidade Experimental	Variável 1	Variável 2	Lactose (mM)	D.O._{600nm}
1	-1	-1	4,5	0,29
2	-1	+1	4,5	1,71
3	+1	-1	21,5	0,29
4	+1	+1	21,5	1,71
5	0	-1,41	13	0
6	0	+1,41	13	2,0
7	0	0	13	1,0
8	0	0	13	1,0
9	0	0	13	1,0
10	-1,41	0	1	1,0
11	+1,41	0	25	1,0

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Otimização da produção de surfactina pela Metodologia de Superfície de Resposta

Os valores das respostas (diâmetro do halo de espalhamento de óleo e concentração de surfactina), obtidos para os três ensaios, estão representados nas Tabelas 7 a 9.

Tabela 7. Matriz experimental do DCCR para se avaliar o efeito da concentração de IPTG e momento da adição do indutor sobre a produção de surfactina a partir de glicose ou glicerol como fontes de carbono (Ensaio 1) e respostas obtidas

Unidade Experimental	Variáveis independentes		Resposta 1 Diâmetro do halo (cm)		Resposta 2 Surfactina (g L ⁻¹)	
	IPTG (mM)	D.O. _{600nm} *	Glicose	Glicerol	Glicose	Glicerol
1	0,23	0,29	8,32	0,47	3,51	0,26
2	0,23	1,71	7,9	0,75	3,80	0,61
3	0,87	0,29	6,75	1,42	1,89	0,58
4	0,87	1,71	8,4	1,275	3,23	0,33
5	0,55	0	5,4	1,02	3,19	0,31
6	0,55	2,0	6,8	1,72	1,60	0,49
7	0,55	1,0	8,075	1,46	4,32	0,32
8	0,55	1,0	8,125	1,58	3,58	0,26
9	0,55	1,0	8,4	1,3	2,86	0,07
10	0,1	1,0	4,8	0,37	1,62	0,03
11	1,0	1,0	8,05	1,62	2,78	0,71

* Corresponde à fase do crescimento microbiano em que o indutor foi adicionado ao meio de cultivo

Tabela 8. Matriz experimental do DCCR para se avaliar o efeito da concentração da fonte de carbono e período de incubação sobre a produção de surfactina a partir de glicose ou glicerol como fontes de carbono (Ensaio 2) e respostas obtidas

Unidade Experimental	Variáveis independentes		Resposta 1 Diâmetro do halo (cm)		Resposta 2 Surfactina (g L ⁻¹)	
	Carbono (g L ⁻¹)	Tempo (h)	Glicose	Glicerol	Glicose	Glicerol
1	26	38	8,45	1,5	0,28	0,55
2	26	106	12,73	9,5	4,18	2,11
3	54	38	7,08	1,68	1,97	0,32
4	54	106	11,05	3,53	4,83	1,17
5	40	24	5,1	0,83	1,13	0,03
6	40	120	13,03	8,55	3,02	1,43
7	40	72	11,68	1,55	1,74	0,20
8	40	72	12,22	1,43	2,65	0,39
9	40	72	12,15	2,43	3,95	0,37
10	20	72	8,33	2,58	2,86	0,83
11	60	72	10,8	2,28	3,12	0,24

Tabela 9. Matriz experimental do DCCR para se avaliar o efeito da concentração de glicose e concentração de glicerol adicionados conjuntamente ao meio de cultura sobre a produção de surfactina (Ensaio 3) e respostas obtidas

Unidade Experimental	Variáveis independentes		Resposta 1 Diâmetro do halo (cm)	Resposta 2 Surfactina (g L ⁻¹)
	Glicose (g L ⁻¹)	Glicerol (g L ⁻¹)		
1	1,5	24	7,7	2,19
2	1,5	45,5	5,25	0,84
3	8,5	24	9,05	1,20
4	8,5	45,5	8,53	0,43
5	5	20	8,1	0,06
6	5	50	7,03	0,34
7	5	35	8,33	0,73
8	5	35	8,43	0,30
9	5	35	7,35	1,02
10	0	35	5,73	0,51
11	10	35	9,58	2,42

Análises de regressão múltipla foram realizadas para elaboração dos modelos preditivos das respostas em função das variáveis independentes. As equações apresentam somente os coeficientes estatisticamente significativos a um nível de confiança de 90%, com exceção da Equação 6.

Primeiramente, serão abordados os resultados referentes ao espalhamento de óleo como a variável resposta. Para o Ensaio 1, o qual corresponde à avaliação da influência da concentração de IPTG e do momento de adição do mesmo (D.O._{600nm}) sobre a produção de surfactina, não foi possível obter um modelo ajustado para o experimento realizado com glicose como fonte de carbono. É possível inferir, estatisticamente, que para qualquer uma das condições avaliadas, a produção de biosurfactante é idêntica (média das respostas = 7,36 cm) (Figura 1A). No entanto, é possível observar que algumas condições possibilitaram a obtenção de diâmetros consideravelmente maiores que outras (Tabela 7). Desse modo, escolheu-se, dentre as maiores respostas, a condição referente à unidade experimental 1 para a realização dos experimentos seguintes, por corresponder a uma baixa concentração de IPTG e sua adição ainda na fase inicial do crescimento microbiano.

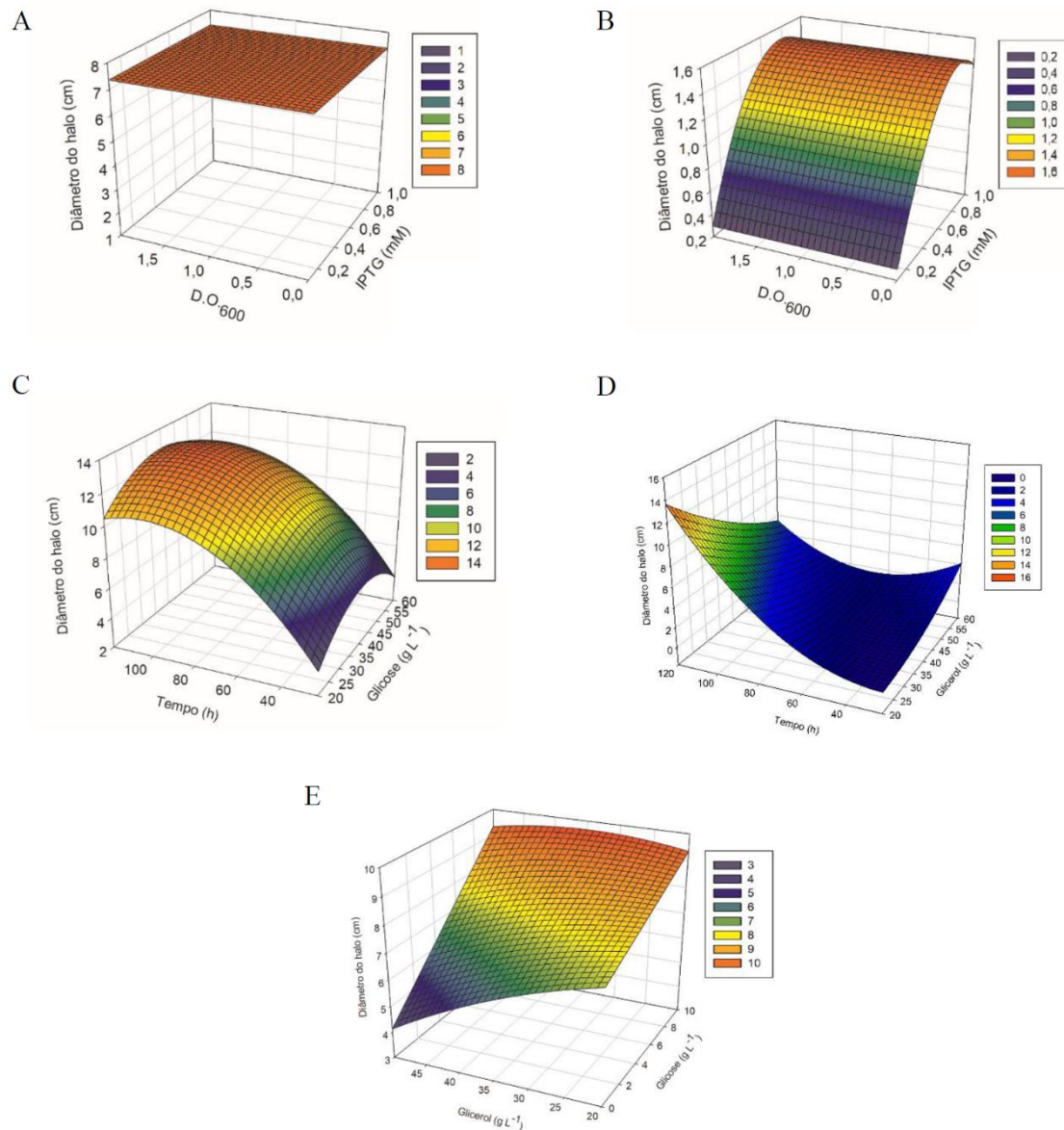


Figura 1. Superfícies de resposta geradas pelos modelos ajustados a partir dos dados de diâmetro de halo de espalhamento de óleo. A: Ensaio 1 com glicose; B: Ensaio 1 com glicerol; C: Ensaio 2 com glicose; D: Ensaio 2 com glicerol; E: Ensaio 3 com glicose e glicerol.

O modelo ajustado para o Ensaio 1 com glicerol como fonte de carbono está representado pela Equação 1. Os termos linear e quadrático da fase do crescimento em que o indutor foi adicionado ao meio de cultivo (densidade óptica) e da interação entre concentração de IPTG e densidade óptica não foram significativos estatisticamente, sendo esses parâmetros excluídos da equação. Desse modo, o modelo indica que o momento de indução e sua interação com a concentração de IPTG não têm efeito sobre a produção de surfactina. Sob as condições analisadas, somente a concentração de IPTG exerce influência sobre a produção de surfactina,

avaliada pelo teste de espalhamento de óleo, quando *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA é cultivada em meio mineral contendo glicerol como fonte de carbono. O diâmetro do halo aumenta à medida que a concentração de IPTG aumenta até atingir o máximo, em 0,78 mM (Figura 1B). A densidade óptica de 0,29 para adição do IPTG, correspondente à definida no experimento com glicose, foi a escolhida para realização dos ensaios posteriores para padronização dos experimentos.

$$DH = -0,08066 + 4,01168A - 2,54784A^2 \quad (1)$$

$$R^2 = 0,7398$$

onde DH é o diâmetro do halo (cm) e A é a concentração de IPTG (mM).

Os valores de concentração de IPTG e D.O._{600nm} definidos nos ensaios anteriores foram mantidos para a realização do Ensaio 2, para avaliação da influência da fonte de carbono e do período de incubação sobre a produção de surfactina. A Equação 2 descreve o modelo ajustado a partir dos diâmetros de halo obtidos no Ensaio 2 quando glicose foi utilizada como fonte de carbono, a qual contém apenas os termos estatisticamente significativos. O modelo mostra que ambos os fatores (concentração de glicose e período de incubação) influenciam a produção de surfactina (Figura 1C). A condição ótima (40 g L⁻¹ de glicose e 102 horas de cultivo) para obtenção do maior diâmetro e, conseqüentemente, maior produção de surfactina, foi obtida resolvendo-se a equação.

$$DH = -8,2354 + 0,4464B + 0,2407C - 0,0055B^2 - 0,0012C^2 \quad (2)$$

$$R^2 = 0,8947$$

onde DH é o diâmetro do halo (cm); B é a concentração de glicose (g L⁻¹) e C é o período de incubação (h).

O modelo obtido para o Ensaio 2 com glicerol como fonte de carbono está representado pela Equação 3. A partir do modelo obtido não foi possível determinar os valores de concentração de glicerol e tempo de cultivo que resultam em maior valor de diâmetro de espalhamento de óleo e máxima produção de surfactina. No entanto, a superfície de resposta demonstra que a produção máxima de surfactina pode ser alcançada quando *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA é cultivada em baixa concentração de glicerol por um longo período de tempo

(Figura 1D). Desse modo, definiu-se como a melhor condição para a produção de surfactina a concentração de 20 g L⁻¹ de glicerol e tempo de incubação de 120 horas. A incubação das células além desse período foi avaliada e não houve aumento da produção de surfactina (Figura 2).

$$DH = 0,1284 + 0,0021D^2 + 0,0014C^2 - 0,0031DC \quad (3)$$

$$R^2 = 0,9436$$

onde DH é o diâmetro do halo (cm); D é a concentração de glicerol (g L⁻¹) e C é o período de incubação (h).

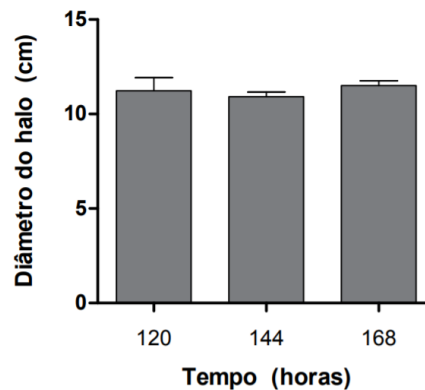


Figura 2. Produção de surfactina (estimada pelo diâmetro do halo de espalhamento de óleo) por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrFA em meio mineral contendo 20 g L⁻¹ de glicerol como fonte de carbono durante 168 horas. Os resultados foram expressos pela média \pm desvio padrão dos valores obtidos a partir de três repetições. Valores de média obtidos para cada tempo não diferem estatisticamente pelo teste de Bonferroni a 5% de probabilidade.

A Equação 4 representa o modelo ajustado para o Ensaio 3, o qual teve como objetivo investigar o efeito do uso de glicose e glicerol simultaneamente no meio de cultura sobre a produção de surfactina. O gráfico de superfície de resposta indica que concentrações mais altas de glicose possibilitam maior produção de surfactina (Figura 1E). Para encontrar os valores ótimos dos fatores testados resolvendo-se a equação, foi necessário fixar um valor para a concentração de glicose (B). Assim, $B = 10$ foi fixado por corresponder ao maior valor dentro da faixa analisada, e $D = 35$ foi encontrado. Portanto, a melhor combinação das duas fontes de carbono para a produção máxima de surfactina foi definida como 10 g L⁻¹ de glicose e 35 g L⁻¹ de glicerol. O uso de concentrações mais altas de glicose em conjunto com glicerol não é interessante do ponto de vista econômico para a produção de surfactina, uma vez que a glicose

é um substrato de custo elevado. Em decorrência disso, decidiu-se não avaliar uma faixa maior de concentração de glicose.

$$DH = 7,8717 - 0,0015D^2 + 0,0104BD \quad (4)$$
$$R^2 = 0,9272$$

onde DH é o diâmetro do halo (cm); B é a concentração de glicose (g L^{-1}), e D é a concentração de glicerol (g L^{-1}).

Para o diâmetro do halo como variável resposta, as condições definidas como ótimas para a produção máxima de surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA cultivada em meio mineral contendo glicose como fonte de carbono (valor predito para o diâmetro do halo = 12,9 cm) são: adição de 0,23 mM de IPTG no momento em que a $D.O_{.600\text{nm}}$ corresponde a aproximadamente 0,29; concentração de glicose correspondente a 40 g L^{-1} e período de incubação de 102 horas. Para o cultivo em glicerol como fonte de carbono, as condições que possibilitam a maior produção de surfactina (valor predito para o diâmetro do halo = 13,6 cm) são: adição de 0,78 mM de IPTG no momento em que a $D.O_{.600\text{nm}}$ corresponde a aproximadamente 0,29; concentração de glicerol de 20 g L^{-1} e período de incubação de 120 horas. Para a produção de surfactina a partir de ambas as fontes de carbono (valor predito para o diâmetro do halo = 9,7 cm) as condições definidas como ótimas são: adição de 0,78 mM de IPTG no momento em que a $D.O_{.600\text{nm}}$ corresponde a aproximadamente 0,29; concentração de glicose de 10 g L^{-1} ; concentração de glicerol correspondente a 35 g L^{-1} e tempo de incubação de 120 horas.

Em concordância com o resultado observado para o Ensaio 1 com glicose como fonte de carbono e o diâmetro do halo como resposta, não foi possível ajustar um modelo estatístico quando a concentração de surfactina, determinada por UPLC-MS/MS, foi a variável resposta avaliada. Pode-se inferir que, para qualquer uma das condições avaliadas, a produção de surfactina corresponde a $2,94 \text{ g L}^{-1}$ (média das respostas) (Figura 3A). Conforme já havia sido definido a partir dos dados de espalhamento de óleo, a condição referente à unidade experimental 1 (concentração de IPTG de 0,23 mM e $D.O_{.600\text{nm}}$ equivalente a 0,29, Tabela 7) foi mantida para realização do Ensaio 2.

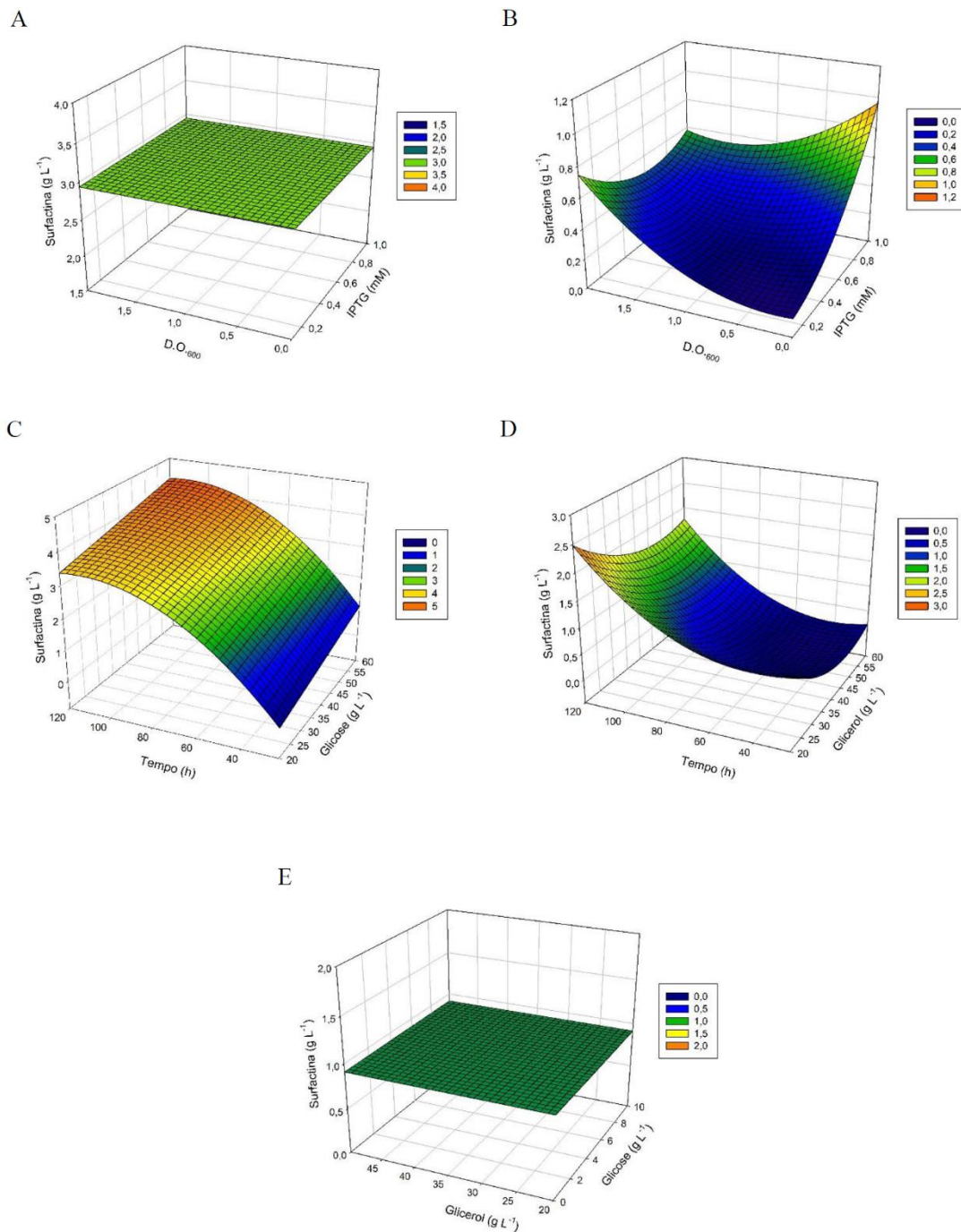


Figura 3. Superfícies de resposta geradas pelos modelos ajustados a partir dos dados de concentração de surfactina determinada por UPLC-MS/MS. A: Ensaio 1 com glicose; B: Ensaio 1 com glicerol; C: Ensaio 2 com glicose; D: Ensaio 2 com glicerol; E: Ensaio 3 com glicose e glicerol.

O modelo ajustado para o Ensaio 1 com glicerol como fonte de carbono foi obtido após a exclusão da unidade experimental 9 (repetição) (Tabela 7), e está representado pela Equação 5. Diferentemente do observado no modelo obtido para o diâmetro do halo como resposta (Equação 1), ambos os fatores, densidade óptica para adição do IPTG e concentração de IPTG,

influenciam a concentração de surfactina produzida. Não foi possível determinar os valores ótimos dos fatores para a produção máxima de surfactina a partir do modelo obtido. Entretanto, analisando-se o gráfico de superfície de resposta, observa-se uma tendência para aumento da produção de surfactina com o aumento da concentração de IPTG, em baixas densidades celulares (Figura 3B). Uma vez que não foi possível obter um valor ótimo de concentração de IPTG, o valor de 0,78 mM, determinado a partir da Equação 1, foi mantido para a realização dos ensaios seguintes, bem como a densidade óptica equivalente a 0,29 para padronização dos experimentos.

$$SU = 0,11376 + 0,848729 A^2 + 0,18398 E^2 - 0,56041 AE \quad (5)$$

$$R^2 = 0,6587$$

onde SU é a concentração de surfactina ($g L^{-1}$), A é a concentração de IPTG (mM) e E é a $D.O._{600nm}$ para adição de IPTG (momento de indução).

A Equação 6 representa o modelo ajustado para o Ensaio 2 com glicose como fonte de carbono, após a retirada da unidade experimental 7 (repetição) (Tabela 8), o qual contém apenas os coeficientes significativos estatisticamente. De acordo com o modelo, ambos os fatores (concentração de glicose e período de incubação) influenciam a produção de surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA. Derivando-se a equação, foi possível definir o período de incubação que proporciona a maior produção de surfactina. Este se mostrou próximo do determinado a partir da Equação 3 e corresponde a 111 horas. Com relação à concentração de glicose, a superfície de resposta mostra que quanto maior a concentração de glicose, maior é a produção de surfactina (Figura 3C). Desse modo, pode-se definir como condição ótima para obtenção de maior concentração de surfactina, a concentração de $60 g L^{-1}$ de glicose (maior concentração dentro da faixa avaliada) e o tempo de 111 horas de cultivo.

$$SU = -2,5338 + 0,023944B^* + 0,0981588C - 0,00044059C^2 \quad (6)$$

$$R^2 = 0,7768$$

$$*(p\text{-valor} < 0,15)$$

onde SU é a concentração de surfactina ($g L^{-1}$); B é a concentração de glicose ($g L^{-1}$) e C é o período de incubação (h).

O modelo ajustado para o Ensaio 2 com glicerol como fonte de carbono está representado pela Equação 7. Assim como para o modelo ajustado a partir das respostas provenientes do espalhamento de óleo (Equação 3), não foi possível determinar os valores de concentração de glicerol e período de incubação que resultam em maior produção de surfactina a partir desse modelo. No entanto, analisando-se a superfície de resposta, concluiu-se que a maior concentração de surfactina pode ser alcançada com a mais baixa concentração de glicerol (20 g L^{-1}) e o maior período de incubação (120 horas) (Figura 3D), em concordância com o definido anteriormente quando se utilizou o diâmetro do halo como variável resposta.

$$SU = 2,89612 - 0,0998399D + 0,00102532D^2 - 0,0222457C + 0,000266471C^2 \quad (7)$$

$$R^2 = 0,8723$$

onde SU é a concentração de surfactina (g L^{-1}); D é a concentração de glicerol (g L^{-1}) e C é o período de incubação (h).

Para o Ensaio 3, em que se avaliou o uso de glicose e glicerol conjuntamente como fonte de carbono, não foi possível ajustar um modelo matemático a partir das respostas obtidas por UPLC-MS/MS. Estatisticamente, pode-se inferir que para todas as combinações de concentrações das fontes de carbono avaliadas, a produção de surfactina é a mesma (média das respostas = $0,91 \text{ g L}^{-1}$) (Figura 3E). Esse resultado não condiz com o modelo ajustado para o espalhamento de óleo. No entanto, em concordância com os resultados obtidos para as respostas de espalhamento, a unidade experimental 11, que corresponde a 10 g L^{-1} de glicose e 35 g L^{-1} de glicerol, apresentou maior concentração de surfactina que as demais (Tabela 9), sendo esta condição a escolhida como ótima para a produção do biossurfactante.

Para a concentração de surfactina como variável resposta, as condições definidas como ótimas para a produção máxima de surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA cultivada em meio mineral contendo glicose como fonte de carbono (resposta predita = $4,37 \text{ g L}^{-1}$) são: adição de $0,23 \text{ mM}$ de IPTG no momento em que a $D.O_{600\text{nm}}$ corresponde a aproximadamente $0,29$; concentração de glicose correspondente a 60 g L^{-1} e período de incubação de 111 horas. Para o cultivo em glicerol como fonte de carbono, as condições definidas como ótimas (resposta predita = $2,5 \text{ g L}^{-1}$) foram as mesmas determinadas para o espalhamento de óleo: adição de $0,78 \text{ mM}$ de IPTG no momento em que a $D.O_{600\text{nm}}$ corresponde a aproximadamente $0,29$; concentração de glicerol de 20 g L^{-1} e período de incubação de 120 horas. Para a produção de surfactina a partir de ambas as fontes de carbono, as condições que possibilitam a maior

produção de surfactina ($2,42 \text{ g L}^{-1}$) são: adição de $0,78 \text{ mM}$ de IPTG no momento em que a $D.O_{600nm}$ corresponde a aproximadamente $0,29$; concentração de glicose de 10 g L^{-1} ; concentração de glicerol correspondente a 35 g L^{-1} e tempo de incubação de 120 horas.

Os resultados da análise de variância (ANOVA) dos modelos quadráticos de superfície de resposta obtidos a partir dos dados de espalhamento de óleo e de concentração de surfactina estão apresentados nas Tabelas 10 e 11, respectivamente. A ANOVA é crucial para testar a significância e a adequação de um modelo. Os valores de F e os p -valores obtidos implicam que todos os modelos foram significativos (p -valor $< 0,01$ para os modelos obtidos a partir do espalhamento de óleo; e p -valor $< 0,10$ para os modelos obtidos a partir da concentração de surfactina). Os valores obtidos para o coeficiente de determinação (R^2), o qual mede a qualidade do modelo ajustado, foram considerados adequados para todos os modelos e para explicar a variabilidade inerente aos processos biológicos.

Tabela 10. ANOVA para os modelos quadráticos obtidos a partir da variável resposta diâmetro de halo

	Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Signif.
Ensaio 1 (glicerol)	Regressão	2	1,603861	0,8019303	11,38	0.0046
	Resíduos	8	0,5639939	0,07049924		
Ensaio 2 (glicose)	Regressão	4	60,70762	15,17691	12,74	0.0046
	Resíduos	6	7,145744	1,190957		
Ensaio 2 (glicerol)	Regressão	3	81,97902	27,32634	39,04	0.0001
	Resíduos	7	4,899178	0,6998825		
Ensaio 3	Regressão	2	16,29855	8,149276	50,98	0.0000
	Resíduos	8	1,278721	0,1598401		

Tabela 11. ANOVA para os modelos quadráticos obtidos a partir da variável resposta concentração de surfactina

	Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Signif.
Ensaio 1 (glicerol)	Regressão	3	0,2439250	0,08130832	3,86	0,0749
	Resíduos	6	0,1263476	0,02105794		
Ensaio 2 (glicose)	Regressão	3	13,47728	4,492427	6,96	0,0222
	Resíduos	6	3,870461	0,6450769		
Ensaio 2 (glicerol)	Regressão	4	3,513728	0,8784319	10,25	0,0075
	Resíduos	6	0,5142051	0,08570086		

As respostas previstas para as condições ótimas foram validadas experimentalmente (Tabela 12). Os resultados revelam uma boa correlação entre os valores previstos pelo modelo estatístico e os valores experimentais e confirmam a validade dos modelos, exceto para o

modelo representado pela Equação 6, o qual não foi validado. Pode-se afirmar que os modelos são representativos da produção de surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA nas condições de cultivo avaliadas. A condição reproduzida para o cultivo em glicose foi a definida a partir dos dados de espalhamento de óleo (40 g L⁻¹ de glicose e 102 horas de incubação). A validação da condição definida como ótima para o cultivo em glicose a partir dos dados de concentração de surfactina (60 g L⁻¹ de glicose e 111 horas de incubação) ainda será realizada. A partir deste dado, será avaliada qual a melhor condição para a produção de surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA utilizando-se glicose como fonte de carbono. Até o momento, consideraremos a condição definida a partir dos dados de espalhamento de óleo como sendo a ótima.

Tabela 12. Valores preditos pelos modelos e valores reais obtidos como resultado do cultivo em glicose, glicerol ou ambos nas condições definidas como ótimas

Resposta	Glicose		Glicerol		Glicose + Glicerol	
	Predito	Experimental	Predito	Experimental	Predito	Experimental
Diâmetro do halo (cm)	12,9	13,2	13,6	12	9,7	9,8
Concentração de surfactina (g L⁻¹)	3,85	3,5	2,5	3,3	NA	2,9

*NA: não se aplica

Em *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA, a síntese de surfactina é controlada pelo promotor *Pgrac*, o qual é induzido por IPTG. Para se determinar o melhor funcionamento desse sistema de expressão, o qual se baseia no sistema de expressão do operon *lac* de *Escherichia coli*, fatores como a concentração do indutor (IPTG) e o momento de indução (estágio do crescimento celular para adição do indutor) devem ser investigados (Donovan et al., 1996). A avaliação das condições de indução da síntese de surfactina para *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA cultivada em meio mineral contendo glicose como fonte de carbono demonstrou que não há diferença estatística entre as concentrações de IPTG avaliadas. O resultado é relevante, uma vez que demonstra que uma baixa concentração de IPTG (0,23 mM) é suficiente para induzir a produção de surfactina pela linhagem avaliada, desde que a indução se inicie a partir de um nível mínimo de crescimento celular. Em concordância com os nossos resultados, Gooma et al. (2017) não observaram diferença significativa na produção de isopreno por *B. subtilis* e *Bacillus licheniformis* quando diferentes concentrações de IPTG foram testadas.

O uso de baixa concentração de IPTG foi previamente reportado por Sun et al. (2009), os quais observaram que a produção de surfactina foi maior quando 0,3 mM de IPTG foi

utilizado e que concentrações maiores de IPTG não aumentaram o nível de indução significativamente. A utilização de baixa concentração de IPTG é atrativa do ponto de vista industrial, uma vez que esse composto possui valor comercial considerável. Mesmo sendo maior que a concentração definida para o cultivo em glicose, a concentração do indutor definida para o cultivo em glicerol é considerada aceitável do ponto de vista econômico, sendo mais baixa do que a concentração padrão utilizada em processos industriais (1 mM) para indução da expressão de proteínas (Werin, 2019). Ademais, o baixo valor comercial da glicerina bruta pode compensar economicamente a concentração mais alta de IPTG necessária, se comparado com o cultivo em glicose.

A produção de biossurfactantes é influenciada por diversos fatores, tais como tipo e concentração das fontes de carbono e de nitrogênio, temperatura, pH, disponibilidade de oxigênio, agitação e período de incubação (Fenibo et al., 2019; Jahan et al., 2020), sendo a fonte de carbono presente no meio de cultura um dos fatores mais importantes (Imura et al., 2018; Radzuan et al., 2018). Esses fatores afetam a produção de biossurfactante principalmente por afetarem o crescimento celular (Chen et al., 2015). Os constituintes do meio, especialmente a fonte de carbono, exercem papel crucial no perfil e na quantidade das diferentes moléculas de biossurfactantes produzidas por uma linhagem (Singh et al., 2018; Sun et al., 2019; Janek et al., 2021). Para alcançar uma produção de surfactina economicamente viável, a otimização das condições de cultivo é essencial (Moshtagh et al., 2019). Isso pode ser comprovado pelo grande número de trabalhos que realizaram a otimização dos fatores que influenciam a produção de biossurfactantes encontrados na literatura (Kumar et al., 2015; Mouafi et al., 2016; Almeida et al., 2017; Ghazala et al., 2019; Moshtagh et al., 2019).

2.3.2 Crescimento celular, produção de surfactina e consumo do substrato por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA nas condições otimizadas

B. subtilis LBBMA RI4914 IsrfA foi cultivada em meio mineral contendo glicose, glicerol ou ambos como fonte de carbono nas condições definidas como ótimas anteriormente. Os perfis cinéticos do crescimento celular, produção de surfactina e consumo do substrato estão apresentados na Figura 4. O tempo zero corresponde ao momento de adição do IPTG ($D.O_{600nm} \approx 0,29$). As curvas de crescimento e produção de surfactina mostraram um comportamento semelhante para os cultivos realizados em glicose e glicerol + glicose simultaneamente. Observou-se um aumento linear da produção de biossurfactante e de biomassa (estimada pela densidade óptica) até o tempo de 48 horas. Posteriormente, o crescimento entrou em declínio

(fase de morte) (Figura 4A) ou atingiu a fase estacionária (Figura 4C) enquanto a produção de surfactina continuou a aumentar.

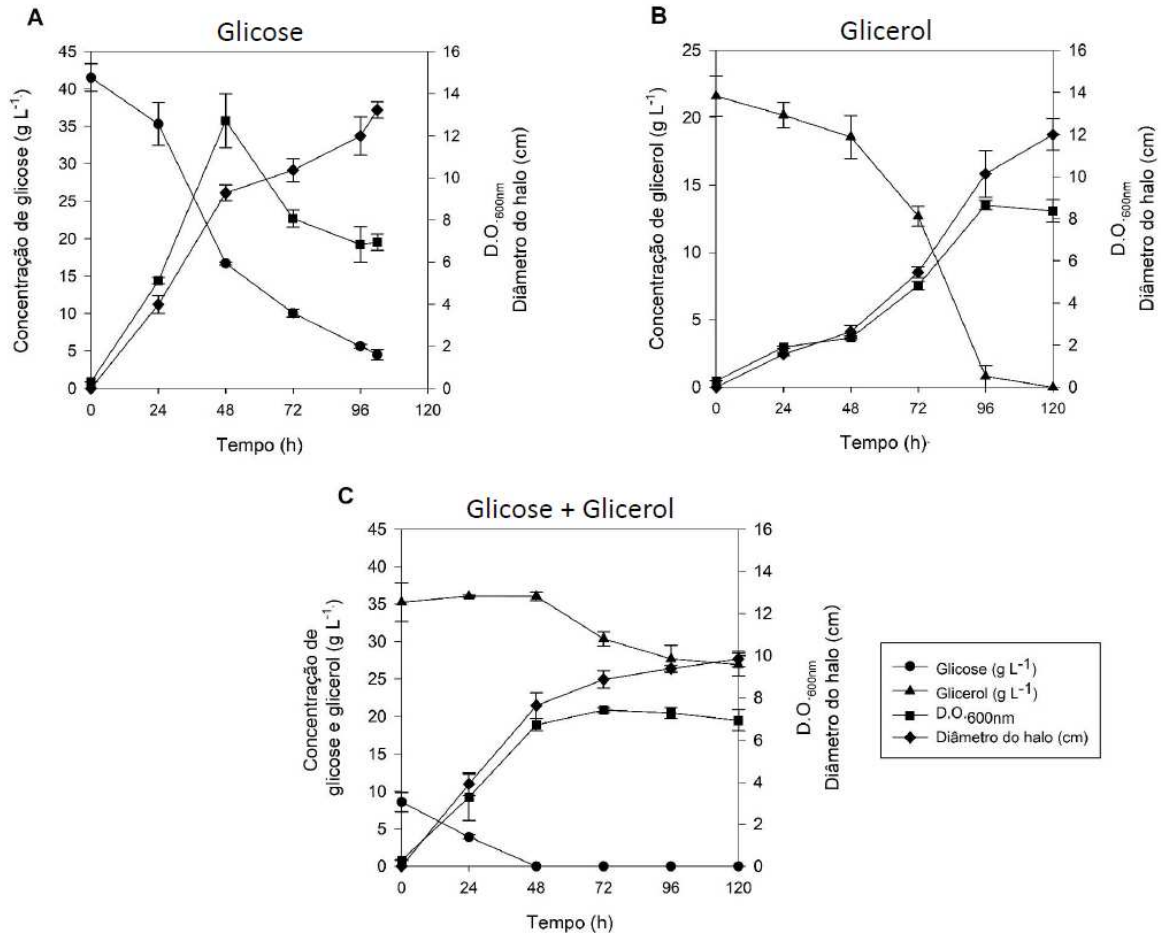


Figura 4. Cinética do crescimento celular, produção de surfactina e consumo do substrato durante o cultivo de *B. subtilis* LBBMA RI4914 *IsrfA* em meio mineral contendo diferentes fontes de carbono. A: cultivo em 40 g L⁻¹ de glicose por 102 horas, com adição de 0,23 mM de IPTG no momento em que a D.O._{600nm} corresponde a 0,29; B: cultivo em 20 g L⁻¹ de glicerol por 120 horas, com adição de 0,78 mM de IPTG no momento em que a D.O._{600nm} corresponde a 0,29; C: cultivo em 10 g L⁻¹ de glicose e 35 g L⁻¹ de glicerol por 120 horas, com adição de 0,78 mM de IPTG no momento em que a D.O._{600nm} corresponde a 0,29. Os resultados foram expressos pela média ± desvio padrão dos valores obtidos a partir de três repetições.

Em contrapartida, quando o glicerol foi utilizado como fonte de carbono, a produção de surfactina acompanhou o crescimento celular até 96 horas, momento em que as células atingiram a fase estacionária de crescimento (Figura 4B). Para os cultivos em glicose ou em glicerol + glicose, não foi possível observar a fase *lag* de crescimento, sendo esta, provavelmente, menor do que 24 horas. Por outro lado, no cultivo em glicerol, observou-se uma longa fase *lag* (48 horas), indicando que a célula necessita de um maior tempo de adaptação do

seu metabolismo para a utilização dessa fonte de carbono. A densidade máxima de células (máxima D.O._{600nm}) foi obtida quando glicose foi utilizada como única fonte de carbono.

O operon *glpFK*, que codifica para a proteína facilitadora do transporte de glicerol (GlpF) e glicerol quinase (GlpK), é reprimido por açúcares rapidamente metabolizáveis, tais como a glicose. Ele está sujeito a dois mecanismos de repressão catabólica: i) dependente da proteína CcpA (*Catabolite control protein A*) e ii) via exclusão do indutor (glicerol-3-fosfato) em decorrência da insuficiente fosforilação e ativação de GlpK mediada pelo sistema PTS (Darbon et al., 2002; Fujita, 2009). A fim de aumentar o suprimento de energia para a produção de surfactina, nós cultivamos *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA em glicose e glicerol simultaneamente, esperando que, na presença de glicose, o glicerol não fosse redirecionado para a via de gliconeogênese. O consumo simultâneo de glicose e glicerol por *B. subtilis* foi previamente reportado (Kalantari et al., 2017), mostrando que a repressão catabólica por glicose pode não ocorrer em algumas linhagens. Neste trabalho, no entanto, a presença da glicose reprimiu o consumo do glicerol por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA, e seu consumo somente ocorreu após a completa exaustão de glicose no meio de cultivo (Figura 4C). Nossos resultados demonstram que a glicose é a fonte de carbono preferencial para *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA e que sua presença no meio reprime o metabolismo do glicerol.

A produção de surfactina ao final do período de incubação foi determinada por UPLC-MS/MS e pelo teste de espalhamento de óleo em placa (Figura 5). De acordo com o teste de espalhamento de óleo em placa, a produção de surfactina foi a mesma quando glicose e glicerol foram utilizados como únicas fontes de carbono, a qual foi diferente da produção obtida quando as duas fontes foram utilizadas conjuntamente (Figura 5A). Os dados de concentração de surfactina determinada por UPLC-MS/MS, porém, demonstram que a produção não diferiu estatisticamente entre as três condições de cultivo (Figura 5B).

Este é o primeiro trabalho que avalia o uso concomitante de glicose e glicerol para a produção de surfactina. Embora a utilização das duas fontes de carbono simultaneamente resulte na mesma concentração final de surfactina obtida com a utilização das mesmas individualmente, a produção de surfactina a partir de glicose + glicerol não é vantajosa, em decorrência da repressão catabólica exercida pela glicose e do maior custo dessa fonte de carbono. Comparando-se a produção de surfactina entre as duas fontes individuais, com relação aos parâmetros fermentativos apresentados na Tabela 13, verifica-se que a produtividade volumétrica é um pouco maior quando o substrato orgânico é a glicose. Entretanto, o rendimento alcançado no cultivo em glicerol como principal fonte de carbono, dado em grama

de surfactina produzida por grama de substrato consumido, foi 1,7 vezes maior comparado ao obtido com glicose.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a performance fermentativa de *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA é melhor quando o glicerol é utilizado como única fonte de carbono nas condições ótimas definidas pela RSM. Desse modo, conclui-se que o glicerol constitui uma fonte de carbono promissora para a síntese de surfactina por essa linhagem, mostrando-se mais eficiente que a glicose, fonte de carbono preferencial da mesma.

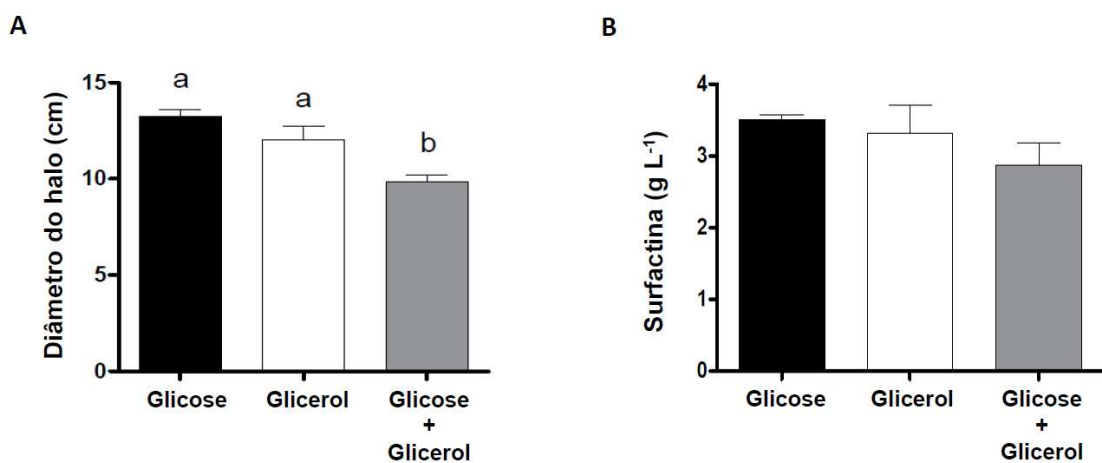


Figura 5. Produção de surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA, cultivada em meio mineral contendo glicose, glicerol ou ambos como fonte de carbono nas condições definidas como ótimas pela RSM, medida pelo teste de espalhamento de óleo em placa (A) e por UPLC-MS/MS (B). Os resultados foram expressos pela média \pm desvio padrão dos valores obtidos a partir de três repetições. Valores de média que apresentam a mesma letra ou que não apresentam letras não diferem estatisticamente pelo teste de Bonferroni a 5% de probabilidade.

Tabela 13. Parâmetros fermentativos da produção de surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA em meio mineral contendo glicose ou glicerol como fontes de carbono

Fonte de Carbono	Produtividade volumétrica (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Rendimento (g g ⁻¹)
Glicose	0,034	0,099
Glicerol	0,028	0,165

2.3.3 Utilização da glicerina bruta, coproduto da fabricação de biodiesel, como substrato para a produção de surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA

Após concluirmos que o glicerol foi a fonte de carbono mais eficiente para a produção de surfactina dentre as avaliadas neste trabalho, a capacidade de *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA de utilizar glicerina bruta como única fonte de carbono foi investigada. Dois ensaios

foram realizados utilizando-se dois lotes de glicerina bruta fornecidos pelas empresas Petrobras Biocombustível S.A. e Olfar S.A. A concentração de glicerol utilizada foi de 20 g L⁻¹, conforme determinado pela metodologia de superfície de resposta.

Para indução da produção de surfactina, o IPTG foi adicionado após 12 horas de cultivo e não na D.O._{600nm} correspondente a 0,29 como determinado anteriormente. Foi observado que, nas primeiras horas de cultivo, as células cresciam formando aglomerados, sem que se observasse turvação do meio, tal como ocorre normalmente em cultivos bacterianos em meio líquido (Figura 6). Desse modo, a D.O._{600nm} avaliada não representava a densidade de células presentes no meio e, não sendo possível fazer a medida da densidade óptica, padronizou-se o tempo de 12 horas para a adição do IPTG. Após 20 horas de cultivo, aproximadamente, observou-se que os aglomerados de células se desfaziam e o meio de cultivo tornava-se turvo (Figura 6).

Esse comportamento de formação de aglomerados de células em meio líquido decorre do mecanismo de autoagregação. A autoagregação é macroscopicamente observada e corresponde à formação de aglomerados multicelulares por linhagens bacterianas geneticamente idênticas, os quais eventualmente se acomodam no fundo dos tubos de cultura (Trunk et al., 2018; Nwoko, et al., 2021). Esse mecanismo é geralmente mediado por estruturas de superfície de auto-reconhecimento, tais como proteínas e exopolissacarídeos (Trunk et al., 2018; Nwoko, et al., 2021).

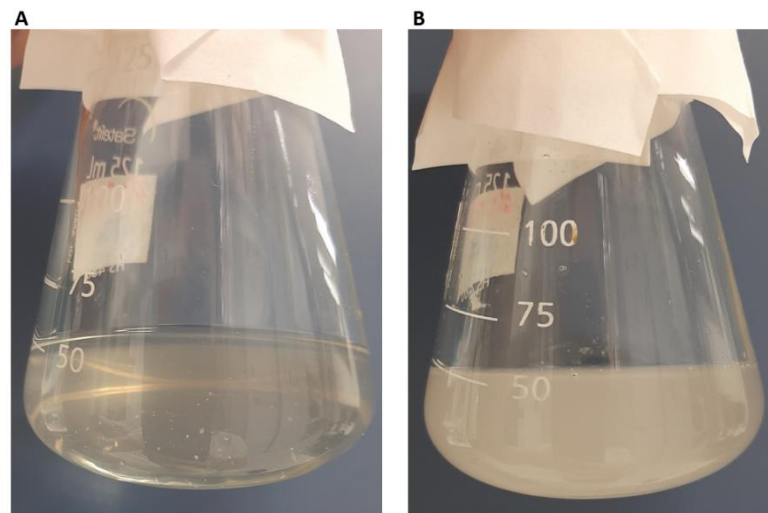


Figura 6. Observação do mecanismo de autoagregação quando *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA foi cultivada em meio mineral contendo glicerina bruta como fonte de carbono. A: presença de aglomerados de células no meio de cultura; B: meio turvo após os aglomerados de células se desfazerem.

Uma das funções reconhecidas para a autoagregação é a proteção das células contra estresses ambientais (Trunk et al., 2018). A autoagregação confere cooperação metabólica e garante a sobrevivência e persistência das células em ambientes que apresentam condições adversas ao crescimento microbiano, como a presença de toxinas, de antimicrobianos, estresse oxidativo e escassez de nutrientes (Farrell & Quilty, 2002; Demirdjian et al., 2019; Trunk et al., 2018; Nwoko, et al., 2021). As glicerinas brutas, por não possuírem alto grau de pureza, podem conter substâncias tóxicas para as células, tais como resíduos de álcool ou de metanol utilizados no processo de transesterificação, os quais podem ter sido um estímulo para as células se agregarem. A formação dos aglomerados de células em suspensão, observada neste trabalho, possibilitou que as células sobrevivessem à condição inicial de estresse e retornassem ao crescimento planctônico (Figura 7).

Embora diversos trabalhos tenham sido realizados utilizando-se glicerina bruta como substrato para a produção de biossurfactantes e outros produtos biotecnológicos por *Bacillus* spp. (Sousa et al., 2012; Sousa et al., 2014; Andrade et al., 2017; Zhan et al., 2018; Janek et al., 2021), a formação de agregados de células em suspensão não foi reportada, sendo este o primeiro relato de autoagregação de *B. subtilis* quando cultivada na presença de glicerina bruta, coproduto da fabricação de biodiesel.

B. subtilis LBBMA RI4914 IsrfA foi capaz de crescer e produzir surfactina a partir da bioconversão de ambas as glicerinas (Figura 7). O tempo zero corresponde ao momento de adição de IPTG, após 12 horas de cultivo. A cinética de crescimento em ambos os cultivos foi similar, e as culturas atingiram valores máximos de D.O._{600nm} bem próximos. A fase *lag* de crescimento foi maior nos cultivos realizados com as glicerinas brutas (72 horas), em comparação ao cultivo realizado com o glicerol comercial (48 horas, Figura 4B), provavelmente por se tratarem de substratos que não apresentam alto grau de pureza e que potencialmente podem apresentar substâncias inibidoras do crescimento. Com relação à produção de surfactina, medida pelo teste de espalhamento de óleo em placa, ambas as glicerinas brutas foram convertidas em surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA. No entanto, a glicerina bruta fornecida pela empresa Olfar S.A. proporcionou maior produção de surfactina, a qual foi semelhante à observada com o glicerol comercial (Figura 8). A diferença observada na produção de surfactina a partir das duas amostras de glicerina pode ter ocorrido pelo fato da glicerina bruta fornecida pela empresa Olfar S.A. apresentar maior grau de pureza (maior teor de glicerol total e menor quantidade de matéria orgânica não glicerina, Tabela 4).

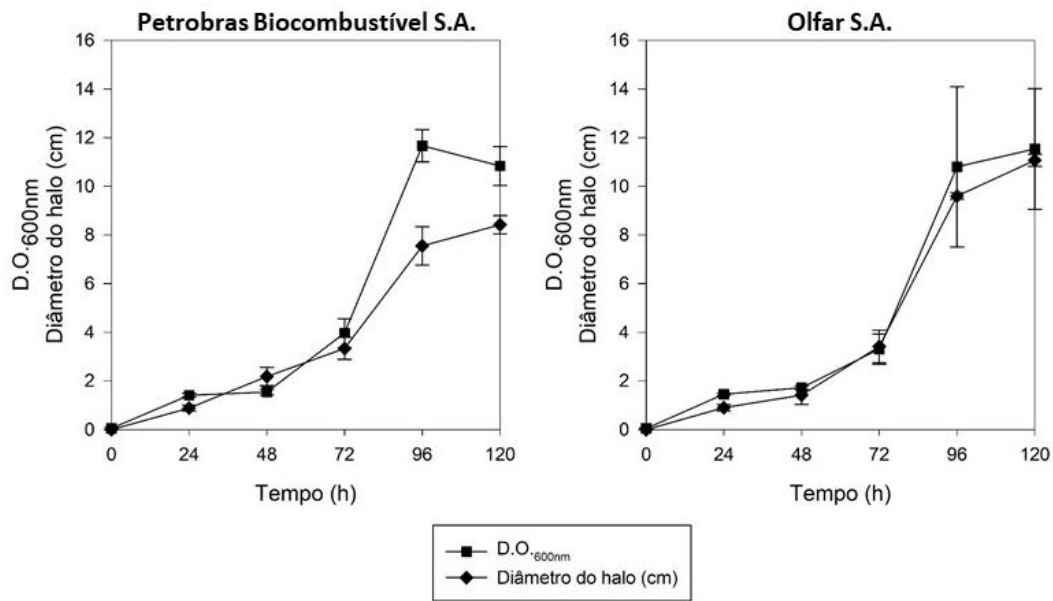


Figura 7. Cinética do crescimento celular e produção de surfactina durante o cultivo de *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA em meio mineral contendo glicerina bruta como única fonte de carbono proveniente da empresa Petrobras Biocombustível S.A. e Olfar S.A. Os resultados representam a média \pm desvio padrão dos valores obtidos para três repetições.

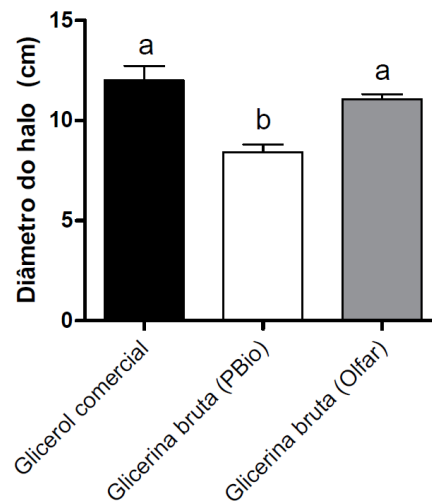


Figura 8. Produção de surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA, cultivada em meio mineral contendo glicerol puro ou glicerina bruta como fonte de carbono nas condições definidas como ótimas pela RSM, medida pelo teste de espalhamento de óleo em placa. A concentração de glicerol em todos os tratamentos foi 20 g L^{-1} . Os resultados foram expressos pela média \pm desvio padrão dos valores obtidos a partir de três repetições. Valores de média que apresentam a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Bonferroni a 5% de probabilidade.

Os resultados deste estudo mostraram que a glicerina bruta, coproduto da indústria de biodiesel, pode ser diretamente utilizada para a produção de surfactina, não necessitando passar

por processos complexos de refino para adquirir alto grau de pureza, o que tornaria mais oneroso o processo de produção do lipopeptídeo. Desse modo, conclui-se que a glicerina bruta é uma fonte de carbono promissora para se reduzirem potencialmente os custos de produção de surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA.

2.3.4 Avaliação do uso da lactose como indutor em substituição ao IPTG

O IPTG é um composto químico análogo da alolactose, comumente empregado como indutor em sistemas de expressão de proteínas heterólogas (Crowley & Rafferty, 2019). Embora seja convencionalmente utilizado em processos industriais, o uso desse indutor eleva o custo de produção, dado o seu elevado valor comercial (Werin, 2019). Desse modo, a substituição do IPTG por indutores de menor custo, tal como a lactose, pode contribuir para redução dos custos associados ao processo de produção da surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA.

Os resultados de produção de surfactina e medida do crescimento celular para as diferentes combinações de concentração de lactose e momento de adição da mesma estão apresentados na Tabela 14. Os valores de diâmetros de halo obtidos foram muito baixos, indicando que não houve produção de surfactina. Em decorrência desse resultado, as respostas não foram ajustadas a um modelo estatístico.

Tabela 14. Matriz experimental do DCCR com as variáveis independentes, variável resposta e a medida de crescimento ao final do cultivo

Unidade Experimental	Variáveis independentes		Resposta Diâmetro do halo (cm)	Crescimento D.O. _{600nm}
	Lactose (mM)	D.O. _{600nm}		
1	4,5	0,29	0,1	8,35
2	4,5	1,71	0,3	8,0
3	21,5	0,29	0,4	8,25
4	21,5	1,71	0,3	8,4
5	13	0	0,4	8,75
6	13	2,0	0,4	9,2
7	13	1,0	0,1	8,7
8	13	1,0	0,3	8,95
9	13	1,0	0,4	10,2
10	1	1,0	0,2	7,95
11	25	1,0	0,4	8,2

Com relação ao crescimento, para todas as unidades experimentais avaliadas, os valores de D.O._{600nm} alcançados ao final do cultivo não diferiram expressivamente (Tabela 14), possivelmente, porque a concentração de glicérol utilizada foi a mesma em todas as condições

(20 g L⁻¹). Em contrapartida, quando a linhagem foi cultivada em meio mineral contendo lactose como única fonte de carbono, além de não haver produção de surfactina (diâmetro do halo = 0), a densidade de células alcançada após 120 horas de cultivo foi muito baixa (D.O._{600nm} = 1,37), indicando que a linhagem é pouco eficaz em metabolizar a lactose.

Nossos dados demonstram que a lactose não atua como indutor para a expressão do operon *srfA* e síntese de surfactina em *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA. O resultado obtido neste trabalho está de acordo com o descrito por Miao et al. (2020), no qual a lactose não foi capaz de induzir a expressão do gene *gfp* em *Bacillus subtilis*. Em contrapartida, Dong et al. (2021) obtiveram sucesso ao utilizar a lactose como indutor da expressão gênica em substituição ao IPTG em *Bacillus subtilis* SCK6.

A utilização da lactose como indutor em sistemas de expressão baseados no operon *lac* é dependente da fisiologia da célula. A lactose é transportada para o interior da célula por transportadores específicos e, no citosol, parte da molécula é convertida pela enzima β -galactosidase em alolactose. Esse composto, que é o real indutor, liga-se à proteína repressora LacI, diminuindo sua afinidade pelo operador associado ao promotor e induzindo assim a expressão (Donovan, 1996; Dong et al., 2021). Diferentemente da lactose, o IPTG é capaz de se ligar à proteína repressora sem a necessidade de sofrer modificação estrutural.

B. subtilis LBBMA RI4914 IsrfA parece ser pouco eficiente em utilizar a lactose como fonte de carbono e energia para suportar o seu crescimento. Aparentemente, a linhagem é capaz de sintetizar transportadores e enzimas envolvidos com o metabolismo da lactose, e estes podem estar sendo expressos em baixo nível ou possuírem baixa eficiência. Ademais, o fato de ser capaz de sintetizar enzimas β -galactosidases não garante que uma determinada linhagem seja capaz de metabolizar a lactose, uma vez que algumas dessas enzimas possuem diferentes substratos (Shipkowski & Brenchley, 2006). Analisando a sequência do genoma da linhagem selvagem *B. subtilis* LBBMA RI4914, depositada no banco de dados do NCBI (número de entrada CP051306.1), foram identificadas as enzimas β -galactosidases YesZ e GanA. No entanto, a lactose provavelmente não é o substrato para essas enzimas, como previamente reportado por outros autores ao trabalharem com outras linhagens de *B. subtilis* (Carneiro et al., 2018; Watzlawick et al., 2016).

Embora seja de custo mais elevado do que a lactose e contribua para aumentar o custo do processo de produção, o IPTG apresenta a vantagem de não ser metabolizado pelas células, garantindo que o nível de indução se mantenha constante pelo tempo funcional da molécula (Donovan, 1996). Ademais, quando presente em concentração adequada, o IPTG é transportado

para o interior celular por difusão, não sendo dependente de transportadores específicos, como a permease da lactose (Donovan, 1996; Marschall et al., 2017). Além disso, o uso da glicerina bruta, coproduto da produção de biodiesel, como fonte de carbono para a produção de surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA, pode compensar financeiramente o uso do IPTG como molécula indutora.

2.4 CONCLUSÕES

As condições ótimas de concentração de IPTG, estágio do crescimento celular para adição do IPTG, concentração da fonte de carbono e período de incubação para a produção de surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA, quando cultivada em meio mineral contendo glicose, glicerol ou ambos como fonte de carbono, foram determinadas pela metodologia de superfície de resposta e validadas experimentalmente. A produção de surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA não difere significativamente entre as três fontes de carbono investigadas, sendo produzido em torno de 3 g L^{-1} de surfactina quando a linhagem é cultivada nas condições definidas como ótimas.

Este é o primeiro trabalho que avalia o uso concomitante de glicose e glicerol para a produção de surfactina. Embora essa condição resulte na produção da mesma concentração de surfactina das demais, o uso de glicose e glicerol simultaneamente não é viável, uma vez que o metabolismo do glicerol é reprimido na presença de glicose em *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA. O uso do glicerol como única fonte de carbono é a opção mais eficiente para a produção de surfactina dentre as avaliadas no estudo, visto que propicia maior rendimento de conversão do substrato em produto e é de menor custo que a glicose. A lactose não atua como indutor da síntese de surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA, e desse modo não pode ser utilizada em substituição ao IPTG.

B. subtilis LBBMA RI4914 IsrfA é capaz de crescer e produzir surfactina utilizando a glicerina bruta, coproduto da produção de biodiesel, como única fonte de carbono e energia. Na presença desse substrato, ocorre o fenômeno de autoagregação, sendo esse o primeiro relato desse fenômeno quando *B. subtilis* é cultivada na presença de glicerina bruta. Esse estudo comprovou que o uso da glicerina bruta, proveniente da indústria de biodiesel, é uma abordagem promissora para a redução potencial do custo de produção de surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA.

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, D. G.; Silva, R. C. F. S.; Luna, J. M.; Rufino, R. D.; Santos, V. A.; Sarubbo, L. A. Response surface methodology for optimizing the production of biosurfactant by *Candida tropicalis* on industrial waste substrates. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 1-13, 2017.
- Almeida, M. F. *Bacillus subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA: uma nova linhagem geneticamente melhorada para produção de surfactina. 77f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2018.
- Andrade, C. J. Simiqueli, A. P. R.; Andrade, L. M.; Mendes, A. M.; Jauregi, P.; Pastore, G. M. Comparative study: bench scale surfactin production from *Bacillus subtilis* using analytical grade and concentrated glycerol from the biodiesel industry. *International Journal of Scientific World*, v. 5 (1), p. 28-37, 2017.
- ANP, 2021. Informações de Mercado - Biodiesel. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, Rio de Janeiro. Disponível em: <https://www.gov.br/anp/pt-br/assuntos/producao-e-fornecimento-de-biocombustiveis/biodiesel/informacoes-de-mercado>. Acesso em: 11 de Janeiro de 2021.
- Banat, I. M.; Franzetti, A.; Gandolfi, I.; Bestetti, G.; Maria G. Martinotti, M. G.; Fracchia, L.; Smyth, T. J.; Marchant, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 87, p. 427-444, 2010.
- Carneiro, L. A. B. C.; Yu, L.; Dupree, P.; Ward, R. J. Characterization of a β -galactosidase from *Bacillus subtilis* with transgalactosylation activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 120, p. 279–287, 2018.
- Chen, W.; Juang, R.; Wei, Y. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*, v. 103, p. 158–169, 2015.
- Crowley, E. L.; Rafferty, S. P. Review of lactose-driven auto-induction expression of isotope-labelled proteins. *Protein Expression and Purification*, v. 157, p. 70 – 85, 2019.
- Darbon, E.; Servant, P.; Poncet, S.; Deutscher, J. Antitermination by GlpP, catabolite repression via CcpA and inducer exclusion triggered by P~GlpK dephosphorylation control *Bacillus subtilis* *glpFK* expression. *Molecular Microbiology*, v. 43(4), p. 1039–1052, 2002.
- Demirdjian, S.; Sanchez, H.; Hopkins, D.; Berwin, B. Motility-independent formation of antibiotic-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* aggregates. *Appl. Environ. Microbiol.* 85, 00844-19, 2019, <https://doi.org/10.1128/AEM.00844-19>.
- Donovan, R. S.; Robinson, C. W.; Glick, B. R. Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. *J Ind Microbiol Biotechnol*, v. 16, p. 145-154, 1996.
- Dong, X.; Wang, W.; Jiang, T.; Zhang, Y.; Han, H.; Zhang, Y.; Yang, C. Construction and potential application of bacterial superoxide dismutase expressed in *Bacillus subtilis* against mycotoxins. *PLoS ONE*, 16 (11), e0260047; <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260047>
- Drakontis, C. E. & Amin S. Biosurfactants: Formulations, Properties, and Applications, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2020.03.013>, 2020.

Nwoko, E. Q. A.; Okeke, I. N. Bacteria autoaggregation: how and why bacteria stick together. *Biochemical Society Transactions*, v. 49, p. 1147–1157, 2021.

EPE, 2021. Análise de Conjuntura dos Biocombustíveis - Ano 2020. Empresa de Pesquisa Energética, Rio de Janeiro. Fonte: www.epe.gov.br

Farrell, A. & Quilty, B. Substrate-dependent autoaggregation of *Pseudomonas putida* CP1 during the degradation of mono-chlorophenols and phenol. *J Ind Microbiol Biot.*, v. 28, p. 316–324, 2002.

Fenibo, E. O.; Douglas, S. I.; Stanley, H. O. A review on microbial surfactants: production, classifications, properties and characterization. *Journal of Advances in Microbiology*, v. 18(3), p. 1-22, 2019.

Fujita, Y. Carbon catabolite control of the metabolic network in *Bacillus subtilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, v. 73 (2), p. 245-259, 2009.

Ghazala, I.; Bouallegue, A.; Haddar, A.; Ellouz-Chaabouni, S. Characterization and production optimization of biosurfactants by *Bacillus mojavensis* I4 with biotechnological potential for microbial enhanced oil recovery. *Biodegradation*, v. 30, p. 235-245, 2019.

Gomaa, L.; Loscar, M. E.; Zein, H. S.; Abdel-Ghaffar, N.; Abdelhadi, A. A.; Abdelaal, A. S.; Abdallah, N. A. Boosting isoprene production via heterologous expression of the Kudzu isoprene synthase gene (*kIspS*) into *Bacillus* spp. cell factory. *AMB Expr*, v. 7 (161), 2017.

Hu, F.; Liu, Y.; Li, S. Rational strain improvement for surfactin production: enhancing the yield and generating novel structures. *Microb Cell Fact*, v. 18(42), p. 1-13, 2019.

Imura, T.; Konishi, M.; Kitamoto, D.; Fukuoka, T.; Uemura, S.; Morita, T.; Iwabuchi, H. Efficient Production of Acid-Form Sophorolipids from Waste Glycerol and Fatty Acid Methyl Esters by *Candida floricola*. *J. Oleo Sci.* v. 67, p. 489–496, 2018.

Jahan, R.; Bodratti, A. M.; Tsianou, M.; Alexandridis, P. Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: physicochemical properties and applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 275, p. 1-22, 2020.

Janek, T.; Gudiña, E. J.; Połomska, X.; Biniarz, P.; Jama, D.; Rodrigues, L. R.; Rymowicz, W.; Lazar, Z. Sustainable Surfactin Production by *Bacillus subtilis* Using Crude Glycerol from Different Wastes. *Molecules*, 26, 3488, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26123488>

Jiao, S.; Li, X.; Yu, H.; Yang, H.; Li, X., Shen, Z. In situ enhancement of surfactin biosynthesis in *Bacillus subtilis* using novel artificial inducible promoters. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 114(4), p. 832-842, 2017.

Jung, J.; Yu, K. O.; Ramzi, A.B.; Choe, S.H.; Kim, S. W.; Han, S.O. Improvement of surfactin production in *Bacillus subtilis* using synthetic wastewater by overexpression of specific extracellular signaling peptides, comX and phrC. *Biotechnol Bioeng*, v. 109, p. 2349-2356, 2012.

Kalantari, A.; Chen, T.; Ji, B.; Stancik, I. A.; Ravikumar, V. Conversion of glycerol to 3-hydroxypropanoic acid by genetically engineered *Bacillus subtilis*. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 1-11, 2017.

Kumar, S. S.; Sharmila, G.; Muthukumar, C.; Tamilarasan, K.; Gopinath, M. Statistical optimization of critical medium components for biosurfactant production by *Bacillus subtilis*. *J. BioSci. Biotechnol.*, v. 4(2), p. 123-129, 2015.

Li, X.; Yang, H.; Zhang, D.; Li, X.; Yu, H.; Shen, Z. Overexpression of specific proton motive force-dependent transporters facilitate the export of surfactin in *Bacillus subtilis*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, v. 42, p. 93-103, 2015.

Liu, K.; Sun, Y.; Cao, M.; Wang, J.; Lu, J. R.; Xu, H. Rational design, properties, and applications of biosurfactants: a short review of recent advances. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 45, p. 57-67, 2020.

Long, X.; He, N.; He, Y.; Jiang, J.; Wu, T. Biosurfactant surfactin with pH-regulated emulsification activity for efficient oil separation when used as emulsifier. *Bioresource Technology*, v. 241, p. 200–206, 2017.

Marchant, R. & Banat, I. M. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. *Trends in Biotechnology*, v. 30 (11), 2012.

Miao, C.; Han, L.; Lu, Y.; Feng, H. Construction of a high-expression system in *Bacillus* through transcriptomic profiling and promoter engineering. *Microorganisms*, 8, 1030, 2020. doi:10.3390/microorganisms8071030

Mohanty, S. S.; Koul, Y.; Varjani, S.; Pandey, A.; Ngo, H. H.; Chang, J.; Jonathan W. C. Wong, J. W. C.; Bui, X. A critical review on various feedstocks as sustainable substrates for biosurfactants production: a way towards cleaner production. *Microbial Cell Factories.*, v. 20 (120), 2021. doi: 10.1186/s12934-021-01613-3.

Moshtagh, B.; Hawboldt, K.; Zhang, B. Optimization of biosurfactant production by *Bacillus Subtilis* N3-1P using the brewery waste as the carbon source. *Environmental Technology*, v. 40 (25), p. 3371-3380, 2019.

Morikawa, M.; Hirata, Y.; Imanaka, T. A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1488, p. 211-218, 2000.

Moro, G. V.; Almeida, R. T. R.; Napp, A. P.; Porto, C.; Pilau, E. J.; Ludtke, D. S.; Moro, A. V.; Vainstein, M. H. Identification and ultra-high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry characterization of biosurfactants, including a new surfactin, isolated from oil-contaminated environments. *Microbial Biotechnology*, v. 11(4), p. 759–769, 2018.

Mota, C. J. A.; Pestana, C. F. M. Co-produtos da Produção de Biodiesel. *Rev. Virtual Quim.*, v. 3 (5), p. 416-425, 2011.

Mouafi, F. E.; Elsouda, M. M. A.; Moharamb, M E. Optimization of biosurfactant production by *Bacillus brevis* using response surface methodology. *Biotechnology Reports*, v. 9, p. 31-37, 2016.

Naughton, P. J.; Marchant, R.; Naughton, V.; Banat, I. M. Microbial biosurfactants: current trends and applications in agricultural and biomedical industries. *Journal of Applied Microbiology*, v. 127, p. 12-28, 2019.

- Radzuan, M. N.; Banat, I. M.; Winterburn, J. Biorefining palm oil agricultural refinery waste for added value rhamnolipid production via fermentation. *Ind. Crops Prod.* v. 116, p. 64–72, 2018.
- SAEG Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007.
- Salek, K. & Euston, S. R. Sustainable microbial biosurfactants and bioemulsifiers for commercial exploitation. *Process Biochemistry*, v. 85, p. 143–155, 2019.
- Sar, P.; Ghosh, A.; Scarso, A.; Saha, B. Surfactant for better tomorrow: Applied aspect of surfactant aggregates from laboratory to industry. *Res. Chem. Intermed.*, v. 45, p. 6021–6041, 2019.
- Silva, R. C. F. S.; Almeida, D. G.; Brasileiro, P. P. F.; Rufino, R. D.; Luna, J. M.; Sarubbo, L. A. Production, formulation and cost estimation of a commercial biosurfactant. *Biodegradation*, v. 30, p. 191–201, 2019.
- Singh, P.; Patil, Y.; Rale, V. Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies. *Journal of Applied Microbiology*, v. 126, p. 2-13, 2018.
- Shipkowski, S.; Brenchley, J. E. Bioinformatic, genetic, and biochemical evidence that some glycoside hydrolase family 42 β -galactosidases are arabinogalactan type I oligomer hydrolases. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72 (12), p. 7730–7738, 2006.
- Sousa, M.; Melo, V. M. M.; Rodrigues, S.; Sant'ana, H. B.; Gonçalves, L. R. B. Screening of biosurfactant-producing *Bacillus* strains using glycerol from the biodiesel synthesis as main carbon source. *Bioprocess Biosyst Eng.*, v. 35, p. 897-906, 2012.
- Sousa, M.; Dantas, I. T.; Felix, A. K. N.; Sant'Ana, H. B.; Melo, V. M. M.; Gonçalves, L. R. B. Crude glycerol from biodiesel industry as substrate for biosurfactant production by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, v.57 (2), p. 295-301, 2014.
- Sun, H.; Bie, X.; Lu, F.; Lu, Y.; Wu, Y.; Lu, Z. Enhancement of surfactin production of *Bacillus subtilis* fmbR by replacement of the native promoter with the Pspac promoter. *Can. J. Microbiol.*, v. 55, p. 1003-1006, 2009.
- Sun, D.; Liao, J.; Sun, L.; Wang, Y.; Liu, Y.; Deng, Q.; Zhang, N.; Xu, D.; Fang, Z.; Wang, W.; Gooneratne, R. Effect of media and fermentation conditions on surfactin and iturin homologues produced by *Bacillus natto* NT-6: LC–MS analysis. *AMB Expr.*, v. 9 (120), p. 1-9, 2019.
- Swaminathan, R. S. T. Application of response-surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the enhanced production of surfactin. *Appl Microbiol Biotechnol.* v.47, p. 358-363, 1997.
- Trunk, T.; Khalil, H. S.; Leo, J. C. Bacterial autoaggregation. *AIMS Microbiology*, v. 4 (1), p. 140–164, 2018.
- Vater, J., Kablitz, B., Wilde, C., Franke, P., Mehta, N., Cameotra, S.S. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, p. 6210-6219, 2002.

- Vital, C. E.; Gómez, J. D.; Vidigal, P. M.; Barros, E.; Pontes, C. S. L.; Vieira, N. M.; Ramos, H. J.O. Phytohormone profiling by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC/MS). *Protocols.io*, 2019. <https://doi.org/10.17504/protocols.io.zgff3tn>.
- Wang, J.; Nguyen, A.V.; Farrokhpay, S. A critical review of the growth, drainage and collapse of foams. *Adv. Colloid Interface Sci.*, v. 228, p. 55–70, 2016.
- Werin, B. Optimising IPTG and Lactose Induction of Recombinant Expression with Flow-based Online Analysis. 44f. Dissertation - Lund, Sweden 2019.
- Wu, Q.; Zhia, Y.; Xua, Y. Systematically engineering the biosynthesis of a green biosurfactant surfactin by *Bacillus subtilis* 168. *Metabolic Engineering*, v. 52, p. 87–97, 2019.
- Yang, F.; Hanna, M. A.; Sun, R. Value-added uses for crude glycerol—a byproduct of biodiesel production. *Biotechnology for Biofuels*, v. 5(13), p. 1-12, 2012.
- Zanotto, A. W.; Valério, A.; Andrade, C. J.; Pastore, C. M. New sustainable alternatives to reduce the production costs for surfactin 50 years after the discovery. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 103, p. 8647-8656, 2019.
- Zhan, Y.; Sheng, B.; Wang, H.; Shi, J.; Cai, D.; Yi, L.; Yang, S.; Wen, Z.; Ma, X.; Chen, S. Rewiring glycerol metabolism for enhanced production of poly- γ -glutamic acid in *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol Biofuels*, v. 11(306), p. 1-14, 2018.
- Zhou, D.; Hu, F.; Lin, J.; Wang, W.; Li, S. Genome and transcriptome analysis of *Bacillus velezensis* BS-37, an efficient surfactin producer from glycerol, in response to d-/l-leucine. *MicrobiologyOpen.*, v. 794, p. 1-14, 2018.

CAPÍTULO 3

Caracterização das propriedades físico-químicas, biológicas e estruturais da surfactina produzida por *Bacillus subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA a partir de glicose e glicerol

Caracterização das propriedades físico-químicas, biológicas e estruturais da surfactina produzida por *Bacillus subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA a partir de glicose e glicerol

RESUMO

A surfactina apresenta potencial para aplicação em diversas áreas, tais como farmacêutica, cosmética, agrícola, alimentícia, ambiental e de limpeza. O meio de cultura empregado no cultivo do microrganismo pode influenciar a composição das moléculas de surfactina obtidas e, assim, afetar suas propriedades físico-químicas e biológicas. Considerando a relevância industrial da surfactina, é importante investigar tais características, bem como sua estabilidade frente a diferentes condições ambientais. Desse modo, este capítulo teve como objetivo avaliar as propriedades físico-químicas e atividades biológicas das moléculas de surfactina produzidas por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA, a partir de glicose e glicerol como únicas fontes de carbono, de modo a investigar se tais propriedades são afetadas pela fonte de carbono. A estabilidade das moléculas de surfactina produzidas em relação à variação de temperatura e pH foi investigada avaliando-se a tensão superficial, o índice de emulsificação e a capacidade de espalhamento de óleo em placa. O potencial antimicrobiano das moléculas foi investigado contra linhagens bacterianas de referência e isolados fúngicos fitopatogênicos, e a concentração das diferentes moléculas de surfactina produzidas foi determinada por UPLC-MS/MS. Ambas as surfactinas, produzidas a partir de glicose e glicerol mantêm estáveis sua atividade de superfície e capacidade de formar emulsão entre 4 e 121 °C e na faixa de pH de 7 a 12, e apresentam atividade antimicrobiana contra *Rhizoctonia* sp., *Staphylococcus aureus* ATCC 12692, *Citrobacter freundii* ATCC 8090 e *Bacillus cereus* ATCC 14579. Nossos resultados demonstram que a fonte de carbono utilizada para a produção de surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA não interfere na concentração das moléculas de surfactina produzidas, nem mesmo nas propriedades físico-químicas e na atividade biológica das mesmas. Conclui-se, portanto, que o glicerol é uma fonte de carbono adequada para substituir a glicose como substrato para produção comercial de surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA, ao proporcionar redução dos custos sem alterar as características funcionais das moléculas obtidas.

3.1 INTRODUÇÃO

Os lipopeptídeos constituem uma classe de biossurfactantes com propriedades antimicrobianas, os quais compreendem moléculas compostas por uma porção lipídica ligada a um peptídeo, e incluem as famílias das surfactinas, iturinas e fengicinas, as quais são principalmente sintetizadas por *Bacillus* sp. (Walia & Cameotra, 2015). Caracterizada como um dos biossurfactantes mais potentes, a surfactina apresenta propriedades antibacteriana, antiviral, antifúngica, antitumoral e anti-inflamatória, sendo de grande interesse para as áreas médica, alimentícia e agrícola. Sua excelente atividade de superfície torna esta molécula adequada para aplicações ambientais (como a biorremediação), para a recuperação de petróleo e para ser utilizada nas indústrias de cosméticos e limpeza (Chen et al., 2015; Wu et al., 2017; Liu et al., 2020; Nanjundan et al., 2019).

A surfactina é sintetizada pela via de síntese não ribossomal, pelo complexo enzimático multi-modular (surfactina sintetase) composto pelas peptídeo sintetases não ribossomais (NRPS), as quais são codificadas pelo operon *surfA* (Nakano et al., 1991; Cosmina et al., 1993). Bioquimicamente, a surfactina é constituída por um heptapeptídeo cíclico ligado a um ácido graxo β -hidróxi com uma cadeia que pode variar de 11 a 17 átomos de carbono (Jacques, 2011; Moro et al., 2018). A estrutura do heptapeptídeo inclui os aminoácidos hidrofílicos aspartato (Asp) e glutamato (Glu), e os aminoácidos hidrofóbicos valina (Val) e leucina (Leu), os quais constituem a sequência peptídica típica Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu com a sequência quiral LLDLLDL (Jacques, 2011; Santos et al., 2019). A surfactina é sintetizada como uma mistura de moléculas, as quais incluem diferentes isoformas, que diferem na composição de aminoácidos da porção peptídica, e séries homólogas, que variam no número de carbono e isomeria da cadeia lipídica (Deleu et al., 1999; Seydlová et al., 2011).

O padrão de aminoácidos e cadeias de ácidos graxos nas moléculas produzidas, bem como a proporção de cada molécula, dependem do microrganismo produtor, dos componentes do meio de cultura e das condições de cultivo (Seydlová et al., 2011; Santos et al., 2019), sendo essas características determinantes das atividades apresentadas pela surfactina (Dhali et al., 2017). A composição química do biossurfactante sintetizado pelo microrganismo afeta as suas características físico-químicas, tais como concentração micelar crítica, tensão superficial, tensão interfacial, índice de emulsificação e estabilidade da emulsão e, conseqüentemente, suas atividades biológicas (Araujo et al., 2016; Dhali et al., 2017; Wang et al., 2018). As diferenças nas propriedades físico-químicas e biológicas, decorrentes das diferentes isoformas e séries homólogas produzidas, podem afetar a aplicação e a efetividade dessas biomoléculas, sendo

necessário avaliarem-se suas propriedades funcionais e sua adequação a usos específicos para que sejam aplicadas em escala comercial (França et al., 2015; Singh et al.; 2018).

No capítulo anterior, concluiu-se que o uso do glicerol e da glicerina bruta, coproduto da produção de biodiesel, como fonte de carbono para a síntese de surfactina, é uma opção promissora para se reduzir potencialmente o custo de produção da surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA, sendo a conversão do glicerol em surfactina mais eficiente quando comparada à da glicose. Neste capítulo, investigou-se a influência da fonte de carbono utilizada para a produção de surfactina (glicose ou glicerol) sobre as propriedades físico-químicas, atividade biológica (ação antimicrobiana) e proporção das moléculas de surfactina produzidas por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Microrganismos

O trabalho foi conduzido utilizando-se a linhagem geneticamente melhorada para a produção de surfactina, *Bacillus subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA, pertencente ao Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente (LBBMA). Essa linhagem apresenta o operon *sfA*, responsável pela síntese da surfactina, sob controle de um promotor forte e induzido por isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) (Almeida, 2018).

Para o ensaio de atividade antibacteriana, foram utilizadas linhagens de referência obtidas da American Type Culture Collection (ATCC, Madison, USA), incluindo as linhagens Gram-positivas *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Bacillus mycoides* ATCC 6462, *Bacillus subtilis* ATCC 23858 e *Staphylococcus aureus* ATCC 12692, e Gram-negativas *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella oxytoca* ATCC 0182, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas alcaligenes* ATCC 14909 e *Citrobacter freundii* ATCC 8090.

Para o ensaio de atividade antifúngica, foram utilizados os isolados fúngicos fitopatogênicos *Sclerotinia sclerotiorum* (código no SisGen: A3AE2F4), *Fusarium* sp. e *Rhizoctonia* sp., cedidos pelo professor do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, Campos Muriaé, Max Lenine Rezende de Oliveira; e *Botrytis cinerea* LPP B87, adquirido da coleção do Laboratório de Proteção de Plantas (LPP), do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa.

3.2.2 Produção e recuperação da surfactina

Para a produção de surfactina, uma colônia de *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA, cultivada previamente em meio TSA (Difco™ Tryptic Soy Agar), foi transferida para um frasco Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de TSB (Difco™ Tryptic Soy Broth), o qual foi incubado a 30 °C, sob agitação de 200 rpm, por aproximadamente 15 horas.

Em seguida, uma alíquota da cultura foi transferida para frascos Erlenmeyer de 1 L, contendo 250 mL de meio mineral, de modo a se obter uma densidade óptica a 600 nm (D.O._{600nm}) de 0,05. O meio mineral foi preparado contendo glicose (40 g L⁻¹) ou glicerol (20 g L⁻¹) como fonte de carbono, e continha em sua composição (g L⁻¹): K₂HPO₄ (13,9); KH₂PO₄ (2,7); extrato de levedura (0,05) e NaNO₃ (4,24). As soluções de glicose ou glicerol foram adicionadas após autoclavagem do meio mineral (121 °C, 15 minutos) bem como a solução de micronutrientes (50 mL L⁻¹), composta por (g L⁻¹): EDTA (0,5); MgSO₄.7H₂O (3,0);

MnSO₄.4H₂O (0,5); NaCl (1,0); CaCl₂.2H₂O (0,1); CoCl₂.6H₂O (0,1); ZnSO₄.7H₂O (0,1); FeSO₄.7H₂O (0,1); CuSO₄.5H₂O (0,01); Na₂MoO₄.2H₂O (0,01); NaSeO₄ (0,01); Na₂WO₄.2H₂O (0,01) e NiCl₂.6H₂O (0,02). Os frascos foram incubados sob agitação de 200 rpm a 30 °C. O crescimento das culturas foi monitorado por meio de leitura da D.O._{600nm}, até que a D.O._{600nm} correspondente a aproximadamente 0,29 fosse alcançada. Nesse momento, o indutor IPTG foi adicionado ao meio de cultura, de modo a se obterem as concentrações de 0,23 mM para o cultivo em glicose e 0,78 mM para o cultivo em glicerol. As culturas contendo glicose ou glicerol como fonte de carbono foram incubadas a 30 °C, sob agitação de 200 rpm, por um período de 102 ou 120 horas, respectivamente.

Após esse período, as culturas foram centrifugadas a 12.860 x g por 15 minutos a 4 °C para remoção das células. Parte do sobrenadante recuperado foi armazenado e utilizado nos ensaios de avaliação de estabilidade da surfactina; outra parte foi submetida à precipitação ácida para obtenção do extrato bruto, o qual foi utilizado nos ensaios de avaliação de atividade antimicrobiana. Para isso, o pH dos sobrenadantes foi ajustado para 2,0 utilizando-se HCl 6 mol L⁻¹. Após armazenamento a 4 °C por aproximadamente 20 horas, os biossurfactantes precipitados foram recuperados por centrifugação a 12.860 x g por 15 minutos a 4 °C e ressuspensos em água destilada, ajustando-se o pH da solução para 7,0 com NaOH 6 mol L⁻¹. Posteriormente, os extratos brutos contendo surfactina foram liofilizados e armazenados sob refrigeração (4 °C) até serem utilizados.

Para a quantificação das moléculas de surfactina produzidas em meio mineral contendo glicose (40 g L⁻¹) ou glicerol (20 g L⁻¹), o cultivo da linhagem foi realizado em 30 mL de meio mineral em frascos Erlenmeyer de 125 mL. A produção e obtenção dos extratos brutos contendo surfactina foi realizada conforme descrito acima.

3.2.3 Efeito da temperatura e do pH sobre a atividade da surfactina

A estabilidade das moléculas de surfactina produzidas a partir de glicose e glicerol foi investigada avaliando-se a tensão superficial, o índice de emulsificação e o espalhamento de óleo em placa, após incubação dos sobrenadantes das culturas sob diferentes valores de temperatura e de pH. Para realização dos ensaios, 10 mL dos sobrenadantes (item 3.2.2) foram distribuídos em tubos Falcon de polipropileno de 15 mL.

Para se avaliar o efeito da temperatura, os tubos contendo os sobrenadantes foram incubados a 4, 25, 40, 60 e 80 °C em banho maria e 121 °C em autoclave, por 30 minutos, e posteriormente mantidos em temperatura ambiente até estabilização da temperatura do líquido. Em seguida, as amostras foram submetidas às análises acima referidas.

Para se avaliar o efeito do pH, o pH dos sobrenadantes foi ajustado para 4, 6, 7, 8, 10 e 12, utilizando-se HCl 6 mol L⁻¹ ou NaOH 6 mol L⁻¹. Após 30 minutos, a atividade do biossurfactante foi investigada. Os métodos analíticos foram realizados conforme descrito abaixo. Os experimentos foram feitos em triplicata.

3.2.4 Métodos analíticos

3.2.4.1 Teste de espalhamento de óleo em placa

O teste de espalhamento de óleo em placa foi realizado conforme descrito por Morikawa et al. (2000), com modificações. Uma placa de Petri (150 x 20 mm) foi preenchida com 70 mL de água destilada e 20 µL de petróleo. Posteriormente, 10 µL do sobrenadante foram adicionados à superfície do óleo e o diâmetro do halo claro formado no filme de óleo foi determinado após 30 segundos, com o auxílio de uma régua.

3.2.4.2 Índice de emulsificação

O índice de emulsificação foi determinado de acordo com Cooper & Golderberg (1987), com modificações. Inicialmente, 4 mL do sobrenadante foram adicionados a um tubo de vidro (10 x 15 mm) contendo 4 mL de querosene (Sigma-Aldrich). Os tubos foram cobertos com um filme plástico Parafilm M (PM996) e agitados em um agitador tipo vórtex (Deluxe vortex mixer 045415 - Thermo Scientific) na velocidade máxima, por 2 minutos. Após 24 horas, o índice de emulsificação (EI₂₄) foi calculado usando-se a seguinte equação:

$$EI_{24} (\%) = \frac{\textit{altura da camada de emulsão}}{\textit{altura total do líquido}} \times 100$$

3.2.4.3 Tensão superficial

A tensão superficial dos sobrenadantes foi determinada pelo método da placa de Wilhelmy utilizando-se o tensiômetro Dataphysics DCAT 11EC, de acordo com instruções do manual do fabricante. As medidas foram feitas em temperatura ambiente. Os valores reportados correspondem à média de três medições.

3.2.4.4 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (UPLC-MS/MS)

Para o preparo das amostras, os extratos brutos foram solubilizados em uma solução de água deionizada (Milli-Q) e acetonitrila (40:60 v/v) para uma concentração final de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As soluções foram centrifugadas a 13.000 x g por 10 minutos e os sobrenadantes foram filtrados em filtro com membrana de acetato de celulose de 0,22 μm (Filtrilo) diretamente nos *vials* e armazenados a -20 °C. A curva padrão de surfactina foi preparada pela diluição de uma solução estoque (10 mg mL^{-1}) de surfactina (Sigma-Aldrich), em solução de água deionizada (Milli-Q) e acetonitrila (40:60 v/v), de modo a se obterem as concentrações finais de 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,5625; 0,78125 e 0,3906 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As soluções padrão foram filtradas em filtro com membrana de acetato de celulose de 0,22 μm (Filtrilo) diretamente nos *vials* e armazenadas a -20 °C.

A quantificação das moléculas de surfactina foi realizada utilizando-se o cromatógrafo de fase líquida acoplado ao espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo (modelo 6430 - Agilent) do Núcleo de Análise de Biomoléculas da Universidade Federal de Viçosa. Cinco microlitros de cada amostra e solução padrão foram injetados no cromatógrafo líquido UPLC (modelo 1200 Infinity series). As análises foram realizadas utilizando-se uma coluna Zorbax RRHD SB-CN (150 x 3 mm x 1,8 μm), com fluxo de 0,3 mL min^{-1} , à temperatura de 30 °C e fase móvel constituída de (A) água deionizada acrescida de 0,1 % de ácido fórmico (v/v) e (B) acetonitrila acrescida de 0,1 % de ácido fórmico (v/v). O gradiente de eluição utilizado foi: 0-1,5 min, 45-55% (A-B); 1,5-8 min, 30-70%; 8-14 min, 0-100%; 14-16 min, 0-100%; 16-18 min, 45-55%.

O espectrômetro de massas foi operado no modo ESI positivo e a detecção das moléculas de surfactina foi realizada usando-se o método de monitoramento de reações múltiplas (MRM), seguindo as transições listadas na Tabela 1. Os dados foram processados utilizando-se o software Skyline versão 21.1 conforme descrito por Vital et al. (2019). A transição entre íon precursor e íon produto que apresentou maior intensidade de sinal foi selecionada para a quantificação de cada molécula. Foram construídas curvas padrão para cada íon precursor detectado, com base na abundância relativa de cada molécula no padrão. A abundância relativa de cada molécula foi calculada de acordo com a área encontrada para cada transição escolhida para a quantificação, considerando a soma das áreas de todas as transições, em cada ponto da curva, como 100%. A concentração de cada molécula de surfactina nas amostras foi determinada com base em sua respectiva curva padrão. A concentração final de surfactina corresponde à soma das concentrações de todas as moléculas detectadas.

Tabela 1. Transições MRM, tempos de retenção e energia de colisão utilizados para análise das moléculas de surfactina por UPLC-MS/MS

Íon precursor [M + H] ⁺ (m/z)	Íon Produto (m/z)	Tempo de retenção (min)	Energia de colisão (eV)
1050.7	699.4	5,38	35
	685.3	5,38	35
	610.4	5,38	35
	596.4	5,38	35
	441.3	5,38	35
1036.7	685.3	5,25	35
	582.4	5,25	35
	596.4	5,25	35
	677.4	5,25	35
	699.4	5,25	35
1022.7	582.4	5,03	35
	664.4	5,03	35
	685.4	5,03	35
	596.4	5,18	35
	671.4	5,18	35
1008.7	441.3	4,89	35
	568.4	4,89	35
	685.4	4,89	35
	582.4	5,04	35
	671.4	5,04	35
994.6	441.3	4,75	35
	554.4	4,75	35
	685.3	4,75	35

3.2.5 Atividade antimicrobiana da surfactina

3.2.5.1 Atividade antibacteriana

Para avaliar o espectro de inibição das moléculas de surfactina produzidas a partir de glicose e glicerol, os extratos brutos (item 3.2.2) foram utilizados em ensaios de inibição das linhagens bacterianas de referência: *B. cereus* ATCC 14579, *B. mycoides* ATCC 6462, *B. subtilis* ATCC 23858, *S. aureus* ATCC 12692, *A. faecalis* ATCC 8750, *E. aerogenes* ATCC 13048, *E. coli* ATCC 25922, *K. oxytoca* ATCC 0182, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. alcaligenes* ATCC 14909 e *C. freundii* ATCC 8090.

As linhagens bacterianas, armazenadas a - 80 °C, foram reativadas em meio TSA (Difco™ Tryptic Soy Agar) por 24 horas a 30 °C. Uma colônia de cada linhagem foi transferida para um tubo de vidro contendo 4 mL de caldo Mueller-Hinton (MHC) e os tubos foram incubados a 37 °C, sob agitação de 200 rpm, por 15 horas. Para o preparo do inóculo, cada linhagem teve sua turbidez ajustada para 0,5 da escala McFarland em solução salina 0,85%

(m/v) e, posteriormente, foi diluída em MHC para a concentração de 10^6 UFC mL⁻¹. O extrato bruto de surfactina foi solubilizado em água destilada, a solução foi autoclavada e adicionada ao MHC estéril para se obter uma concentração de 2.000 µg mL⁻¹. Em seguida, 50 µL de cada inóculo foram misturados com 50 µL de MHC contendo surfactina (concentração final de 1.000 µg mL⁻¹ de extrato bruto), em microplacas de 96 poços, de modo a se obter uma densidade de células de aproximadamente 5×10^5 UFC mL⁻¹. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e o crescimento bacteriano foi determinado pela medida da D.O._{600nm}, utilizando-se uma leitora de microplaca PowerWave XS (Bio-Tek Inc.). A porcentagem de inibição foi calculada pela fórmula:

$$IC (\%) = \left(1 - \frac{D_T}{D_C}\right) \times 100,$$

onde IC (%) é a porcentagem de inibição do crescimento, D_T é a D.O._{600nm} da cultura na presença da surfactina e D_C é a D.O._{600nm} do controle de crescimento (crescimento bacteriano em MHC na ausência da surfactina).

A Concentração Mínima Inibitória (MIC) foi determinada pelo método de microdiluição, como recomendado pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (CLSI, 2012). Brevemente, o caldo MHC contendo surfactina (2.000 µg mL⁻¹) foi adicionado em microplacas de 96 poços e submetido a uma diluição seriada 2X para se alcançar a faixa de concentração de 7,8 a 1.000 µg mL⁻¹ de extrato bruto. Os inóculos foram preparados e inoculados na placa conforme descrito anteriormente. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e, posteriormente, foi feita a leitura da D.O._{600nm}. A MIC foi definida como a menor concentração de extrato bruto que resulta em completa inibição do crescimento bacteriano. Em todos os experimentos, os poços não inoculados (MHC com ou sem surfactina) foram usados como branco do experimento e os poços inoculados, contendo MHC sem surfactina, como controle de crescimento. Os experimentos foram realizados em três repetições biológicas com triplicata técnica.

3.2.5.2 Atividade antifúngica

A atividade antifúngica do extrato bruto de surfactina foi avaliada contra o crescimento micelial dos fitopatógenos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp. e *Botrytis cinerea* LPP B87. O extrato bruto foi solubilizado em água destilada e autoclavado. A solução

aquosa de extrato bruto foi adicionada ao meio Batata Dextrose Ágar (BDA) estéril, na temperatura de 60 °C, de modo a se obterem as concentrações desejadas (100 a 1.000 µg mL⁻¹). Em seguida, 20 mL do meio de cultura foram vertidos em placas de Petri (9 x 15 mm).

Discos de micélio dos isolados fúngicos foram removidos das bordas das colônias previamente crescidas em meio BDA e colocados no centro das placas de Petri contendo o meio de cultura com e sem o extrato bruto de surfactina (controle de crescimento). As placas foram incubadas a 25 °C até as placas de Petri do controle de crescimento estarem completamente cobertas pelo micélio. O diâmetro das colônias foi medido utilizando-se um paquímetro digital e a porcentagem de inibição do crescimento micelial foi calculada pela fórmula:

$$ICM (\%) = \left(1 - \frac{T}{C}\right) \times 100$$

onde ICM (%) é a porcentagem de inibição do crescimento micelial, T é o diâmetro da colônia na presença de surfactina e C é o diâmetro (mm) da colônia controle.

O espectro de atividade antifúngica do extrato bruto de surfactina foi determinado na concentração de 1000 µg mL⁻¹. Para as linhagens suscetíveis, as concentrações de 500, 250 e 100 µg mL⁻¹ foram também avaliadas. Os ensaios foram realizados em três repetições.

3.2.5.3 Controle negativo dos ensaios antimicrobianos

De modo a se comprovar que a surfactina é a molécula responsável pela atividade inibitória do extrato bruto, os ensaios anteriores foram realizados utilizando-se extratos brutos produzidos a partir do cultivo de *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA em meio mineral contendo glicose ou glicerol como fonte de carbono, na ausência do indutor IPTG. Estudos prévios demonstraram que, na ausência de IPTG, a produção de surfactina por essa linhagem é quase que totalmente inibida (Almeida, 2018).

Para as linhagens bacterianas e isolados fúngicos suscetíveis, os ensaios antimicrobianos descritos nos itens 3.2.5.1 e 3.2.5.2 foram repetidos, utilizando-se os extratos brutos produzidos na ausência de IPTG, na concentração de 1.000 µg mL⁻¹. Os ensaios foram realizados em três repetições.

3.2.6 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como a média \pm desvio padrão. Os dados foram analisados por *one* e *two-way* ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Bonferroni utilizando o software GraphPad Prism versão 5.04.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Efeito da temperatura e do pH sobre a atividade da surfactina

Os resultados obtidos para estabilidade térmica revelaram que os sobrenadantes contendo surfactina, obtidos a partir do cultivo em meio mineral com glicose ou glicerol como fonte de carbono, são estáveis em uma ampla faixa de temperatura (Figura 1A, B, C). O resfriamento do sobrenadante das culturas contendo a surfactina a 4°C ou seu aquecimento até 121°C não causaram efeito significativo no desempenho do biossurfactante em relação à capacidade de espalhamento de óleo e atividade de emulsificação. A tensão superficial da solução de surfactina produzida a partir de glicose permaneceu estável, enquanto pequenas diferenças foram observadas entre os valores obtidos para a surfactina produzida a partir de glicerol (Figura 1B).

Embora os valores obtidos para a tensão superficial do sobrenadante produzido a partir de glicerol sejam estatisticamente diferentes, a diferença entre eles corresponde a menos de 5%. Essas pequenas variações não afetam a capacidade do biossurfactante em reduzir a tensão superficial. De acordo com Santos et al. (2016), bons surfactantes são capazes de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 30 mN m⁻¹. Os valores de tensão superficial obtidos após os sobrenadantes serem submetidos às diferentes temperaturas ficaram em torno de 26,8 e 27,4 mN m⁻¹ para as surfactinas produzidas a partir de glicose e glicerol, respectivamente. Portanto, as diferenças nos valores de tensão superficial podem ser consideradas irrelevantes do ponto de vista de sua funcionalidade, e os biossurfactantes produzidos a partir de ambas as fontes de carbono mostraram-se estáveis na faixa de temperatura avaliada.

Com relação à variação de pH (Figura 1D, E, F), nossos resultados demonstraram que os biossurfactantes produzidos por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA, a partir de ambas as fontes de carbono, são estáveis na faixa de pH entre 7 e 12. Em pH 12, uma redução na atividade do biossurfactante foi observada somente para a capacidade de espalhamento de óleo (Figura 1D). Nenhum efeito foi observado no índice de emulsificação para a surfactina produzida a partir de glicerol na faixa de pH de 6 a 12. Em contrapartida, para o biossurfactante obtido a partir de glicose, a faixa de estabilidade foi entre 7 e 12 para a habilidade de manter a estabilidade da emulsão (Figura 1E). A perda na atividade de emulsificação da surfactina também foi observada por Long et al. (2017) em pH menor ou igual a 6.

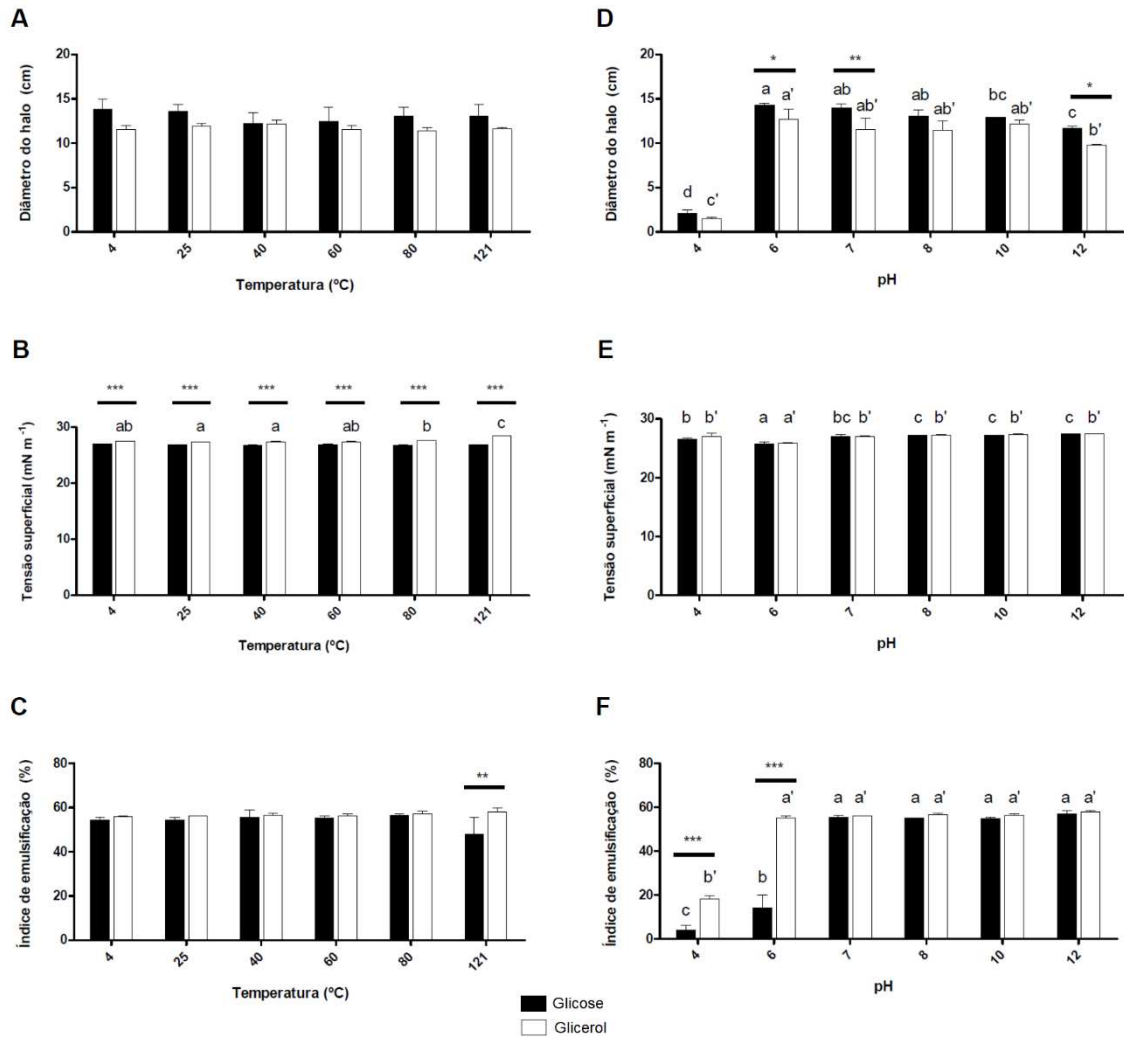


Figura 1. Efeito do pH e da temperatura nas atividades dos biosurfactantes produzidos por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA cultivada em meio mineral com glicose ou glicerol como fonte de carbono. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão dos valores obtidos a partir de três repetições. A comparação das médias entre as fontes de carbono foi realizada por *two-way* ANOVA seguida do teste de comparação múltipla de Bonferroni (*: p-valor < 0,05; **: p-valor < 0,01; ***: p-valor < 0,001). A comparação das médias entre os tratamentos da mesma fonte de carbono foi realizada por *one-way* ANOVA seguida do teste de Bonferroni. Médias com a mesma letra não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade. Letras sem apóstrofo ('): comparação de médias entre tratamentos para o biosurfactante produzido a partir de glicose; letras com apóstrofo ('): comparação de médias entre tratamentos para o biosurfactante produzido a partir de glicerol.

A surfactina contém dois grupos carboxílicos, resíduo de ácido glutâmico (valor de pK_a em torno de 4,5) e resíduo de ácido aspártico (valor de pK_a em torno de 4,3) em sua porção peptídica, os quais conferem a sua natureza aniônica (Vaz et al., 2012; Taira et al., 2017; Janek et al., 2021). Quando exposta a pH 4, a surfactina começa a precipitar. Sob condições ácidas, a molécula perde a sua solubilidade em água possivelmente porque os grupos carboxílicos se encontram em sua forma protonada. Em contrapartida, quando o pH aumenta, os grupos

carboxílicos estão na forma ionizada e a solubilidade da surfactina em água aumenta (Long et al., 2017; Janek et al., 2021). Essa propriedade da surfactina de precipitar em condições ácidas pode tornar a emulsão facilmente quebrável (Long et al., 2017). Gudiña et al. (2010) e Janek et al. (2021) também associaram a instabilidade dos biossurfactantes produzidos por *Lactobacillus paracasei* e *B. subtilis*, respectivamente, em condições ácidas, à presença de grupos carregados negativamente na extremidade polar da molécula, os quais se tornam protonados nessas condições de baixo pH. Desse modo, os biossurfactantes produzidos por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA possivelmente perderam suas capacidades de espalhamento de óleo e emulsificação por terem sofrido precipitação.

Os valores de tensão superficial para o pH 4 ficaram em torno de 26,5 e 27 mN m⁻¹ para os biossurfactantes produzidos a partir de glicose e glicerol, respectivamente; 25,7 mN m⁻¹ para o pH 6 e 27,2 mN m⁻¹ para os outros valores de pH para ambos os biossurfactantes, demonstrando que nenhuma mudança considerável ocorreu nessa propriedade da surfactina. Embora alguns valores tenham sido significativamente diferentes, essas variações não afetam de forma relevante a atividade de superfície do biossurfactante.

Nossos resultados corroboram observações anteriores de que os biossurfactantes (e a surfactina, em particular) são estáveis em uma ampla faixa de temperatura (Lotfabad et al., 2009; Kiran et al., 2017; Janek et al., 2021) e de pH (Lotfabad et al., 2009; Al-Bahry et al., 2012; Mabrouk et al., 2014; Janek et al., 2021). Os valores de tensão superficial obtidos neste trabalho são similares aos previamente reportados para a surfactina (Al-Bahry et al., 2012; Janek et al., 2021), bem como a atividade emulsificante (valores de índice de emulsificação entre 55 e 60%) (Janek et al., 2021), e foram bastante próximos comparando-se os valores obtidos com as moléculas produzidas a partir de glicose ou glicerol.

A habilidade de reduzir significativamente a tensão superficial, de formar e estabilizar emulsões e de manter essas propriedades estáveis em diferentes condições ambientais, fazem da surfactina apropriada para ser utilizada na formulação de produtos de cuidados pessoais; de limpeza, como os detergentes; e de drogas de uso médico (Vaz et al., 2012; Long et al., 2017; Drakontis & Amin, 2020; Janek et al., 2021). Formulações à base de emulsão são amplamente exploradas nas indústrias alimentícia e cosmética (Salek & Euston, 2019). Adicionalmente, a estabilidade dos biossurfactantes a estresses ambientais predominantes em reservatórios de petróleo, como altas temperaturas e diferentes níveis de pH, revela sua utilidade na recuperação melhorada de petróleo e na biorremediação de hidrocarbonetos em condições ambientais adversas (Mabrouk et al., 2014; Long et al., 2017).

Nossos resultados indicam a possível aplicação das surfactinas produzidas por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA, tanto a partir de glicose quanto de glicerol, nas indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética e de petróleo. Ressalta-se que o aquecimento do biosurfactante a 121 °C para atingir a esterilidade é importante para as aplicações nas três primeiras indústrias citadas (Khopade et al., 2012; Patil, 2018). Fernandes et al. (2016) demonstraram previamente a potencial aplicabilidade do biosurfactante produzido por *B. subtilis* LBBMA RI4914 WT na recuperação avançada de petróleo. A linhagem geneticamente modificada utilizada neste trabalho apresenta os benefícios de maior produção de surfactina, a partir de um substrato de baixo custo, em relação à linhagem selvagem.

Pode-se concluir que, independentemente da fonte de carbono utilizada, as moléculas de surfactina produzidas por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA mantêm estáveis sua atividade de superfície e capacidade de formar e estabilizar emulsões entre 4 e 121 °C e entre a faixa de pH de 7 a 12. Portanto, as propriedades físico-químicas das moléculas não foram alteradas em decorrência da fonte de carbono utilizada.

3.3.2 Atividade antimicrobiana

Os extratos brutos de surfactina produzidos por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA a partir de glicose ou glicerol exibiram atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas (*B. mycoides* ATCC 6462, *S. aureus* ATCC 12692 e *B. cereus* ATCC14579), Gram-negativa (*C. freundii* ATCC 8090) e contra o fungo fitopatogênico *Rhizoctonia* sp. (Figuras 2 e 3). Observou-se uma pequena inibição do crescimento planctônico de *A. faecalis* ATCC 8750, *E. aerogenes* ATCC 13048, *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Figura 2). Não foi observada inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium* sp. e *Botrytis cinerea*.

Para investigar se o efeito inibitório dos extratos brutos é causado pela ação da surfactina, os extratos brutos (1.000 µg mL⁻¹) sintetizados a partir do cultivo de *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA em meio mineral contendo glicose ou glicerol, na ausência do indutor IPTG, condição na qual praticamente não há produção de surfactina, foram avaliados contra as linhagens *B. mycoides* ATCC 6462, *S. aureus* ATCC 12692, *C. freundii* ATCC 8090, *B. cereus* ATCC 14579 e *Rhizoctonia* sp. Nessas condições, os extratos brutos não inibiram o crescimento das linhagens bacterianas ou do fungo *Rhizoctonia* sp. (Figura 4). Os resultados confirmam que o efeito inibitório dos extratos brutos observado neste trabalho é derivado da ação da surfactina.

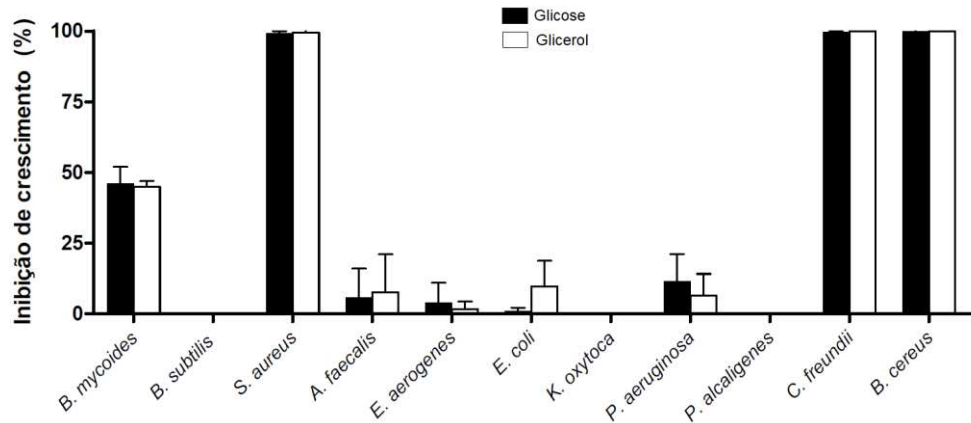


Figura 2. Efeito do extrato bruto de surfactina ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) produzido por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA, cultivada em meio mineral contendo glicose ou glicerol como fonte de carbono, sobre o crescimento planctônico das linhagens bacterianas de referência cultivadas em caldo Mueller-Hinton. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão dos valores obtidos a partir de nove repetições.

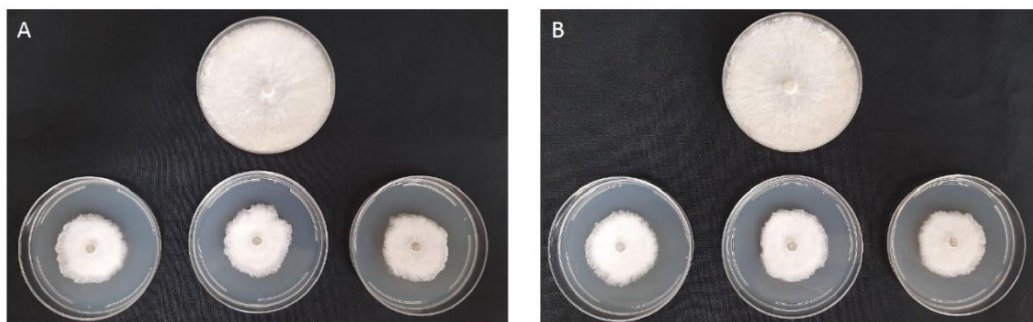


Figura 3. Efeito do extrato bruto de surfactina ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$) produzido por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA, cultivada em meio mineral contendo glicose (A) ou glicerol (B) como fonte de carbono, sobre o crescimento micelial de *Rhizoctonia* sp. cultivado no meio BDA. As imagens comparam o controle de crescimento (placas superiores - BDA sem extrato bruto de surfactina) com as três repetições do tratamento.

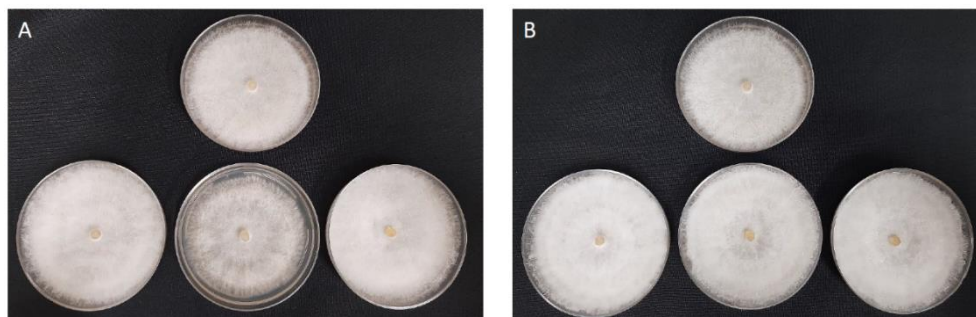


Figura 4. Efeito do extrato bruto ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) produzido por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA, cultivada em meio mineral contendo glicose (A) ou glicerol (B) como fonte de carbono na ausência de IPTG, sobre o crescimento micelial de *Rhizoctonia* sp. cultivado no meio BDA. As imagens comparam o controle de crescimento (placas superiores - BDA sem extrato bruto) com as três repetições do tratamento.

250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos extratos brutos de surfactina, obtidos após o cultivo de *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA em meio de cultura contendo glicose ou glicerol como fontes de carbono, inibiram cerca de 50% do crescimento micelial de *Rhizoctonia* sp. (Figura 3). A MIC de ambos os extratos brutos foi determinada para *S. aureus* ATCC 12692, *C. freundii* ATCC 8090 e *B. cereus* ATCC 14579, as quais foram iguais ou inferiores a 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 2). Ressalta-se que esses valores de MIC foram definidos para o extrato bruto contendo surfactina. Depreende-se, assim, que a concentração de surfactina requerida para inibir o crescimento celular dessas bactérias é ainda menor. O valor de MIC encontrado para cada uma das linhagens não diferiu entre o extrato bruto produzido a partir de glicose ou de glicerol (Tabela 2).

Tabela 2. Concentração mínima inibitória dos extratos brutos de surfactina obtidos a partir do cultivo em meio mineral contendo glicose ou glicerol como fonte de carbono contra as bactérias suscetíveis

Microrganismo	Concentração Mínima Inibitória (MIC) ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
	Extrato Bruto obtido a partir de glicose	Extrato Bruto obtido a partir de glicerol
<i>S. aureus</i> ATCC 12692	62,5	62,5
<i>C. freundii</i> ATCC 8090	31,25	31,25
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	31,25	31,25

Embora a atividade antifúngica seja mais conhecida para os lipopeptídeos iturina e fengicina (Meena & Kanwar, 2015), alguns estudos recentes demonstraram a atividade da surfactina contra algumas espécies de fungos (Krishnan et al., 2019; Hazarika et al., 2019). *Rhizoctonia* é um importante gênero de fungos fitopatogênicos. Esse gênero inclui organismos encontrados no solo que causam doenças em uma grande variedade de culturas, incluindo espécies agrônômicas, ornamentais e florestais (García et al., 2006; Yildirim & Erper, 2017). O efeito sinérgico da surfactina com outros lipopeptídeos contra fungos patogênicos é comumente reportado. Como exemplo, uma forte atividade antifúngica de uma mistura de surfactina, fengicina e iturina contra *Rhizoctonia solani* e *Rhizoctonia bataticola* foi demonstrado por Mnif et al. (2016). Adicionalmente, trabalhos mostrando a surfactina como o componente ativo na inibição do crescimento micelial de *Rhizoctonia cerealis* e *Rhizoctonia solani* foram publicados por Wen et al. (2011) e Hussain & Khan (2020), respectivamente.

Staphylococcus aureus é um patógeno comensal e oportunista encontrado em diversos ambientes. Essa bactéria é o agente causador de um amplo espectro de infecções, desde infecções superficiais de pele até doenças invasivas graves, ocasionalmente fatais (Pérez-Montarelo et al., 2017; Castro et al., 2018; Liu et al., 2019). Esse organismo é um dos patógenos

mais importantes no que se refere a infecções nosocomiais e comunitárias, sendo também responsável por doenças transmitidas por alimentos (Kadariya et al., 2014). A inibição de *S. aureus* pela surfactina produzida por *B. subtilis* foi previamente reportada em outros estudos (Abdelli et al., 2019; Meena et al., 2020). Liu et al. (2019) também observaram a capacidade da surfactina em reduzir a adesão e romper o biofilme de *S. aureus* em diversas superfícies.

Bacillus cereus é um conhecido agente causador de intoxicações de origem alimentar. Além disso, essa bactéria pode causar infecções nosocomiais, sendo responsável por uma série de infecções locais e sistêmicas, tanto em indivíduos imunologicamente comprometidos quanto em imunocompetentes (Bottone, 2010; Messelhäuser & Ehling-Schulz, 2018). Do mesmo modo, o patógeno oportunista *C. freundii* causa um amplo espectro de infecções nos tratos urinário e respiratório, nas feridas e na corrente sanguínea (Anderson et al., 2018). A bacteremia causada por *C. freundii* foi associada a alta mortalidade de pacientes (Kim et al., 2003).

A inibição de *B. cereus* pela surfactina individualmente (Liu et al., 2020^b) ou combinada com fengicina (Huang et al., 2007) foi relatada anteriormente. Em contrapartida, nosso trabalho é o primeiro a reportar o efeito inibitório da surfactina contra *C. freundii*. Moryl et al. (2015) demonstraram a inibição do crescimento de diferentes linhagens de *C. freundii* pelo sobrenadante da linhagem *B. subtilis* I'1a, o qual continha uma mistura dos lipopeptídeos surfactina, fengicina e iturina. Entretanto, Bernat et al. (2016) mostraram que o extrato de *B. subtilis* I'1a continha majoritariamente iturina e fengicina, os quais são os possíveis agentes ativos contra as bactérias uropatogênicas, incluindo *C. freundii*.

Nossos resultados demonstraram que as surfactinas produzidas por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA, a partir de glicose ou glicerol, apresentaram o mesmo espectro de ação, sendo capazes de inibir o crescimento micelial de *Rhizoctonia* sp. e o crescimento planctônico de *S. aureus*, *B. cereus* e *C. freundii*, mostrando que a fonte de carbono utilizada não interferiu na atividade antimicrobiana da molécula. Portanto, ambas as moléculas são alternativas potenciais para o controle de importantes patógenos humanos e outros animais, e também para o controle de doenças em plantas, com destaque para aquelas causadas por *Rhizoctonia* sp.

3.3.3 Quantificação das variantes de surfactina produzidas a partir de glicose ou glicerol

As moléculas de surfactina $[M + H]^+$ com valores de razão massa-carga (m/z) correspondentes a 994.6, 1008.7, 1022.7, 1036.7 e 1050.7 foram encontradas nos extratos brutos obtidos a partir de glicose e glicerol. As mesmas moléculas foram previamente identificadas na composição de surfactinas produzidas por outras linhagens de *B. subtilis* (Moro et al., 2018; Janek et al., 2021).

A concentração de cada molécula de surfactina não diferiu significativamente entre os dois extratos obtidos a partir das diferentes fontes de carbono, sendo os componentes m/z 1036.7 e 1022.7 os mais abundantes (Figura 5). Essas moléculas são também as mais abundantes no padrão da Sigma-Aldrich. A similaridade das misturas de variantes de surfactina encontrada nas análises por UPLC-MS/MS corrobora os resultados obtidos anteriormente neste trabalho, os quais demonstraram que a fonte de carbono utilizada, glicose ou glicerol, não altera as propriedades físico-químicas e a atividade biológica (efeito antimicrobiano) das surfactinas produzidas.

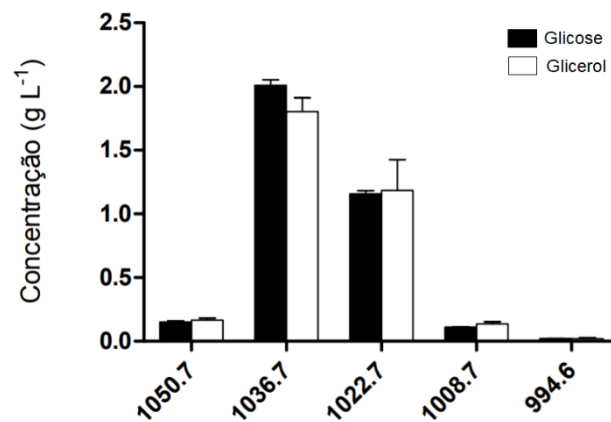


Figura 5. Efeito das diferentes fontes de carbono, glicose e glicerol, sobre a proporção das moléculas de surfactina produzidas por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão dos valores obtidos a partir de três repetições. Os valores de média para cada molécula não diferem estatisticamente pelo teste de Bonferroni a 5% de probabilidade.

3.4 CONCLUSÕES

As moléculas de surfactina produzidas tanto a partir de glicose quanto de glicerol mantêm sua atividade de superfície e capacidade de formar emulsões estáveis entre 4 e 121 °C e valores de pH entre 7 e 12. Apresentam ainda atividade antimicrobiana contra o fungo fitopatogênico *Rhizoctonia* sp., inibindo 50% do crescimento micelial em meio BDA, e as bactérias patogênicas *S. aureus*, *C. freundii* e *B. cereus*, com 100% de inibição do crescimento planctônico. A fonte de carbono utilizada para a produção de surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA (glicose ou glicerol) não interfere na concentração das variantes de moléculas de surfactina produzidas, nem mesmo nas propriedades físico-químicas e na atividade antimicrobiana das mesmas. Conclui-se que o glicerol pode ser utilizado em substituição à glicose como fonte de carbono na composição do meio de cultivo para a produção de surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA, o que contribui para reduzir potencialmente o custo de produção desse lipopeptídeo em escala industrial.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelli, F.; Jardak, M.; Elloumi, J.; Stien, D.; Cherif, S.; Mnif, S.; Aifa, S. Antibacterial, anti-adherent and cytotoxic activities of surfactin(s) from a lipolytic strain *Bacillus safensis* F4. *Biodegradation*, v. 30, p. 287–300, 2019.
- Al-bahry, S. N.; Al-wahaibi, Y. M.; Elshafie, A. E.; Al-bemani, A. S.; Joshi, S. J.; Al makhmari, H. S.; Al-sulaimani, H. S. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, v. 81, p. 141–146, 2012.
- Almeida, M. F. *Bacillus subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA: uma nova linhagem geneticamente melhorada para produção de surfactina. 77f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2018.
- Anderson, M. T.; Mitchell, L. A.; Zhao, L.; Mobley, H. L. T. *Citrobacter freundii* fitness during bloodstream infection. *Scientific Reports*, v. (8)11792, p. 1-14, 2018.
- Araujo, L. V.; Guimarães, C. R.; Marquita, R. L. S.; Santiago, V. M. J.; Souza, M. P. S.; Nitschke, M.; Freire, D. M. G. Rhamnolipid and surfactin: Anti-adhesion/antibiofilm and antimicrobial effects. *Food Control*, v. 63, p. 171-178, 2016.
- Bernat, P.; Paraszkiwicz, K.; Siewiera, P.; Moryl, M.; Płaza, G.; Chojniak, J. Lipid composition in a strain of *Bacillus subtilis*, a producer of iturin A lipopeptides that are active against uropathogenic bacteria. *World J Microbiol Biotechnol*, v. 32(157), p. 1-13, 2016.
- Bottone, E. J. *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 23(2), p. 382–398, 2010.
- Castro, A.; Silva, J.; Teixeira, P. *Staphylococcus aureus*, a Food Pathogen: Virulence Factors and Antibiotic Resistance. In Holban, A. M. & Grumezescu, A. M. *Handbook of Food Bioengineering, Foodborne Diseases* (v. 15, p. 213-238), Academic Press, 2018.
- Chen, W.; Juang, R.; WEI, Y. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*, v. 103, p. 158–169, 2015.
- CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard - Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
- Cooper, D. G. & Goldenberg, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 53 (2), p. 224-229, 1987.
- Cosmina, P.; Rodriguez, F.; Ferra, F.; Grandi, G.; Perego, M.; Venema, G.; Sinderen, D. Sequence and analysis of the genetic locus responsible for surfactin synthesis in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, v. 8(5), p. 821-831, 1993.
- Deleu, M.; Razafindralambo, H.; Popineau, Y.; Jacques, P.; Thonart, P.; Paquot, P. Interfacial and emulsifying properties of lipopeptides from *Bacillus subtilis*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 152, p. 3-10, 1999.
- Dhali, D.; Coutte, F.; Arias, A. A.; Auger, S.; Bidnenko, V.; Chataigné, G.; Lalk, M.; Niehren, J.; Sousa, J.; Versari, C.; Jacques, P. Genetic engineering of the branched fatty acid metabolic

pathway of *Bacillus subtilis* for the overproduction of surfactin C14 isoform. *Biotechnol. J.*, v. 12, p. 1-10, 2017.

Drakontis, C. E. & Amin S. Biosurfactants: Formulations, Properties, and Applications, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2020.03.013>, 2020.

Fernandes, P.L.; Rodrigues, E.M.; Paiva, F.R.; Ayupe, B.A.L.; Mcinerney, M.J.; Tótoła, M.R. Biosurfactant, solvents and polymer production by *Bacillus subtilis* RI4914 and their application for enhanced oil recovery. *Fuel*, v. 180, p. 551–557, 2016.

França, I. W. L.; Lima, A. P.; Lemos, J. A. M.; Lemos, C. G. F.; Melo, V. M.; Sant'ana, H. B.; Gonçalves, L. R. B. Production of a biosurfactant by *Bacillus subtilis* ICA56 aiming bioremediation of impacted soils. *Catalysis Today*, v. 255, p. 10-15, 2015.

García, V. G.; Onco, M. A. P.; Susan, V. R. Review. Biology and Systematics of the form genus *Rhizoctonia*. *Spanish Journal of Agricultural Research*, v. 4(1), p. 55-79, 2006.

Gudiña, E. J.; Teixeira, J. A.; Rodrigues, L. R. Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus paracasei*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 76, p. 298–304, 2010.

Hazarika, D. J.; Goswami, G.; Gautom, T. G.; Parveen, A.; Das, P.; Barooah, M.; Boro, R. C. Lipopeptide mediated biocontrol activity of endophytic *Bacillus subtilis* against fungal phytopathogens. *BMC Microbiology*, v.19(71), p. 1-13, 2019.

Huang, X.; Lu, Z.; Bie, X.; Lü, F.; Zhao, H.; Yang, S. Optimization of inactivation of endospores of *Bacillus cereus* by antimicrobial lipopeptides from *Bacillus subtilis* fmbj strains using a response surface method. *Appl Microbiol Biotechnol.*, v. (74) p. 454–461, 2007.

Hussain, T. & Khan, A. A. *Bacillus subtilis* HussainT-AMU and its Antifungal activity against Potato Black scurf caused by *Rhizoctonia solani* on seed tubers. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 23, p. 1-6, 2020.

Jacques, P. Surfactin and other lipopeptides from *Bacillus* spp. In: Soberón-Chávez, G. (Editor) *Biosurfactants*, v. 20, p. 57-91. Springer-Verlag: Berlin, 2011.

Janek, T.; Gudiña, E. J.; Połomska, X.; Biniarz, P.; Jama, D.; Rodrigues, L. R.; Rymowicz, W.; Lazar, Z. Sustainable surfactin production by *Bacillus subtilis* using crude glycerol from different wastes. *Molecules*, 26, 3488, 2021.

Kadariya, J.; Smith, T. C.; Thapaliya, D. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. *BioMed Research International*, 827965, 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/827965>

Khopade, A.; Biao, R.; Liu, X.; Mahadik, K.; Zhang, L.; Korake, C. Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardiopsis* sp. B4. *Desalination*, v. 285, p. 198–204, 2012.

Kim, B. N.; Woo, J. H.; J. Kim, R. Y. S. Resistance to extended-spectrum cephalosporins and mortality in patients with *Citrobacter freundii* bacteremia. *Infection*, v. 31, p. 202-207, 2003.

Kiran, G. S.; Priyadharsini, S.; Sajayan, A.; Priyadharsini, G. B.; Poulouse, N.; Selvin, J. Production of lipopeptide biosurfactant by a marine *Nesterenkonia* sp. and its application in food industry. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 1-11, 2017.

Krishnan, N.; Velramar, B.; Velu, R. K. Investigation of antifungal activity of surfactin against mycotoxigenic phytopathogenic fungus *Fusarium moniliforme* and its impact in seed germination and mycotoxicosis. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 155, p. 101–107, 2019.

Liu, X. Y.; Yang, S. Z.; Mu, B. Z. Isolation and characterization of a C-12-lipopeptide produced by *Bacillus subtilis* HSO 121. *Journal of Peptide Science*, v. 14, p. 864-875, 2008.

Liu, J.; Li, W.; Zhu, X.; Zhao, H.; Lu, Y.; Zhang, C.; Lu, Z. Surfactin effectively inhibits *Staphylococcus aureus* adhesion and biofilm formation on surfaces. *Appl Microbiol Biotechnol.*, v. 103(11), p. 4565-4574, 2019.

^aLiu, K.; Sun, Y.; Cao, M.; Wang, J.; Lu, J. R.; Xu, H. Rational design, properties, and applications of biosurfactants: a short review of recent advances. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 45, p. 57-67, 2020.

^bLiu, Y.; Teng, K.; Wang, T.; Dong, E.; Zhang, M.; Tao, Y.; Zhong, J. Antimicrobial *Bacillus velezensis* HC6: production of three kinds of lipopeptides and biocontrol potential in maize. *Journal of Applied Microbiology*, v. 128(1), p. 242-254, 2020.

Long, X.; He, N.; He, Y.; Jiang, J.; Wu, T. Biosurfactant surfactin with pH-regulated emulsification activity for efficient oil separation when used as emulsifier. *Bioresource Technology*, v. 241, p. 200–206, 2017.

Lotfabad, T. B.; Shourian, M.; Roostaazad, R.; Najafabadi, A. R.; Adelzadeh, M. R.; Noghabi, K. A. An efficient biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* MR01, isolated from oil excavation areas in south of Iran. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 69, p. 183–193, 2009.

Mabrouk, M. E. M.; Youssif, E. M.; Sabry, A. S. Biosurfactant production by a newly isolated soft coral-associated marine *Bacillus* sp. E34: Statistical optimization and characterization. *Life Science Journal*, v. 11(10), p. 756-768, 2014.

Meena, K. R. & Kanwar, S. S. Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: applications in food safety and therapeutics. *BioMed Research International*, v. 2015, p. 1-9, 2015.

Meena, K. R.; Sharma, A.; Kanwar, S. S. Antitumoral and antimicrobial activity of surfactin extracted from *Bacillus subtilis* KLP2015. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, v. 26, p. 423–433, 2020.

Messelhäußer, U. & Ehling-Schulz, M. *Bacillus cereus*—a multifaceted opportunistic pathogen. *Current Clinical Microbiology Reports*, v. 5, p. 120–125, 2018.

Mnif, I.; & Grau-Campistany, A.; Coronel-León, J.; Hammami, I.; Mohamed Ali Triki, M. A.; Manresa, A.; Ghribi, D. *Environ Sci Pollut Res*, v. 23, p. 6690–6699, 2016.

Morikawa, M.; Hirata, Y.; Imanaka, T. A study on the structurefunction relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1488, p. 211-218, 2000.

- Moro, G. V.; Almeida, R. T. R.; Napp, A. P.; Porto, C.; Pilau, E. J.; Ludtke, D. S.; Moro, A. V.; Vainstein, M. H. Identification and ultra-high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry characterization of biosurfactants, including a new surfactin, isolated from oil-contaminated environments. *Microbial Biotechnology*, v. 11(4), p. 759–769, 2018.
- Moryl, M.; Spętańska, M.; Dziubek, K.; Paraszkiwicz, K.; Różalska, S.; Grażyna A. Płaza, G. A.; Różalski, A. Antimicrobial, antiadhesive and antibiofilm potential of lipopeptides synthesised by *Bacillus subtilis*, on uropathogenic bacteria. *Acta Biochim Pol*, v. 62(4), p. 725–732, 2015.
- Nanjundan, J.; Ramasamy, R.; Uthandi, S.; Ponnusamy, M. Antimicrobial activity and spectroscopic characterization of surfactin class of lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* SR1. *Microbial Pathogenesis*, v. 128, p. 374–380, 2019.
- Nakano, M. M.; Magnuson, R.; Myers, A.; Curry, J.; Grossman, A. D.; Zuber, P. *srfA* is an operon required for surfactin production, competence development, and efficient sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, v. 173(5), p. 1770–1778, 1991.
- Patil, M. Production and stability studies of biosurfactant produced by an isolated indigenous bacterial strain. *The Pharma Innovation Journal*, v. 7(12), p. 238–244, 2018.
- Pérez-Montarelo, D.; Viedma, E.; Murcia, M.; Muñoz-Gallego, I.; Larrosa, N.; Brañas, P.; Fernández-Hidalgo, N.; JGavaldà, J.; Almirante, B.; and Chaves, F. Pathogenic characteristics of *Staphylococcus aureus* endovascular infection isolates from different clonal complexes. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 1–13, 2017.
- Salek, K. & Euston, S. R. Sustainable microbial biosurfactants and bioemulsifiers for commercial exploitation. *Process Biochemistry*, v. 85, p. 143–155, 2019.
- Santos, D. K. F.; Rufino, R. D.; Luna, J. M.; Santos, V. A.; Sarubbo, L. A. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, p. 401, 2016.
- Santos, V. S. V.; Silveira, E.; Pereira, B. B. Toxicity and applications of surfactin for health and environmental biotechnology. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, v. 21, p. 382–399, 2019.
- Seydlová, G.; Čabala, R.; Svobodová, J. Surfactin – Novel Solutions for Global Issues. *Biomedical Engineering, Trends, Research and Technologies*, v. 13, p. 305–330, 2011.
- Singh, P.; Patil, Y.; Rale, V. Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies. *Journal of Applied Microbiology*, v. 126, p. 2–13, 2018.
- Taira, T.; Yanagisawa, S.; Nagano, T.; Tsuji, T.; Endo, A.; Imura, T. pH-induced conformational change of natural cyclic lipopeptide surfactin and the effect on protease activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 156, p. 382–387, 2017.
- Vater, P.J.; Kablitz, B.; Wilde, C.; Franke, P.; Mehta, N.; Cameotra, S.S. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 12, p. 6210–6219, 2002.

Vaz, D. A.; Gudiña, E. J.; Alameda, E. J.; Teixeir, J. A.; Lúgia R. Rodrigues. Performance of a biosurfactant produced by a *Bacillus subtilis* strain isolated from crude oil samples as compared to commercial chemical surfactants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 89, p. 167–174, 2012.

Vital, C. E.; Gómez, J. D.; Vidigal, P. M.; Barros, E.; Pontes, C. S. L.; Vieira, N. M.; Ramos, H. J.O. Phytohormone profiling by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC/MS). *Protocols.io*, 2019. <https://doi.org/10.17504/protocols.io.zgff3tn>.

Wang, Q.; Yu, H.; Wang, M.; Yang, H.; Shen, Z. Enhanced biosynthesis and characterization of surfactin isoforms with engineered *Bacillus subtilis* through promoter replacement and *vitreoscilla* hemoglobin co-expression. *Process Biochemistry*, v. 70, p. 36-44, 2018.

Wen, C.; Yin, Z.; Wang, K. Chen, J.; and Shen, S. Purification and structural analysis of surfactin produced by endophytic *Bacillus subtilis* EBS05 and its antagonistic activity against *Rhizoctonia cerealis*. *Plant Pathol. J.*, v. 27(4), p. 342-348, 2011.

Wu, Y.; Ngai, S.; Goh, B.; Chan, K.; Lee, L.; Chuah, L. Anticancer activities of surfactin and potential application of nanotechnology assisted surfactin delivery. *Front. Pharmacol.*, v. 8(761), p. 1-22, 2017.

Yildirim & Erper. Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. isolated from vegetable crops grown in greenhouses in samsun province, turkey. *Biosci. J.*, v. 33(2), p. 257-267, 2017.

CAPÍTULO 4

Investigação dos fatores limitantes da produção de surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA em meio mineral suprido com glicerol como fonte de carbono

Investigação dos fatores limitantes da produção de surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA em meio mineral suprido com glicerol como fonte de carbono

RESUMO

Bacillus subtilis LBBMA RI4914 IsrfA é uma linhagem geneticamente melhorada para a produção de surfactina, cujo operon responsável pela síntese da surfactina (*srfA*) é regulado por um promotor forte e induzido por IPTG. Essa linhagem é capaz de produzir altas concentrações de moléculas funcionais de surfactina utilizando glicerol como fonte de carbono. A produção de surfactina depende de fatores como a expressão do operon *srfA*, o suprimento dos precursores da molécula (aminoácidos e ácidos graxos) e a resistência da linhagem à ação antimicrobiana da surfactina. Nesse capítulo, avaliaram-se alguns dos fatores que podem limitar a síntese da surfactina pela linhagem *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA a partir do glicerol. Para isso, os efeitos da suplementação do meio mineral com os aminoácidos L-leucina, L-valina, L-glutamato e L-aspartato sobre o crescimento e produção de surfactina pela linhagem, bem como sua sensibilidade à surfactina foram investigados. Morfologia das células, viabilidade celular, esporulação e perfil de ácidos graxos das células da linhagem *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA cultivada em meio mineral contendo glicerol como fonte de carbono, na presença e ausência de IPTG, foram avaliados e comparados com os resultados obtidos com a linhagem selvagem *B. subtilis* LBBMA RI4914 WT. A morfologia das células produtoras não foi alterada pela surfactina e a linhagem RI4914 IsrfA é capaz de tolerar altas concentrações da molécula, não sendo a ação antimicrobiana da surfactina um gargalo para a superprodução da mesma por esta linhagem. O mecanismo de auto resistência da linhagem à surfactina não envolve alteração do perfil de ácidos graxos de membrana. Constatou-se que a adição de leucina ao meio de cultivo acelera a produção de surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA e que a esporulação, observada ao longo de todas as fases do crescimento celular, pode ser um fator limitante para o aumento da produção. Desse modo, a suplementação do meio mineral com leucina ou a obtenção de linhagens geneticamente modificadas para aumento da síntese desse aminoácido e/ou não formadora de endósporos, constituem possíveis estratégias para se viabilizar a produção comercial de surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA em meio mineral contendo glicerol como fonte de carbono.

4.1 INTRODUÇÃO

A surfactina é um lipopeptídeo que contém em sua estrutura os aminoácidos leucina, valina, glutamato e aspartato e uma cadeia de ácido graxo β -hidróxi (Jacques, 2011; Santos et al., 2019). O complexo multienzimático composto pelas enzimas peptídeo sintetases não ribossomais (NRPS), codificado pelo operon *surfA* (Nakano et al., 1991; Cosmina et al., 1993), é responsável pela síntese da surfactina, a qual pode ser dividida em três fases. A primeira envolve a biossíntese dos ácidos graxos; a segunda, a biossíntese dos aminoácidos e a terceira, a montagem da molécula, que se inicia pela condensação do ácido graxo ao resíduo de glutamato, seguida da elongação da cadeia peptídica pelas NRPS (Zhi et al., 2017; Wang et al., 2019).

As NRPS usam aminoácidos e ácidos graxos presentes no interior da célula como substratos para a síntese da surfactina (Zhou et al., 2018). Competitivamente, os aminoácidos e ácidos graxos presentes no citoplasma são geralmente utilizados para sintetizar elementos estruturais da célula e várias enzimas (Zhi et al., 2017). Nesse sentido, o conteúdo intracelular de tais precursores afeta significativamente a produção de surfactina (Zhou et al., 2018; Hu et al., 2019). Além de compor a estrutura da surfactina, os aminoácidos de cadeia ramificada, leucina e valina, são também importantes para a síntese da molécula, pois fornecem precursores para a biossíntese dos ácidos graxos de cadeia ramificada (Kaneda, 1977; Hu et al., 2019), os quais também compõem a estrutura da molécula. Do mesmo modo, a elevada expressão do operon *surfA* é de extrema importância para se alcançar alta produtividade de surfactina (Wu et al., 2019; Théâtre et al., 2021).

A surfactina é conhecida por seu amplo espectro antimicrobiano. O modo de ação da surfactina envolve mecanismos de interação com a membrana fosfolipídica, que levam à perturbação e até mesmo à perda da integridade da mesma (Théâtre et al., 2021). Os mecanismos propostos incluem a inserção da surfactina entre os fosfolipídeos da membrana, a desestabilização da permeabilidade da membrana pela formação de canais e sua solubilização (Seydlová & Svobodová, 2008; Santos et al., 2018). Levando-se em consideração a atividade antimicrobiana da surfactina, fatores como a auto resistência, bem como o efluxo da molécula pela linhagem produtora, são essenciais para a alta produtividade de surfactina (Zhi et al., 2017; Wu et al., 2019).

Pouco ainda é conhecido a respeito do mecanismo de resistência das linhagens produtoras de surfactina ao efeito antibacteriano da molécula (Wu et al., 2019). No entanto, algumas proteínas envolvidas com o processo têm sido caracterizadas. SwrC, sinônima de

YerP, além de AcrB, são importantes para a secreção da surfactina e auto resistência em *B. subtilis* (Tsuge et al., 2001; Li et al., 2015; Wu et al., 2019). Adicionalmente, o operon *liaRSFGHI*, que codifica para genes associados com a resistência à daptomicina (análogo estrutural da surfactina), parece estar envolvido com a resistência à surfactina (Zhi et al., 2017; Wu et al., 2019).

Desse modo, para se alcançar uma produção de surfactina em altas concentrações, o suprimento dos precursores, a montagem da molécula pelas NRPS codificadas pelo operon *srfA*, a exportação e auto resistência da linhagem produtora são determinantes (Zhi et al., 2017; Zhou et al., 2018; Théâtre et al., 2021). Conforme demonstrado nos capítulos anteriores, a produção de surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA a partir do uso de glicerol como fonte de carbono é uma alternativa para sua produção industrial, uma vez que a biossíntese pela linhagem se mostrou mais eficiente quando essa fonte de carbono foi utilizada. Além disso, as atividades físico-químicas e antimicrobianas das moléculas de surfactina produzidas a partir de glicerol não foram alteradas, comparativamente às obtidas em meio com glicose. Nesse sentido, visando possibilitar o aumento da produtividade de surfactina, este capítulo teve como objetivo investigar alguns dos fatores que podem limitar a biossíntese de surfactina pela linhagem *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA a partir de glicerol, e propor estratégias para superar os gargalos identificados.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Microrganismos

Bacillus subtilis LBMMA RI4914 IsrfA é uma linhagem geneticamente melhorada para a produção de surfactina, pertencente ao Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente (LBBMA). A abordagem utilizada para a obtenção dessa linhagem consistiu na substituição do promotor nativo do operon *srfA*, responsável pela síntese da surfactina, pelo promotor forte e induzido por IPTG, *Pgrac* (Almeida, 2018).

Bacillus subtilis LBBMA RI4914 é a linhagem selvagem (wild type – WT), a partir da qual a linhagem IsrfA foi construída. Ela também pertence à coleção de culturas do LBBMA e foi isolada a partir de água de produção do campo de exploração de petróleo da formação Rio Itaúnas, Conceição da Barra, Espírito Santo.

4.2.2 Produção de surfactina e obtenção do extrato bruto

Ambas as linhagens, *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA e WT, foram utilizadas para a produção de surfactina. Uma colônia de cada uma das linhagens foi transferida para tubos de vidro contendo 5 mL de TSB (Difco™ Tryptic Soy Broth), os quais foram incubados por aproximadamente 18 horas a 30 °C, sob agitação de 200 rpm, para a obtenção do pré-inóculo.

Em seguida, uma alíquota das culturas foi transferida para frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 30 mL de meio mineral, de modo a se obter uma densidade óptica a 600 nm (D.O._{600nm}) de 0,05. O meio mineral foi preparado com glicerol (20 g L⁻¹) como fonte de carbono, e continha em sua composição (g L⁻¹): K₂HPO₄ (13,9); KH₂PO₄ (2,7); extrato de levedura (0,05) e NaNO₃ (4,24). A solução de glicerol foi adicionada após autoclavagem do meio mineral (121 °C, 15 minutos) bem como a solução de micronutrientes (50 mL L⁻¹), composta por (g L⁻¹): EDTA (0,5); MgSO₄.7H₂O (3,0); MnSO₄.4H₂O (0,5); NaCl (1,0); CaCl₂.2H₂O (0,1); CoCl₂.6H₂O (0,1); ZnSO₄.7H₂O (0,1); FeSO₄.7H₂O (0,1); CuSO₄.5H₂O (0,01); Na₂MoO₄.2H₂O (0,01); NaSeO₄ (0,01); Na₂WO₄.2H₂O (0,01) e NiCl₂.6H₂O (0,02). Os frascos foram incubados sob agitação de 200 rpm a 30 °C, por 120 horas. A linhagem geneticamente modificada foi cultivada na presença e ausência do indutor IPTG. O IPTG (0,78 mM) foi adicionado ao meio de cultura quando a D.O._{600nm} chegou a 0,29. Alíquotas foram retiradas ao longo do tempo para monitoramento do crescimento, por meio de leitura da D.O._{600nm}, utilizando-se o espectrofotômetro Genesys 10S UV-Vis (Thermo Scientific); da produção de surfactina pelo teste de espalhamento de óleo em placa (item 4.2.4) e para realização das análises descritas adiante.

Para a obtenção do extrato bruto de surfactina, o pré-inóculo foi preparado a partir da transferência de uma colônia de *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA para um frasco Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de TSB. A produção de surfactina foi realizada conforme descrito anteriormente, mas em maior escala, utilizando-se um frasco Erlenmeyer de 1 L contendo 250 mL de meio mineral. Ao final do tempo de incubação, a cultura foi centrifugada a 12.860 x g por 15 minutos a 4 °C para remoção das células e o sobrenadante foi submetido à precipitação ácida, pelo ajuste do pH para 2,0 utilizando-se HCl 6 mol L⁻¹. Após armazenamento a 4 °C por aproximadamente 20 horas, o biosurfactante precipitado foi recuperado por centrifugação a 12.860 x g por 15 minutos a 4 °C e ressuspenso em água destilada, ajustando-se o pH da solução para 7,0 com NaOH 6 mol L⁻¹. Posteriormente, o extrato bruto contendo surfactina foi liofilizado e armazenado sob refrigeração (4 °C) até ser utilizado.

4.2.3 Efeito da suplementação do meio mineral com aminoácidos sobre a produção de surfactina

Soluções estoque dos aminoácidos L-leucina, L-valina, L-ácido glutâmico e L-ácido aspártico (Sigma-Aldrich), os quais compõem a porção peptídica da surfactina, foram preparadas em água deionizada (Milli-Q), de acordo com a solubilidade de cada aminoácido, e as soluções foram esterilizadas por filtração em membranas de 0,22 µm.

A produção de surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA foi realizada conforme descrito no item 4.2.2. Foi avaliada a suplementação do meio mineral com os aminoácidos individualmente ou em combinações (Tabela 1). Como a leucina é o componente mais abundante na molécula de surfactina, avaliou-se a adição de diferentes concentrações desse aminoácido e sua combinação com os demais.

Tabela 1. Condições de suplementação do meio mineral avaliadas

Tratamento	Aminoácidos e Concentração
1. Controle	Sem adição de aminoácidos
2	Leucina (5 mM)
3	Leucina (10 mM)
4	Leucina (20 mM)
5	Valina (5 mM)
6	Glutamato (5 mM)
7	Aspartato (5 mM)
8	Leucina (10 mM) + Valina (5 mM)
9	Leucina (10 mM) + Glutamato (5 mM)
10	Leucina (10 mM) + Aspartato (5 mM)

Alíquotas foram retiradas ao longo do tempo de cultivo para avaliação do crescimento celular, por meio de leitura da D.O._{600nm}, e da produção de surfactina, pelo teste de espalhamento de óleo em placa (item 4.2.4). O efeito da suplementação do meio mineral também foi investigado para a linhagem *B. subtilis* LBBMA RI4914 WT pela adição de leucina (10 mM). Os resultados foram expressos como a média de três repetições \pm desvio padrão.

4.2.4 Teste de espalhamento de óleo em placa

O teste de espalhamento de óleo em placa foi realizado conforme descrito por Morikawa et al. (2000), com modificações. Para o ensaio, uma placa de Petri (150 x 20 mm) foi preenchida com 70 mL de água destilada e 20 μ L de petróleo. Posteriormente, 10 μ L do sobrenadante das culturas foram adicionados à superfície do óleo e o diâmetro do halo claro formado no filme de óleo foi determinado após 30 segundos, com o auxílio de uma régua.

4.2.5 Avaliação da viabilidade celular por quantificação de ATP

A viabilidade celular de *B. subtilis* LBBMA RI4914 WT e IsrfA durante o cultivo em meio mineral contendo glicerol como fonte de carbono, na ausência e presença de IPTG (para RI4914 IsrfA), foi investigada utilizando-se o método de quantificação de ATP BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay (Promega), seguindo-se as instruções do fabricante. O ensaio foi realizado em placa de 384 poços e a leitura da luminescência foi feita em um equipamento Varioskan™ LUX multimode microplate reader (Thermo Scientific™). Os ensaios foram realizados em três repetições e os resultados foram expressos pela média \pm desvio padrão.

4.2.6 Avaliação da formação de endósporos

Para avaliar a formação de endósporos durante o cultivo em meio mineral contendo glicerol como fonte de carbono, alíquotas das culturas de *B. subtilis* LBBMA RI4914 WT e IsrfA (na presença e ausência de IPTG) foram retiradas a cada 24 horas e as células foram submetidas à coloração diferencial de esporos (Schaeffer & MacDonald, 1933). Uma alíquota de 5 μ L de cada cultura foi transferida para lâminas de vidro para o preparo do esfregaço, o qual foi fixado por exposição ao calor (passando-se 3 vezes a lâmina sobre uma chama), e coberto com uma solução do corante verde malaquita a 5% (m/v). Após 1 minuto, a lâmina foi passada sobre uma chama até que vapor fosse desprendido da mesma, sem deixar o corante ferver. Esse procedimento foi repetido 3 vezes e, posteriormente, o corante foi lavado com água destilada. O esfregaço foi então coberto com uma solução de safranina a 5% (m/v) durante 30 segundos, seguindo-se a lavagem com água destilada. Após secagem com papel, as lâminas

foram visualizadas em microscópio óptico com a objetiva de imersão (aumento de 1.000x), sendo possível a identificação de endósporos na coloração verde e células vegetativas em vermelho/rosa.

4.2.7 Avaliação da sensibilidade de *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA à surfactina

A suscetibilidade de *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA à surfactina foi avaliada pelo método de microdiluição. O extrato bruto de surfactina, obtido no item 4.2.2, foi solubilizado em água destilada, a solução foi autoclavada e adicionada ao meio mineral estéril (preparado conforme descrito no item 4.2.2), de modo a se obter uma concentração de surfactina de aproximadamente 28 g L⁻¹. O meio mineral contendo surfactina foi transferido para uma microplaca de 96 poços e submetido a uma diluição seriada 2X para se alcançar a faixa de concentração final de 0,4375 a 14 g L⁻¹ de surfactina.

Uma colônia da linhagem, previamente crescida em meio TSA (Difco™ Tryptic Soy Agar), foi transferida para um tubo de vidro contendo 5 mL de TSB e o tubo foi mantido a 30 °C sob agitação de 200 rpm. Após 18 horas, a D.O._{600nm} da cultura foi ajustada para 0,2 em meio mineral e 50 µL da suspensão de células foram adicionados à microplaca de 96 poços contendo o meio de cultura suplementado com surfactina, para se obter uma densidade inicial de células igual a 0,1. A placa foi incubada a 30 °C por 24 horas e, após esse período, o crescimento bacteriano foi determinado pela D.O._{600nm}, utilizando-se uma leitora de microplaca PowerWave XS (Bio-Tek Inc.). Poços não inoculados (meio mineral com ou sem surfactina) foram usados como branco do experimento e os poços inoculados, contendo meio mineral sem surfactina, como controle de crescimento. Os experimentos foram realizados em três repetições biológicas com triplicata técnica. Os resultados foram expressos pela média ± desvio padrão.

4.2.8 Análise morfológica das células de *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA e WT por Microscopia de Força Atômica (AFM)

Para avaliar se a morfologia das células produtoras de surfactina é alterada pela ação da molécula durante a sua produção, as linhagens *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA e *B. subtilis* LBBMA RI4914 WT foram cultivadas em meio mineral contendo glicerol como fonte de carbono, conforme descrito no item 4.2.2. Como controle negativo, foi analisada a morfologia das células de *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA cultivada na ausência de IPTG, condição em que a produção de surfactina é praticamente nula.

Alíquotas de 500 µL foram retiradas das culturas nos períodos de 96 e 120 horas. As alíquotas foram centrifugadas a 10.000 x g por 5 minutos. As células foram lavadas duas vezes

e ressuspendidas em igual volume de água deionizada. As suspensões de células foram espalhadas sobre lâminas de vidro de 1 cm² com a utilização de alça de repicagem. As lâminas foram armazenadas em temperatura ambiente e, anteriormente à análise, foram mantidas a 40 °C por 4 horas.

A análise da morfologia das células foi realizada em Microscópio de Varredura por Sonda - Ntegra Prima localizado no Departamento de Física da Universidade Federal de Viçosa. Foram realizadas medidas de topografia das células pelo modo de contato intermitente, de modo a se minimizar o risco de deformação das células.

4.2.9 Análise do perfil de ácidos graxos de *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA e WT

Para investigar se alterações no perfil de ácidos graxos de membrana estão associadas ao mecanismo de auto resistência das linhagens produtoras à ação da surfactina, a composição e a abundância dos ácidos graxos das células de *B. subtilis* LBBMA RI4914 WT e *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA foram avaliadas a cada 24 horas durante o cultivo em meio mineral contendo glicerol como fonte de carbono, na presença de IPTG (para RI4914 IsrfA). O perfil de ácidos graxos de *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA, cultivada na ausência de IPTG, foi avaliado como controle negativo.

Alíquotas de 1 mL para os dois primeiros pontos (24 e 48 horas) e 500 µL para os demais foram retiradas das culturas, centrifugadas a 10.000 x g por 5 minutos e as células foram armazenadas a - 80 °C. Posteriormente, os ácidos graxos das células foram saponificados, metilados e extraídos seguindo-se o protocolo recomendado por Sasser (1990). A análise dos ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) foi realizada no cromatógrafo a gás modelo 7890A (Agilent), utilizando-se uma coluna capilar HP-ULTRA (2–25 m × 0.2 mm × 0.33 µm). A identificação e quantificação da abundância relativa dos FAMES foram obtidas utilizando-se o software Sherlock Microbial Identification System (MIDI Inc., Newark, Delaware, USA) e o método RTSA, segundo as recomendações do fabricante. Os ácidos graxos com abundância menor que 1% foram desconsiderados nos resultados. Os dados foram expressos como a média de três repetições ± desvio padrão.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Efeito da suplementação do meio mineral com aminoácidos sobre a produção de surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA

A adição de valina, glutamato e aspartato ao meio de cultura provocou um aumento de aproximadamente 4 vezes na produção de surfactina nas primeiras 24 horas de cultivo (Figura 1A-D). No entanto, considerando os valores máximos de espalhamento de óleo alcançados na presença desses aminoácidos, constatou-se que a produção máxima de surfactina foi menor comparada ao tratamento controle, em que não houve adição de aminoácidos. A produção máxima alcançada com a adição de leucina foi semelhante para as três concentrações avaliadas e para o controle (Figura 1A, E, F, G). Quando leucina foi adicionada ao meio de cultura nas concentrações de 10 e 20 mM, a produção máxima ocorreu 48 horas antes da alcançada pelo controle. A densidade máxima de células alcançada nos meios com essas duas concentrações do aminoácido foi menor do que a obtida no tratamento controle, indicando que a leucina adicionada ao meio foi direcionada para a biossíntese de surfactina e não para a produção de biomassa.

Com relação ao crescimento celular, a densidade máxima de células foi alcançada em 72 horas para os cultivos com adição de leucina nas três concentrações e com a adição de glutamato, sendo observada uma queda na densidade de células após esse tempo (Figura 1C, E, F, G). O mesmo comportamento foi observado para o controle e para o cultivo obtido em meio suplementado com aspartato, embora a densidade máxima tenha sido, nesse caso, alcançada no tempo de 96 horas (Figura 1A, D). O crescimento celular na presença do aminoácido valina foi mais lento comparado aos demais, atingindo-se a densidade máxima de células em 120 horas e não sendo observada a fase de morte no período avaliado (Figura 1B).

Quando leucina foi adicionada juntamente com glutamato, o pico de produção de surfactina foi alcançado em 72 horas (Figura 1H) e o valor máximo se mostrou semelhante ao valor obtido nos cultivos em que a leucina foi adicionada individualmente (Figura 1E, F, G). A produção máxima de surfactina em meio mineral contendo leucina e valina ou leucina e aspartato foi semelhante às alcançadas no tratamento controle e nos meios suplementados com leucina mais glutamato ou apenas com leucina, embora tenha sido alcançada no período de 96 horas (Figura 1I, J).

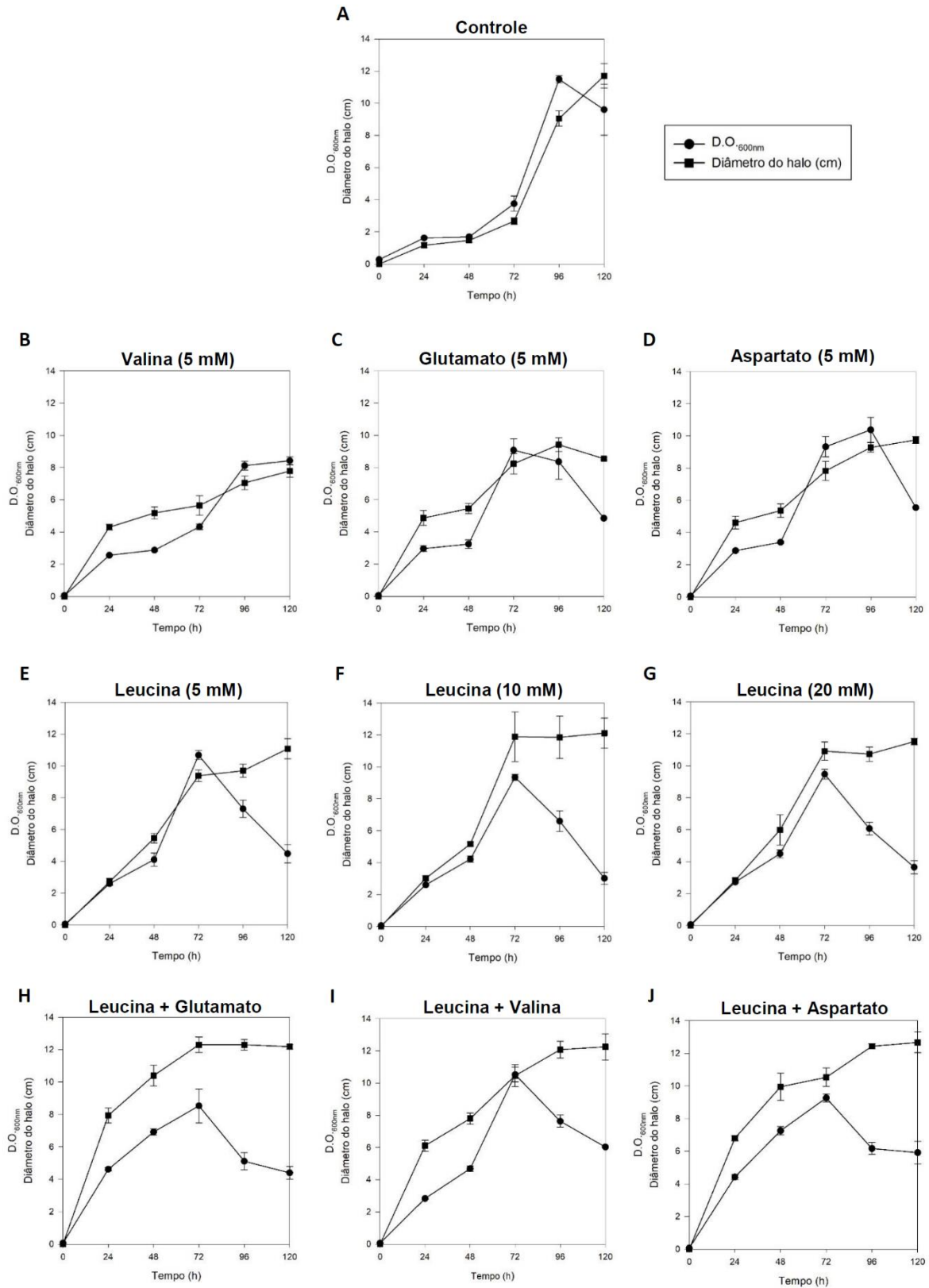


Figura 1. Cinética do crescimento celular e produção de surfactina durante o cultivo de *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA em meio mineral suplementado com aminoácidos individualmente e combinados. Os resultados representam a média \pm desvio padrão dos valores obtidos a partir de três repetições.

Conclui-se, a partir dos dados obtidos, que a adição dos aminoácidos valina, glutamato e aspartato simultaneamente com leucina não é vantajosa do ponto de vista industrial, por constituir um custo adicional ao processo sem elevar a produção máxima de surfactina obtida quando leucina é adicionada individualmente ao meio de cultivo. A adição de leucina, embora não tenha resultado em maior produção de surfactina do que a obtida no meio de cultivo sem suplementação (controle), reduziu o tempo necessário para obtenção do pico de produção de 120 (no controle) para 72 horas. Essa redução de 48 horas (ou 40% do tempo de cultivo) é muito significativa no que se refere à economia dos processos de fermentação. Assim, a adição de leucina, na concentração de 10 mM (preferencialmente), constitui uma estratégia promissora para se viabilizar a produção comercial de surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA em meio mineral contendo glicerol como fonte de carbono.

Zhou et al. (2018) reportaram que a produção máxima de surfactina por *Bacillus velezensis* BS-37, em meio mínimo contendo glicerol como fonte de carbono, foi alcançada quando o meio foi suplementado com L-leucina na concentração de 10 mM. Segundo os autores, o conteúdo de leucina nas células determina o rendimento de surfactina, uma vez que a porção peptídica da molécula contém maior quantidade de resíduos de leucina. Essa afirmação é corroborada pelos resultados da pesquisa realizada por Coutte et al. (2015), os quais demonstraram que a suplementação do meio com leucina ou a superprodução de leucina por linhagens geneticamente modificadas de *B. subtilis* aumentam significativamente a produção de surfactina.

O conteúdo dos demais aminoácidos constituintes da surfactina também é importante para a produção da molécula, conforme observado por Makkar & Cameotra (2002). No trabalho, os autores demonstraram que a adição de leucina ao meio de cultura não influenciou a produção de surfactina por *B. subtilis* MTCC 2423, enquanto a adição de aspartato, valina e glutamato, individualmente, aumentou a produção do biosurfactante em cerca de 60%. Esses diferentes resultados podem ser atribuídos às diferentes linhagens de *Bacillus* e a diferentes composições dos meios de cultura (Coutte et al., 2015; Wang et al., 2018). Desse modo, é importante se investigarem, para cada linhagem e condição de cultivo, os fatores limitantes do processo de produção de surfactina.

Após observar que a adição de leucina (10 mM) ao meio de cultura acelera a produção de surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA, decidiu-se avaliar se a adição desse aminoácido ao meio de cultivo tem influência sobre a produção de surfactina pela linhagem RI4914 WT. Nossos resultados demonstraram que a adição do aminoácido ao meio não

contribuiu para reduzir o tempo para obtenção do pico de produção da surfactina pela linhagem selvagem (Figura 2). Ao contrário, a produção de surfactina foi menor quando o aminoácido foi adicionado ao meio de cultivo (Figura 2). O resultado pode ser explicado pelo fato de a cultura, no meio suplementado com leucina, ter entrado em fase de declínio (redução da $D.O_{600nm}$) 24 horas antes da observada no meio sem suplementação, sugerindo que a esporulação pode ter sido induzida mais rapidamente naquela condição. Esse processo resultou em menor concentração de células metabolicamente ativas e consequentemente em menor produção de surfactina.

A indução da expressão do operon responsável por codificar as enzimas sintetases da surfactina, pelo IPTG presente no meio, na linhagem geneticamente modificada, direciona o metabolismo celular para a biossíntese da molécula. Nessa condição, a célula precisa dividir as moléculas precursoras e a carga energética entre a síntese de surfactina e a de outras macromoléculas essenciais para a sua sobrevivência e crescimento, situação em que o conteúdo de leucina intracelular pode comprometer a produtividade de surfactina pela linhagem geneticamente modificada. O mesmo não ocorre com a linhagem selvagem, conforme demonstram os nossos resultados.

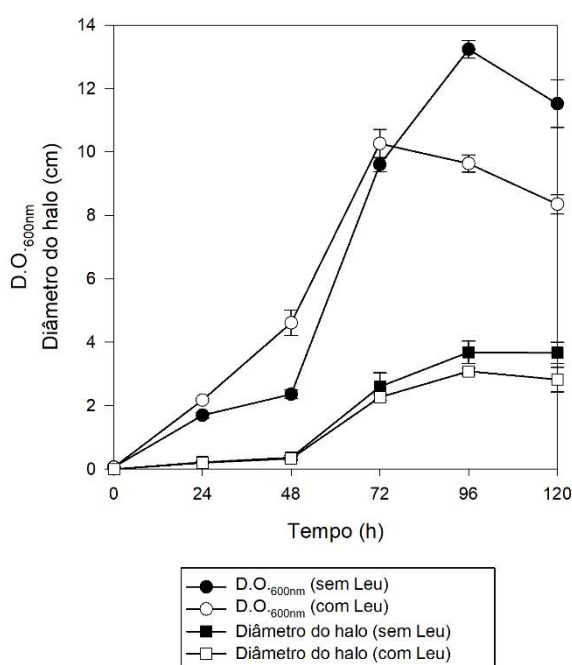


Figura 2. Cinética do crescimento celular e produção de surfactina durante o cultivo de *B. subtilis* LBBMA RI4914 WT em meio mineral contendo glicerol como fonte de carbono, com e sem a adição de Leucina (Leu). Os resultados representam a média \pm desvio padrão dos valores obtidos a partir de três repetições.

Tendo-se concluído que o aumento da disponibilidade de leucina para as células acelera a produção de surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA, duas estratégias podem ser propostas para se alcançar uma produção mais eficiente da molécula do ponto de vista industrial. A primeira e mais simples consiste em suplementar o meio de cultivo com leucina na concentração determinada, o que, no entanto, representa um custo adicional ao processo de produção industrial. A segunda estratégia consiste na aplicação de abordagens de engenharia metabólica na linhagem *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA, visando-se, por exemplo, à superexpressão de enzimas limitantes da via de biossíntese de leucina ou a deleção de genes que codificam para reguladores negativos da via, de modo a aumentar o *pool* de leucina intracelular (Coutte et al., 2015). Essa última abordagem se mostra mais trabalhosa e onerosa inicialmente, no entanto, uma vez tendo sido obtido o microrganismo melhorado para a síntese da leucina, o processo de produção não teria um custo adicional representado pela adição do aminoácido ao meio de cultivo.

4.3.2 Crescimento, viabilidade celular, produção de surfactina e esporulação

Os perfis cinéticos do crescimento, viabilidade celular e produção de surfactina das linhagens *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA, cultivada na presença e ausência de IPTG, e RI4914 WT estão apresentados na Figura 3. Para a linhagem RI4914 IsrfA, cultivada na presença de IPTG, o tempo zero corresponde ao momento de adição do indutor ($D.O_{600nm} \approx 0,29$). As curvas de crescimento da linhagem RI4914 IsrfA, cultivada na ausência de IPTG, e da linhagem WT foram semelhantes. O crescimento celular, medido pela densidade óptica, alcançou o valor máximo em 72 horas de cultivo e, posteriormente, as células entraram em fase de morte ou sofreram esporulação, o que também resulta em queda da densidade óptica. Em contrapartida, *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA, cultivada na presença de IPTG, apresenta uma fase de crescimento lento prolongada até 48 horas (Figura 3A), alcançando a densidade máxima de células em 96 horas.

Os perfis de luminescência, que indicam viabilidade celular e se relacionam com a concentração de ATP intracelular, acompanharam as curvas de crescimento (Figura 3). No entanto, até 48 horas, a emissão de luz foi baixa, indicando uma baixa reserva de ATP nas células. Não obstante, as células estavam se multiplicando nessa fase, o que sugere que todo ATP produzido estava sendo imediatamente consumido. A partir do momento em que a densidade de células começa a decrescer, os valores de luminescência decaem mais intensamente do que a densidade óptica. Os dados sugerem que, nesse ponto do crescimento,

houve um esgotamento acentuado de ATP nas células, o que é compatível com o fenômeno de morte celular ou, ainda, com a conversão das células metabolicamente ativas em endósporos.

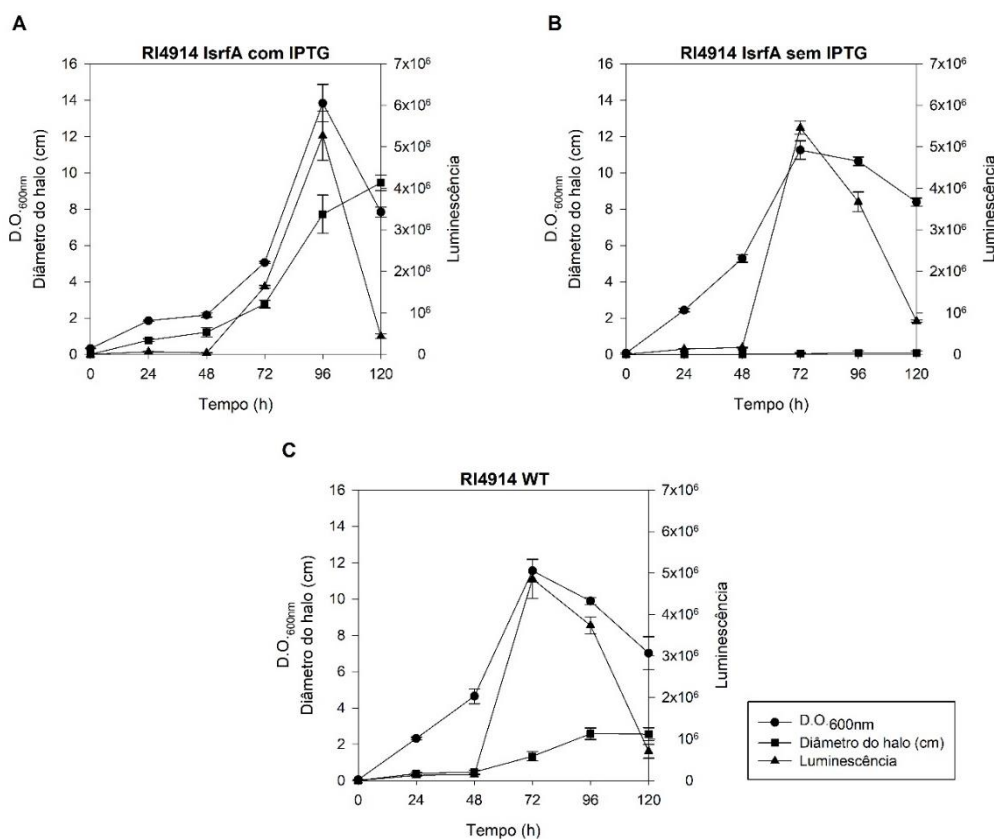


Figura 3. Cinética do crescimento, viabilidade celular e produção de surfactina durante o cultivo de *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrF A em meio mineral contendo glicerol como fonte de carbono na presença e ausência de IPTG e *B. subtilis* LBBMA RI4914 WT no mesmo meio de cultura, sem IPTG. Os resultados representam a média \pm desvio padrão dos valores obtidos a partir de três repetições.

O ATP é uma molécula crucial nas células, em decorrência de seu papel como reserva universal de energia prontamente disponível para o metabolismo celular (Braissant et al., 2020). De acordo com o boletim técnico da Promega, o reagente utilizado no ensaio, BacTiter-Glo™ Reagent, promove a lise das células bacterianas para liberação do ATP intracelular e gera um sinal luminescente. Esse sinal é proporcional à concentração de ATP no meio, a qual é diretamente proporcional ao número de células viáveis na cultura. No entanto, alguns fatores afetam o conteúdo de ATP intracelular e podem interferir nessa relação entre número de células viáveis e luminescência (Promega, 2019). Desse modo, o fato de o valor de luminescência não ter acompanhado o aumento do crescimento celular, medido pela densidade óptica, até o tempo

de 48 horas, pode ser interpretado pelo fato de o conteúdo de ATP nas células, no momento avaliado, estar baixo em decorrência do consumo da molécula nas reações metabólicas. Possivelmente, nessa fase, as células estavam produzindo intensamente os precursores para síntese de novas células e de surfactina, o que é compatível com a aceleração do crescimento (Figura 3A-C) e da produção de surfactina (Figura 3A, C) observada após 48 horas.

Com relação à produção de surfactina, observou-se que a produção máxima obtida na cultura de *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA, na presença de IPTG, foi alcançada em 120 horas de cultivo, conforme já demonstrado em outros experimentos; enquanto que na ausência do indutor, a produção de surfactina não foi observada, indicando que não houve produção ou, mais provavelmente, que a quantidade de surfactina produzida foi tão pequena que não foi capaz de ser detectada pelo teste de espalhamento de óleo em placa. A produção de surfactina pela linhagem WT é associada ao crescimento celular e alcança seu máximo em 96 horas de cultivo, mantendo-se constante após esse período.

A queda acentuada na densidade óptica, após 96 horas, da cultura de *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA na condição de alta produção de surfactina (Figura 3A), pode ter ocorrido por diferentes fatores. O primeiro envolveria o acúmulo de surfactina no meio, o que eventualmente poderia ter provocado a morte celular pela ação antimicrobiana da molécula. No entanto, conforme será apresentado adiante neste trabalho, essa hipótese pode ser descartada, uma vez que a surfactina não inibe o crescimento celular dessa linhagem. Além disso, a queda no crescimento celular também foi observada para a linhagem quando cultivada na ausência do IPTG (Figura 3B), o que indica que esse comportamento não está relacionado ao acúmulo de surfactina no meio de cultivo.

Uma segunda possibilidade para a observada queda da densidade óptica da cultura envolveria a diferenciação das células vegetativas em endósporos. A esporulação é um fenômeno natural em *B. subtilis*, que ocorre como resposta à carência nutricional e estímulos ambientais físicos e químicos (Wang et al., 2020). Para se investigar essa hipótese e avaliar como as culturas de *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA e WT se comportam quanto ao processo de esporulação, a presença de endósporos durante o crescimento foi avaliada a cada 24 horas. A presença de células se diferenciando em endósporos foi observada já no tempo de 24 horas, e a presença de endósporos foi detectada ao longo de todas as fases do crescimento para as três culturas (Figura 4). Desse modo, a acentuada queda da densidade óptica observada após a linhagem RI4914 IsrfA (Figura 3A) atingir o crescimento máximo não é, provavelmente, decorrente da esporulação. Esse comportamento de diferenciação celular em endósporos ao

longo de todo o tempo de cultivo não pode ser associado à presença de surfactina no meio desde o início do crescimento, uma vez que também foi observado para a linhagem RI4914 IsrfA cultivada na ausência de IPTG, onde praticamente não há produção desse lipopeptídeo (Figura 3B). A presença de endósporos nas culturas de duas linhagens de *B. subtilis*, produtora e não produtora de surfactina, nas horas iniciais de cultivo (20 horas), também foi observada por Seydlová et al. (2013).

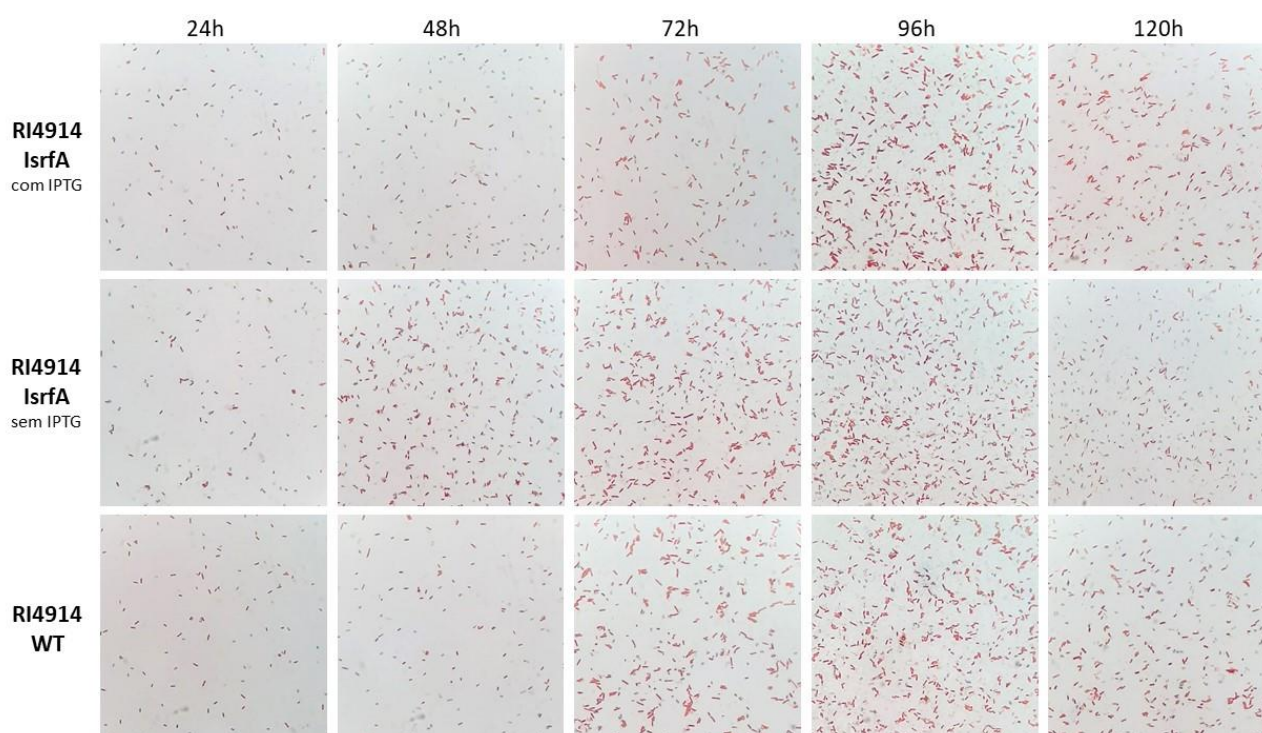


Figura 4. Células vegetativas (vermelho) e endósporos (verde) de *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA e *B. subtilis* LBBMA RI4914 WT, observados após coloração diferencial de endósporos com verde malaquita e safranina em microscópio óptico (1.000x), durante o cultivo em meio mineral contendo glicerol como fonte de carbono.

A terceira e a mais provável justificativa para a queda da densidade óptica das culturas após as mesmas atingirem o valor máximo consiste na morte e lise celular, resultantes da depleção da fonte de carbono e energia, processo que ocorre naturalmente em cultivos em batelada. A queda da luminescência, observada também para as três culturas nos momentos finais do período de incubação, indica que o declínio da $D.O_{600nm}$ está associado ao esgotamento energético e, conseqüentemente, à diminuição na viabilidade celular. De fato, células em processo de perda de viabilidade tornam-se incapazes de sintetizar ATP, e muitas reações bioquímicas, incluindo a ação de ATPases, esgotam rapidamente qualquer ATP remanescente do citoplasma (Braissant et al., 2020).

Analisando-se os resultados obtidos neste tópico, é possível inferir que a diferenciação de células vegetativas em endósporos desde o início do cultivo pode ser um fator limitante para a produção de surfactina, uma vez que uma menor densidade de células metabolicamente ativas é alcançada à medida que parte da população de células do meio vão se diferenciando em endósporos (Klausmann et al., 2021). Esse fenômeno configura-se como um grande obstáculo para a produção de surfactina em escala industrial, pois pode limitar o rendimento da produção (Wang et al., 2020).

Em seu trabalho, Klausmann et al. (2021) utilizaram uma linhagem de *B. subtilis* não formadora de endósporos para a produção de surfactina em batelada alimentada em biorreator de 30 L, e alcançaram o dobro da densidade de células bem como uma concentração final de surfactina 4,2 vezes maior comparada a uma linhagem produtora de endósporos. Além disso, Wang et al. (2020) relataram que quando o gene *spoIVB*, envolvido nos estágios finais de maturação dos endósporos, foi deletado, houve um aumento na expressão de genes relacionados com as vias biossintéticas envolvidas com a síntese da surfactina, levando a um aumento da produção de 8,3 g L⁻¹ (linhagem parental) para 9,6 g L⁻¹ de surfactina. Adicionalmente, além da deleção de *spoIVB*, foi realizada a superexpressão da via biossintética de leucina bem como a suplementação do meio com esse aminoácido e, a combinação dessas estratégias levou à produção de 16,7 g L⁻¹ de surfactina. Assim, a inibição da esporulação e sua associação ao aumento do *pool* intracelular de leucina, pode ser uma estratégia para viabilizar a produção industrial de surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA.

4.3.3 Resistência de *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA à atividade antimicrobiana da surfactina

Para avaliar se a linhagem *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA é sensível à surfactina, foi realizado um ensaio antimicrobiano pelo método de microdiluição, em que o microrganismo foi exposto a diferentes concentrações de surfactina. A concentração máxima avaliada (aproximadamente 14 g L⁻¹ de surfactina) corresponde a 4 vezes a concentração de surfactina que a linhagem é capaz de produzir quando cultivada em meio mineral contendo glicerol como fonte de carbono, nas condições definidas como ótimas no Capítulo 2. Os resultados demonstraram que a surfactina não inibe o crescimento de *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA, em nenhuma das concentrações avaliadas. Pelo contrário, comparando-se com o tratamento controle (meio mineral sem surfactina), as densidades de células obtidas na presença de diferentes concentrações de surfactina foram até superiores (Tabela 2). A surfactina pode ter sido utilizada como fonte de carbono e nitrogênio pela linhagem, o que levou ao maior

crescimento na presença da mesma. A utilização da surfactina como fonte de carbono e nitrogênio por *B. subtilis* foi previamente reportada por Klausmann et al. (2021).

Os resultados obtidos em nosso estudo demonstram que *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA resiste a altas concentrações de surfactina no meio de cultura, o que nos permite concluir que a sensibilidade da linhagem à ação antimicrobiana da surfactina não é um fator limitante para a produção da molécula por essa linhagem.

Tabela 2. Densidade celular de *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA em resposta à adição de surfactina ao meio de cultivo

Concentração de surfactina (g L ⁻¹)	D.O. _{600nm}
14	0,595 ± 0,08
7	0,438 ± 0,09
3,5	0,463 ± 0,06
1,75	0,423 ± 0,09
0,875	0,366 ± 0,07
0,4374	0,411 ± 0,06
0	0,318 ± 0,01

Os resultados representam a média ± desvio padrão dos valores obtidos a partir de nove repetições. O cultivo das células foi realizado em meio mineral contendo glicerol (20 g L⁻¹) como fonte de carbono em microplaca de 96 poços, sem adição de IPTG, na presença de diferentes concentrações de surfactina. A placa foi mantida sem agitação, a 30 °C, por 24 horas e, após esse período, o crescimento microbiano foi determinado pela leitura da densidade óptica a 600 nm.

A análise da morfologia celular de *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA, cultivada na presença e ausência do indutor IPTG, e de *B. subtilis* LBBMA RI4914 WT por Microscopia de Força Atômica (AFM), demonstrou que, nas três condições avaliadas (produção elevada ou praticamente inexistente de surfactina pela linhagem geneticamente modificada, na presença e ausência do indutor, e mediana de surfactina (linhagem selvagem)), não ocorreram alterações na morfologia das células e a parede celular permaneceu íntegra (Figura 5). Os resultados demonstram que a superfície celular das linhagens produtoras não é afetada pela presença da surfactina, e corroboram os dados obtidos no ensaio de microdiluição.

Pode-se concluir, a partir dos dados obtidos, que a linhagem *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA possui um mecanismo de autoproteção eficiente contra a ação antibacteriana da surfactina, mesmo em concentrações elevadas (14 g L⁻¹). Algumas proteínas envolvidas com o efluxo da surfactina e com a tolerância a altas concentrações de surfactina têm sido caracterizadas, tais como as proteínas exportadoras de surfactina YerP (Tsuge et al., 2001), SwrC (Li et al., 2015) e o operon *liaRSFGHI* (Zhi et al., 2017). No entanto, o mecanismo de

resistência das linhagens produtoras de surfactina à ação antimicrobiana do lipopeptídeo ainda não é muito bem conhecido. Sabe-se que a surfactina é capaz de interagir com os fosfolípidos de membrana, em decorrência de sua natureza anfifílica (Théâtre et al., 2021), provocando danos à membrana celular e causando até mesmo a sua solubilização (Deleu et al., 2013).

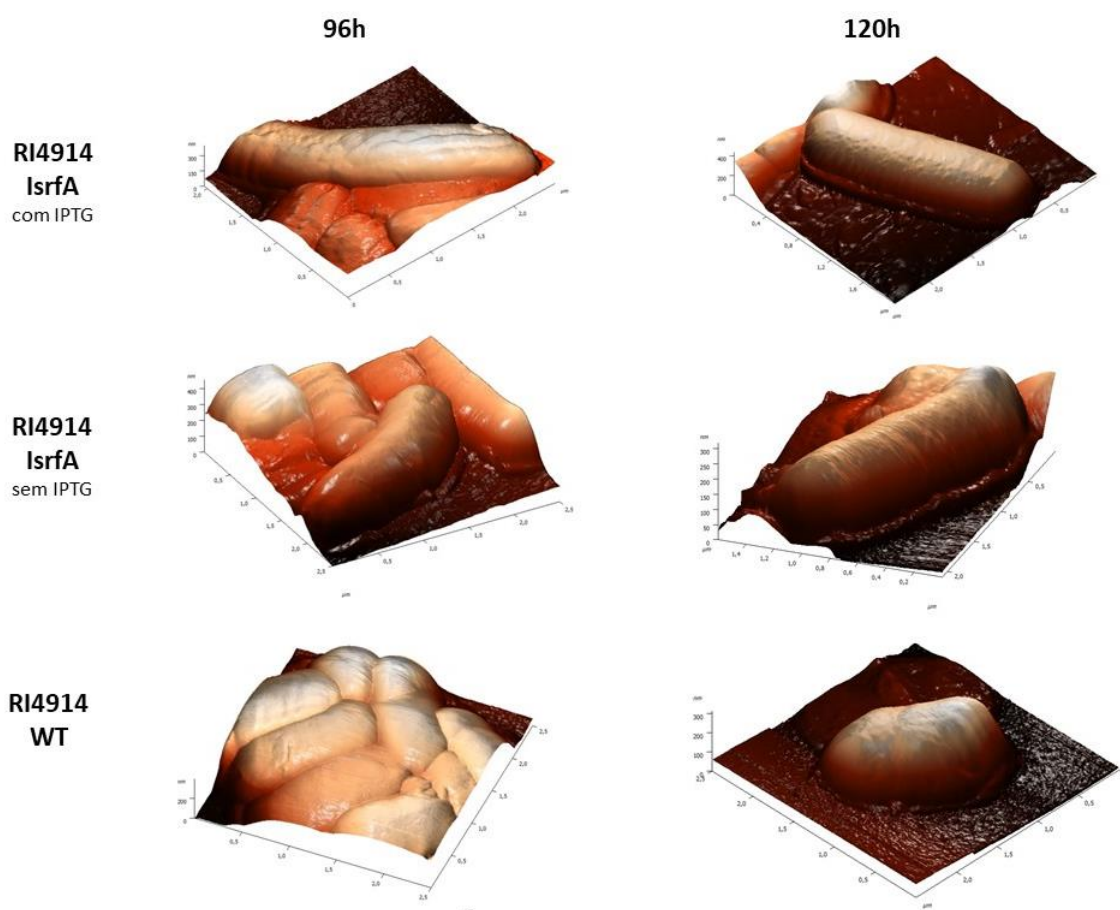


Figura 5. Imagens 3D, obtidas por meio da técnica de Microscopia de Força Atômica, das células de *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA e *B. subtilis* LBBMA RI4914 WT durante o cultivo em meio mineral contendo glicerol como fonte de carbono.

As bactérias produtoras de antibióticos garantem sua resistência por meio de diversos mecanismos de autodefesa (Seydlová et al., 2013), os quais, geralmente, consistem na modificação do sítio alvo (Uttlová et al., 2016). Esses mecanismos são ativados simultaneamente com a biossíntese dos antibióticos, e a expressão dos sistemas de defesa aumenta à medida que a síntese da molécula progride (Seydlová et al., 2013). É provável que a membrana citoplasmática, alvo da surfactina, esteja envolvida no mecanismo de resistência ao lipopeptídeo (Seydlová et al., 2013).

Em busca de se tentar caracterizar o mecanismo de adaptação das linhagens produtoras à presença de surfactina no meio de crescimento e investigar se há diferenças entre o mecanismo de tolerância para a linhagem com alta produção (RI4914 *IsrfA* cultivada na presença de IPTG) e produção mediana (RI4914 WT), os perfis de ácidos graxos das linhagens selvagem e geneticamente modificada, na presença e ausência do indutor IPTG, foram avaliados a cada 24 horas ao longo do cultivo em meio mineral contendo glicerol como fonte de carbono.

As membranas de *B. subtilis* LBBMA RI4914 *IsrfA*, nas duas condições de cultivo, e da linhagem WT, apresentam maior proporção de ácidos graxos de cadeia ramificada (*iso* e *anteiso*) (Figura 6). Poucas alterações foram observadas no perfil de ácidos graxos da linhagem RI4914 *IsrfA* quando cultivada na presença de IPTG em comparação com a condição de cultivo sem IPTG e com a linhagem WT (Figura 6). Essas alterações se referem à diminuição dos ácidos graxos 15:0 *anteiso* e 17:0 *anteiso* e aumento da abundância dos ácidos graxos 14:0 *iso* e 16:0 *iso* no tempo de 72 horas, tempo que coincide com o início de um aumento significativo da produção de surfactina (Figura 3A). Embora *Bacillus* sp. sejam capazes de modificar o perfil de ácidos graxos da membrana citoplasmática para se adaptarem a mudanças nas condições ambientais (Diomandé et al., 2015), as alterações observadas neste estudo possivelmente não estão relacionadas a um mecanismo de resistência da linhagem à surfactina, mas sim ao metabolismo biossintético e energético da célula, a qual se encontra numa situação de superexpressão do operon *srfA*.

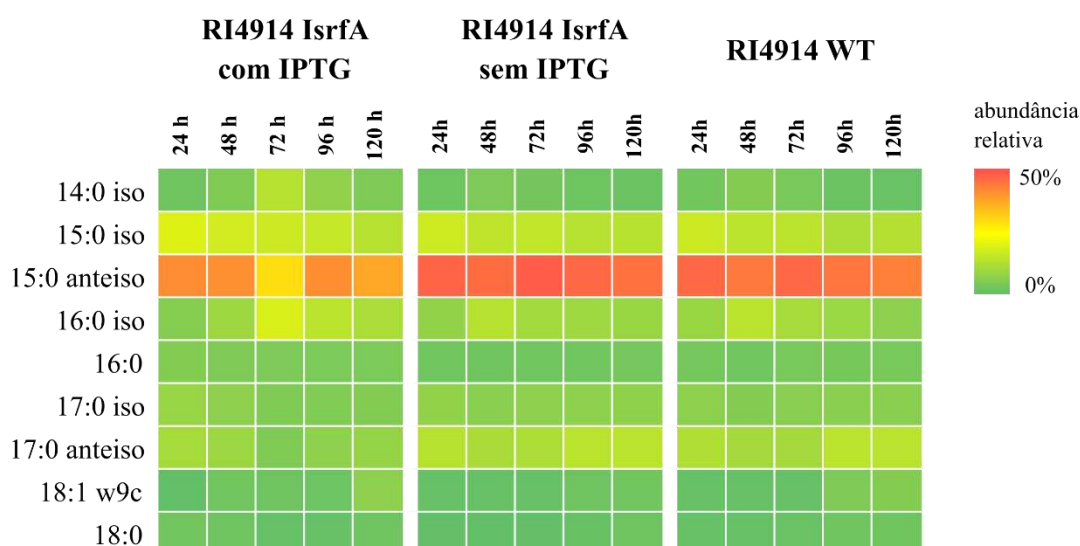


Figura 6. Perfil de ácidos graxos de *B. subtilis* LBBMA RI4914 *IsrfA* cultivada em meio mineral contendo glicerol como fonte de carbono na presença e ausência de IPTG, e de *B. subtilis* LBBMA RI4914 WT cultivada no mesmo meio de cultura. Os valores de abundância relativa representam a média dos valores obtidos a partir de três repetições.

O catabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada, leucina, valina e isoleucina, fornece precursores para a biossíntese dos ácidos graxos de cadeia ramificada (Kaneda, 1977; Hu et al., 2019). A biossíntese desses aminoácidos deve ser controlada para garantir que quantidades apropriadas de precursores estejam disponíveis para a síntese de ácidos graxos, de proteínas e também da surfactina (Diomandé et al., 2015). Isoleucina fornece precursor para os ácidos graxos de cadeia ramificada do tipo *anteiso*, enquanto leucina e valina fornecem as moléculas iniciadoras para a biossíntese de ácidos graxos de cadeia ramificada *iso* (Kaneda, 1977). Além disso, os precursores provenientes de isoleucina e leucina levam à síntese de cadeias de ácidos graxos com número ímpar de carbono enquanto o precursor proveniente da valina é incorporado a ácidos graxos com número par de carbono (Kaneda, 1977; Hu et al., 2019).

As vias de biossíntese dos aminoácidos de cadeia ramificada, L-leucina, L-isoleucina e L-valina, compartilham as mesmas enzimas (Hu et al., 2019). A alta demanda da célula por leucina e valina, aminoácidos que ocorrem mais comumente nas variantes de surfactina, na condição de superexpressão do operon *srfA*, para a biossíntese de surfactina e dos ácidos graxos de membrana, pode ter contribuído para o redirecionamento das enzimas para a biossíntese desses dois aminoácidos. Isso pode explicar a queda na abundância dos ácidos graxos 15:0 *anteiso* e 17:0 *anteiso*, os quais são sintetizados a partir de L-isoleucina, no tempo de 72 horas, momento em que as células se encontram em alta atividade metabólica, na fase exponencial do crescimento, e a partir do qual inicia um aumento significativo da produção de surfactina (Figura 3A). Adicionalmente, a maior produção do aminoácido valina, nessa fase do cultivo, o qual é menos abundante na molécula de surfactina, pode ter contribuído para o aumento na síntese dos ácidos graxos 14:0 *iso* e 16:0 *iso* (Figura 6).

Com relação aos ácidos graxos produzidos a partir do precursor fornecido pela leucina, observou-se uma leve queda na abundância do ácido graxo 15:0 *iso* ao longo do tempo em ambas as linhagens e na presença ou ausência de IPTG (Figura 6). Esse resultado indica que tal alteração não está relacionada à produção de surfactina pela célula, sendo um processo natural da célula nas condições de cultivo adotadas. A análise da composição de ácidos graxos da linhagem RI4914 *IsrfA*, cultivada na ausência de IPTG, fornece um panorama das modificações dos ácidos graxos de membrana que ocorrem naturalmente na célula ao longo das fases de crescimento, sem o efeito da surfactina, em decorrência, por exemplo, da depleção de energia e nutrientes (Diomandé et al., 2015).

Em contrapartida, para o ácido graxo 17:0 *iso*, uma diminuição na abundância a partir de 72 horas foi observada somente para *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA com alta produção de surfactina (presença de IPTG) (Figura 6). Essa redução pode ter ocorrido em resposta ao baixo *pool* de leucina nas células. Conforme previamente demonstrado, a leucina é um aminoácido cuja demanda parece ser elevada durante a síntese da surfactina, o que indica uma possível carência intracelular de leucina na fase de aceleração da produção do lipopeptídeo (Figura 3A).

Em *Bacillus*, os fosfolipídeos contendo ácidos graxos de cadeia ramificada são os principais encontrados na membrana celular, e estes ácidos graxos podem representar até 98% do total de ácidos graxos encontrado nas células (Kaneda, 1969; Nickels et al., 2017). Os glicerolfosfolipídeos representam 90% das macromoléculas das bactérias. Eles estão principalmente localizados nas membranas celulares e representam o principal conteúdo de ácidos graxos nos microrganismos (Diomandé et al., 2015). Desse modo, mesmo que a metodologia utilizada neste trabalho inclua todos os ácidos graxos presentes na célula, a maior parte deles é correspondente aos ácidos graxos que compõem a membrana celular.

Nossos resultados corroboram os dados obtidos por Seydlová et al. (2013), os quais demonstraram não haver alteração significativa no perfil de ácidos graxos da linhagem produtora *B. subtilis* ATCC 21332 em resposta à presença da surfactina. Em contrapartida, os autores observaram um aumento da concentração do fosfolipídeo cardiolipina simultaneamente com o aumento da produção de surfactina, alterando, principalmente, a composição da porção polar da membrana plasmática. Foi sugerido que essa alteração seja uma resposta adaptativa da célula relacionada ao mecanismo de tolerância à surfactina, uma vez que um aumento no nível de cardiolipina tende a aumentar a rigidez da membrana, dificultando a ação solubilizadora da surfactina. Ao mesmo tempo, em decorrência de suas cargas negativas, a cardiolipina pode prevenir a interação da surfactina com a membrana (Seydlová et al., 2013).

Uttlová et al. (2016) investigaram se *B. subtilis* 168 (linhagem não produtora de surfactina) altera a composição de lipídeos da membrana em resposta à exposição a concentrações subletais de surfactina. Análises da composição dos lipídeos de membrana revelaram modificações principalmente na cabeça polar das moléculas, embora algumas modificações no perfil de ácidos graxos tenham sido também associadas à presença da surfactina. Uma fraca resposta adaptativa com relação à alteração do perfil de ácidos graxos também foi observada em um estudo a respeito da resistência de *B. subtilis* ao lipopeptídeo

daptomicina, sendo a composição da porção polar dos fosfolípidos o principal determinante da tolerância a esse lipopeptídeo (Hachmann et al., 2011).

Diante dos resultados obtidos neste trabalho e dos encontrados na literatura, é possível concluir que, dentre os mecanismos de resistência das linhagens produtoras de surfactina à ação da molécula que envolvam alterações da membrana citoplasmática, alterações na porção polar dos fosfolípidos de membrana são o fator mais importante. Modificações na composição dos ácidos graxos parecem não exercer um papel relevante na adaptação da membrana para aumento de tolerância à surfactina.

4.4 CONCLUSÕES

Durante o cultivo em meio mineral contendo glicerol como fonte de carbono, *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA não sofre alterações em sua morfologia pela ação da surfactina, nem tem o crescimento influenciado por ela. A linhagem é capaz de tolerar altas concentrações de surfactina, não sendo este, portanto, um gargalo para a produção da molécula em escala comercial. O mecanismo de resistência da linhagem ao efeito antibacteriano da surfactina não envolve a alteração do perfil de ácidos graxos da célula. A adição de leucina ao meio de cultivo acelera a produção de surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA comparativamente à mesma cultura em meio sem suplementação com o aminoácido. Um fator que pode estar limitando a produção de surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA é a diferenciação celular em endósporos ao longo de toda a fase de crescimento. Desse modo, abordagens para se obter maior produtividade de surfactina por essa linhagem e viabilizar sua produção em escala industrial, utilizando-se glicerol como fonte de carbono, envolvem a suplementação do meio de cultura com leucina ou a utilização de estratégias de engenharia genética para se aumentar o conteúdo intracelular de leucina e inibir a esporulação.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, M. F. *Bacillus subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA: uma nova linhagem geneticamente melhorada para produção de surfactina. 77f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2018.
- Braissant, O.; Astasov-Frauenhoffer, M.; Waltimo, T.; Bonkat, G. A review of methods to determine viability, vitality, and metabolic rates in microbiology. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, 2020. doi: 10.3389/fmicb.2020.547458
- Camesano, T. A.; Natan, M. J.; Logan, B. E. Observation of changes in bacterial cell morphology using tapping mode atomic force microscopy. *Langmuir*, v. 16, p. 4563-4572, 2000.
- Cosmina, P.; Rodriguez, F.; Ferra, F.; Grandi, G.; Perego, M.; Venema, G.; Sinderen, D. Sequence and analysis of the genetic locus responsible for surfactin synthesis in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, v. 8(5), p. 821-831, 1993.
- Coutte, F.; Niehren, J.; Dhali, D.; John, M.; Versari, C.; Jacques, P. Modeling leucine's metabolic pathway and knockout prediction improving the production of surfactin, a biosurfactant from *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. J.*, v. 10, p. 1216–1234, 2015.
- Diomandé, S. E.; Nguyen-The, C.; Guinebretière, M.; Broussolle, V.; Brillard, J. Role of fatty acids in *Bacillus* environmental adaptation. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, 2015. doi: 10.3389/fmicb.2015.00813
- Deleu, M.; Lorent, J.; Lins, L.; Brasseur, R.; Braun, N.; El Kirat, K.; *et al.* Effects of surfactin on membrane models displaying lipid phase separation. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, v. 1828, p. 801–815, 2013.
- Dufrêne, Y. F. Atomic force microscopy in microbiology: new structural and functional insights into the microbial cell surface. *mBio*, v. 5 (4), e01363-14, 2014. doi: 10.1128/mBio.01363-14
- Hachmann, A. B.; Sevim, E.; Gaballa, A.; Popham, D.L.; Antelmann, H.; Helmann, J.D. Reduction in membrane phosphatidylglycerol content leads to daptomycin resistance in *Bacillus subtilis*. *Antimicrob. Agents Chemother*, v. 55, p. 4326–4337, 2011.
- Hu, F.; Liu, Y.; Li, S. Rational strain improvement for surfactin production: enhancing the yield and generating novel structures. *Microb Cell Fact*, v. 18(42), p. 1-13, 2019.
- Jacques, P. Surfactin and other lipopeptides from *Bacillus* spp. In: Soberón-Chávez, G. (Editor) *Biosurfactants*, v. 20, p. 57-91. Springer-Verlag: Berlin, 2011.
- Juma, A.; Lemoine, P.; Simpson, A. B. J.; Murray, J.; O'Hagan, B. M. G.; Naughton, P. J.; Dooley, J. G.; Banat, I. M. Microscopic investigation of the combined use of antibiotics and biosurfactants on methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, 2020. doi: 10.3389/fmicb.2020.01477
- Li, X.; Yang, H.; Zhang, D.; Li, X.; Yu, H.; Shen, Z. Overexpression of specific proton motive force-dependent transporters facilitate the export of surfactin in *Bacillus subtilis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 42, p. 93–103, 2015.

Kaneda, T. Fatty acids in *Bacillus larvae*, *Bacillus lentimorbus*, and *Bacillus popilliae*. *J. Bacteriol.*, v. 98, p. 143–146, 1969.

Kaneda, T. Fatty acids of the genus *Bacillus*: an example of branched-chain preference. *Bacteriol.Rev.*, v. 41, p. 391–418, 1977.

Klausmann, P.; Hennemann, K.; Hoffmann, M.; Treinen, C.; Aschern, M.; Lilge, L.; Heravi, K. M.; Henkel, M.; Hausmann, R. *Bacillus subtilis* high cell density fermentation using a sporulation-deficient strain for the production of surfactin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 105, p. 4141–4151, 2021.

Makkar, R. S. & Cameotra, S. S. Effects of various nutritional supplements on biosurfactant production by a strain of *Bacillus subtilis* at 45 °C. *Journal of Surfactants and Detergents*, v. 5 (1), p. 11-17, 2002.

Morikawa, M.; Hirata, Y.; Imanaka, T. A study on the structurefunction relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1488, p. 211-218, 2000.

Nakano, M. M.; Magnuson, R.; Myers, A.; Curry, J.; Grossman, A. D.; Zuber, P. *srfA* is an operon required for surfactin production, competence development, and efficient sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, v. 173(5), p. 1770-1778, 1991.

Nickels, J. D.; Chatterjee, S.; Mostofian B.; Stanley, C. B.; Ohl, M.; Zolnierczuk, P.; Schulz R.; Myles D. A. A.; Standaert, R. F.; Elkins, J. G.; *et al.* The *Bacillus subtilis* lipid extract, a branched-chain fatty acid membrane model. *J Phys Chem Lett.*, v. 8, p. 4214–4217, 2017.

Promega, 2019. BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay. Technical Bulletin TB337. Disponível em: https://www.promega.com.br/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/bactiter-glo-microbial-cell-viability-assay-protocol.pdf?rev=0ce55f402f4f418eb2862911968f6022&sc_lang=en

Santos, V. S. V.; Silveira, E.; Pereira, B. B. Toxicity and applications of surfactin for health and environmental biotechnology. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, v. 21, p. 382-399, 2018.

Santos, V. S. V.; Silveira, E.; Pereira, B. B. Toxicity and applications of surfactin for health and environmental biotechnology. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, v. 21, p. 382-399, 2019.

Seydlová, G. & Svobodová, J. Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications. *Cent. Eur. J. Med.*, v. 3(2), p. 123- 133, 2008.

Sasser, M. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. MIDI technical note 101. MIDI, Inc, Newark, DE, USA, 1990.

Schaeffer, A.B. & Fulton, M.D. A simplified method of staining endospores. *Science*, v. 77, p. 194, 1933.

Seydlová, G.; Fišer, R.; Čabala, R.; Kozlík, P.; Svobodová, J.; Pátek, M. Surfactin production enhances the level of cardiolipin in the cytoplasmic membrane of *Bacillus subtilis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1828, p. 2370–2378, 2013.

Théâtre, A.; Cano-Prieto, C.; Bartolini, M.; Laurin, Y.; Deleu, M.; Niehren, J.; *et al.* The surfactin-like lipopeptides from *Bacillus* spp.: natural biodiversity and synthetic biology for a

broader application range. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 9:623701, 2021. doi: 10.3389/fbioe.2021.623701

Tsuge, K.; Ohata, Y.; Shoda, M. Gene *yerP*, involved in surfactin self resistance in *Bacillus subtilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 45, p. 3566–3573, 2001.

Uttlová, P.; Pinkas, D.; Bechyňková, O.; Fišer, R.; Svobodová, J.; Seydlová, G. *Bacillus subtilis* alters the proportion of major membrane phospholipids in response to surfactin exposure. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1858, p. 2965–2971, 2016.

Wang, J.; Guo, R.; Wang, W.; Ma, G.; Li, S. Insight into the surfactin production of *Bacillus velezensis* B006 through metabolomics analysis. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 45 (12), p. 1033–1044, 2018.

Wang, C.; Cao, Y.; Wang, Y.; Sun, L.; Song, H. Enhancing surfactin production by using systematic CRISPRi repression to screen amino acid biosynthesis genes in *Bacillus subtilis*. *Microb Cell Fact.*, v. 18 (90), p. 1-13, 2019.

Wang, M.; Yu, H.; Li, X.; Shen, Z. Single-gene regulated non-spore-forming *Bacillus subtilis*: construction, transcriptome responses, and applications for producing enzymes and surfactin. *Metabolic Engineering*, v. 62 p. 235–248, 2020.

Wu, Q.; Zhia, Y.; Xua, Y. Systematically engineering the biosynthesis of a green biosurfactant surfactin by *Bacillus subtilis* 168. *Metabolic Engineering*, v. 52, p. 87–97, 2019.

Zhi, Y.; Wu, Q.; Xu, Y. Genome and transcriptome analysis of surfactin biosynthesis in *Bacillus amyloliquefaciens* MT45. *Scientific Reports*, v. 7, p. 1-13, 2017.

Zhou, D.; Hu, F.; Lin, J.; Wang, W.; Li, S. Genome and transcriptome analysis of *Bacillus velezensis* BS-37, an efficient surfactin producer from glycerol, in response to d-/l-leucine. *MicrobiologyOpen.*, v. 794, p. 1-14, 2018.

CONCLUSÕES GERAIS

Neste estudo, foi realizada a otimização de parâmetros de controle da produção de surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA, linhagem que possui o operon *srfA* regulado por um promotor forte e induzido por IPTG. O cultivo foi realizado em meio mineral acrescido de glicose, glicerol ou glicose + glicerol. As condições ótimas dos fatores que possibilitam a maior produção de surfactina - concentração do indutor IPTG, momento de indução, concentração da fonte de carbono e período de incubação - foram definidas pela metodologia de superfície de resposta e validadas experimentalmente, para cada uma das fontes de carbono.

Embora a concentração de surfactina obtida a partir do cultivo em glicose, glicerol e glicose + glicerol tenha sido a mesma (em torno de 3 g L^{-1}) quando *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA foi cultivada nas condições definidas como ótimas neste trabalho, o uso das duas fontes concomitantemente não se mostrou adequado, em decorrência da repressão catabólica exercida pela glicose sobre a via de utilização do glicerol. O rendimento de produção foi maior quando glicerol foi utilizado como fonte de carbono.

B. subtilis LBBMA RI4914 IsrfA é capaz de crescer e produzir surfactina utilizando glicerina bruta como substrato, alcançando uma produção semelhante à obtida quando o glicerol puro é utilizado. A linhagem parece ser pouco eficiente em metabolizar a lactose, e esse composto não foi capaz de induzir a síntese de surfactina.

Os extratos brutos obtidos a partir do cultivo de *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA em meio mineral contendo glicose ou glicerol como fonte de carbono apresentaram a mesma proporção das moléculas de surfactina analisadas por UPLC/MS-MS. Como resultado, características físico-químicas e espectro de atividade antimicrobiana das moléculas de surfactina produzidas a partir de glicose ou glicerol não diferiram. Soluções contendo as moléculas de surfactina produzidas a partir de ambas as fontes apresentaram valor de tensão superficial e índice de emulsificação (água-querosene) em torno de 27 mN m^{-1} e 56%, respectivamente, e são capazes de manter essas características estáveis entre 4 e $121 \text{ }^\circ\text{C}$ e valores de pH de 7 a 12. Ademais, as moléculas foram capazes de inibir 50% do crescimento micelial do fungo fitopatogênico *Rhizoctonia* sp. e 100% do crescimento das espécies de bactérias patogênicas *S. aureus*, *B. cereus* e *C. freundii*.

Nossos resultados demonstram que a fonte de carbono utilizada para a produção de surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA (glicose ou glicerol) não interfere nas propriedades das moléculas produzidas. Confirmam ainda que o uso do glicerol oriundo da glicerina bruta como fonte de carbono para a produção de surfactina por *B. subtilis* LBBMA

RI4914 IsrfA é uma abordagem promissora para redução potencial dos custos e aumento da viabilidade da produção industrial desse lipopeptídeo.

O estudo dos possíveis fatores limitantes da produção de surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA demonstrou que a adição de L-leucina (10 mM) ao meio mineral reduz em 48 horas o tempo de cultivo para obtenção do pico de produção de surfactina, aspecto relevante do ponto de vista industrial. A adição dos demais aminoácidos que compõem a molécula (L-valina, L-glutamato e L-aspartato), individualmente ou combinados com a leucina, não altera a produção.

Durante o cultivo em meio mineral contendo glicerol como fonte de carbono, *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA não sofre alterações em sua morfologia pela ação da surfactina, nem tem o crescimento influenciado por ela. Além disso, a linhagem é capaz de tolerar altas concentrações da molécula. Esses dados nos permitem concluir que a sensibilidade da linhagem à ação antimicrobiana da surfactina não constitui um gargalo para a produção da molécula em escala comercial. O mecanismo de auto resistência da linhagem *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA à surfactina não envolve a alteração do perfil de ácidos graxos de membrana.

A esporulação é um processo natural em *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA e independe da presença da surfactina no meio, sendo observada durante todas as fases de crescimento. O fenômeno pode representar um gargalo para a produção de surfactina, limitando a concentração final de molécula produzida. A partir dos resultados obtidos neste estudo, sugere-se que a produtividade volumétrica e a concentração de surfactina produzida por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA, quando cultivada em meio mineral com glicerol, podem ser aumentadas por estratégias que resultem no aumento do conteúdo intracelular de leucina e na inibição da esporulação.

Definiu-se, a partir deste trabalho, que uma produção mais eficiente de surfactina por *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA, utilizando glicerina bruta como substrato, em escala laboratorial, pode ser alcançada cultivando-se as células sob agitação de 200 rpm a 30 °C por 72 h, em meio mineral contendo solução de glicerina bruta equivalente a 20 g L⁻¹ de glicerol e leucina (10 mM), adicionando-se IPTG (0,78 mM) no momento em que a densidade óptica a 600 nm da cultura corresponde a 0,29.