

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**PRODUÇÃO DO LIPOPEPTÍDEO SURFACTINA A PARTIR
DE UMA CEPA DE *BACILLUS SUBTILIS* COM O OPERON
srfa SOB CONTROLE DO PROMOTOR REGULADO *Pgrac***

DIANE TÉO DE MORAES
Mestre em Microbiologia Agropecuária

Prof^a Dr^a GLÁUCIA MARIA PASTORE
Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de
Alimentos da Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do título de doutor em Ciência de
Alimentos

Campinas, 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

M791p Moraes, Diane Teo de
Produção do lipopeptídeo surfactina a partir de uma cepa de
Bacillus subtilis com operon *srfA* sob controle do promotor regulado
Pgrac. / Diane Teo de Moraes. -- Campinas, SP: [s.n], 2010.

Orientador: Gláucia Maria Pastore
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Engenharia de Alimentos.

1. Biossurfactantes. 2. *Bacillus subtilis*. 3. Surfactina. 4.
Atividade antimicrobiana. I. Pastore, Gláucia Maria. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de
Alimentos. III. Título.

Título em inglês: Production of lipopeptide surfactin from a *Bacillus subtilis* strain with *srfA*
operon under the control of the Pgrac promoter

Palavras-chave em inglês (Keywords): Biosurfactants, *Bacillus subtilis*, Surfactin,
Antimicrobial activity

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Gláucia Maria Pastore

Fabio Marcio Squina

Rosângela dos Santos

Helia Harumi Sato

Karen Signori Pereira

Data da defesa: 29/11/2010

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida em ____/____/____ por Diane Téó de Moraes. Aprovada pela comissão julgadora em ____/____/____.

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore (Orientadora)

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato

Profa. Dra. Karen Signori Pereira

Prof. Dr. Fábio Marcio Squina

Dra. Rosângela dos Santos

Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho

Prof. Dr. Juliano Lemos Bicas

Esse sentido do mundo não é apenas uma representação qualquer. A representação que agora é feita resulta de sua compreensão do real, que ganha dimensão de concreto. E o homem pode agora captar o visível e o invisível, o fenômeno e a essência. Não mais, apenas compreende e ensina a verdade, mas o caminho que ela conduz, pois incorporou a verdade como vida, ação, experiência e não simples transferência de conceitos ou idéias.

Neidson Rodrigues

DEDICO este trabalho,

*Aos meus Pais EDUARDO e ANA,
Por terem proporcionado o início desse
caminho e pelo exemplo de
amor e respeito que aprendi a cultivar.*

*Ao meu marido MARCUS,
por fazer parte da minha vida,
estar sempre por perto,
me apoiando, incentivando,
pelo colo, paciência e todo amor!*

A toda minha FAMÍLIA, por todo apoio e incentivo!

Ao meu pequeno príncipe MIGUEL

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À DEUS, por estar sempre presente em todos os momentos da minha vida.

À Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore pela orientação e oportunidade proporcionada.

Ao Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin pela colaboração durante a execução do projeto.

Aos professores da banca examinadora pela contribuição dada ao meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Wolfgang Schumann da Universität Bayreuth pelas sugestões dadas durante a elaboração deste projeto, e por ter nos cedidos os vetores pHT01 e pHT08.

Ao Prof. Dr. Frederico José Gueiros Filho pela ajuda com a genética de *Bacillus subtilis* e cepas cedidas.

À Profa. Dra. Adriana Franco Paes Leme pela colaboração nas análises realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massas.

Às técnicas Tereza Cristina Lima Silva, Elaine Cristina Teixeira, Adriana Cristina Alves Pinto, Givanil Leite Garrido e Carolina Bondarik pela amizade e toda a assistência no laboratório.

Aos amigos e amigas do LBM, Carlos, Melissa, Luís Gustavo, Juliana, Carol, David, Gabriela, Thiago, Beatriz, Thaís, Andréa, Celisa, Daniela, Tereza, Fernando, Elaine, Adriana e Givanil por tornarem o ambiente de trabalho sempre agradável e por todos os favores.

Aos professores e funcionários do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron.

A todos os funcionários e amigos do Laboratório de Bioaromas da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP.

À toda estrutura oferecida pelo Laboratório Nacional de Luz Síncrotron.

À toda estrutura oferecida pelo Laboratório de Bioaromas da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP.

Aos meus familiares Karina, Guilherme, Eduardo, Thaís, Laura, Luisa, Laís, Hiroko, Francisco, Cíntia, Júlio, Matheus, Michele, João Vitor e Joaquim por todo apoio e incentivo.

À todos aqueles que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Definição e classificação dos biossurfactantes	4
3.2 Propriedades físico-químicas dos biossurfactantes.....	9
3.3 Aplicações dos biossurfactantes.....	12
3.4 Surfactina.....	13
3.5 Metabólitos secundários ou peptídeos.....	16
3.6 Síntese não-ribossômica de peptídeos e biossíntese da surfactina	17
3.7 Clonagem e expressão de genes heterólogos em <i>Bacillus subtilis</i>	21
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 Microrganismos, plasmídeos e meios de cultura	25
4.1.1 Microrganismos.....	25
4.1.2 Plasmídeos	26
4.1.3 Meios de cultura para manutenção, seleção e fermentação.....	26
4.2 Técnicas de manipulação do DNA	27
4.2.1 Amplificação de DNA por PCR.....	27
4.2.2 Purificação de fragmentos de DNA e de produtos de PCR separados por eletroforese em gel de agarose.....	28
4.2.3 Digestão e ligação de DNA.....	29
4.2.4 Extração de plasmídeos	29
4.2.5 Seqüenciamento de DNA.....	30
4.2.6 PCR de colônia	31
4.3 Transformação de células de <i>E. coli</i>	31
4.3.1 Preparo de bactérias competentes para transformação de células por choque térmico	31
4.3.2 Transformação de bactérias por choque térmico	32
4.3.3 Preparo de bactérias competentes para transformação por eletroporação..	32
4.3.4 Transformação por eletroporação.....	33
4.4 Preparo e transformação de células competentes de <i>Bacillus subtilis</i> por competência natural.....	33

4.5	Análise de DNA por eletroforese em gel de agarose	34
4.6	Análise por southern blot.....	35
4.7	SDS-PAGE (Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio)	35
4.8	Identificação de cepas de <i>bacillus subtilis</i> produtoras de surfactina baseado em um método de PCR.....	36
4.9	Estratégia de clonagem.....	36
4.9.1	Construção do cassete de integração.....	37
4.9.1	Confirmação da recombinação homóloga.....	38
4.10	Produção de surfactina e indução com IPTG (Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo)	39
4.11	Extração, purificação e caracterização do biossurfactante produzido.....	39
4.11.1	Extração:.....	39
4.11.2	Purificação:.....	40
4.11.3	Espectrometria de massas:.....	40
4.12	Avaliação da atividade do biossurfactante	41
4.12.1	Atividade hemolítica	41
4.12.2	Avaliação da tensão superficial.....	41
4.12.3	Concentração do biossurfactante bruto	41
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1	Screening de cepas de <i>bacillus subtilis</i> produtoras de surfactina	43
5.2	Construção do vetor de integração pETSurf.....	45
5.3	Desenho dos primers para amplificação das sequências RHFront e RHBack	46
5.4	Amplificação dos fragmentos e genes para construção do cassete	47
5.5	Inserção do cassete de integração no vetor pET-28a.....	51
5.6	Transformação da cepa de <i>bacillus subtilis</i> LB5a com o vetor pET-Surf e seleção dos clones transformantes.....	55
5.7	Avaliação da atividade do biossurfactante	60
5.8	Produção do biossurfactante	64
5.9	PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA SURFACTINA PRODUZIDA POR <i>BACILLUS SUBTILIS</i> pGrac-SrfA.....	66
5.9.1	Purificação de lipopeptídeos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	66

5.9.2	Análise dos lipopeptídeos purificados em HPLC.....	69
6.	CONCLUSÃO	78
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

RESUMO

O lipopeptídeo cíclico surfactina é produzido por diferentes cepas de *Bacillus subtilis*. Em uma concentração de 20 μM , a surfactina é capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para 27 mN/m. Isto faz da surfactina o biossurfactante com maior potencial conhecido. O conjunto multienzimático, responsável pela síntese da surfactina, consiste de três grandes NRPSs: SrfA-A (402kDa), SrfA-B (401kDa) e SrfA-C (144 kDa), compreendendo um total de sete módulos. Os genes NRPSs correspondentes estão organizados no operon *srfA*. A produção de surfactina por *B.subtilis* é usualmente baixa e a produção em sistemas de expressão heterólogos como *E.coli* não é viável. Portanto, uma opção para aumentar a produção de surfactina seria o uso de sistemas de expressão utilizando o próprio *Bacillus*, colocando o operon *srfA* sob controle de um forte promotor que pode funcionar independentemente da regulação por feedback negativo endógeno. Para esta proposta, o promotor nativo do operon responsável pela síntese da surfactina em *B.subtilis* LB5a foi substituído pelo promotor *Pgrac*, o qual pode ser induzido por análogos de lactose. Este sistema de expressão é baseado em um forte promotor que não é inibido por fatores endógenos e, deve fornecer uma nova ferramenta para produzir altos níveis de surfactina em *Bacillus subtilis*. A eficácia do lipopeptídeo produzido pela cepa recombinante de *B.subtilis* pGrac-SrfA foi demonstrada usando testes de atividade hemolítica e avaliação da tensão superficial do meio. Os picos do lipopeptídeo obtido por HPLC para a cepa recombinante pGrac-SrfA apresentaram perfis semelhantes aos obtidos a partir da cepa selvagem. Análises de espectrometria de massas confirmaram a presença de uma série homóloga de lipopeptídeos com variações no tamanho da cadeia hidrocarbônica caracterizando o composto como surfactina. Verificou-se a predominância do homólogo de massa molecular de 1000,18 u. A produção de surfactina pela cepa de *B.subtilis* recombinante foi cerca de 57% superior ao da cepa selvagem, quando induzida por isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo.

ABSTRACT

The cyclic lipopeptide surfactin is produced by different *Bacillus subtilis* strains. At a concentration of 20 μ M, this biosurfactant is able to reduce the surface tension of water from 72 mN/m to 27 mN/m. This makes surfactin one of the most powerful biosurfactants known so far. The surfactin synthetase is a large multienzyme complex consisting of three enzymatic subunits, SrfA (402 kDa), SrfB (401 kDa), and SrfC (144 kDa), comprising of a total of seven modules. The corresponding NRPS genes are organized in the *srfA* operon. Surfactin production from *Bacillus* strains is usually low and production of such large proteins in a heterologous system such as *E. coli* is not viable. One option to improve surfactin production would be to use *Bacillus subtilis* itself as an expression system and to place the *srfA* operon under the control of a strong promoter that can function independently of endogenous negative feedback regulation. For this purpose, the native promoter of the surfactin operon in *B. subtilis* LB5a was replaced by the promoter *Pgrac*, which can be induced by lactose analogs. This expression system is based on a strong promoter and is not expected to be inhibited by endogenous factors and, should provide a new tool for producing higher levels of surfactin in *Bacillus subtilis*. The efficacy of the lipopeptide produced for the recombinant *B. subtilis* pGrac-SrfA was demonstrated using tests of hemolytic activity and evaluation of the surface tension of the medium. HPLC peaks of surfactin gotten from the genetically modified strain showed patterns of lipopeptides similar to those of the wild-type strain, and mass spectrometry analysis confirmed the presence of a lipopeptide homologous series with variations in the hydrocarbon chain length, known as surfactin. Was verified the predominance of a homologue with a molecular mass of 1000.18 u. The surfactin production of the recombinant bacterium was up to about 57% greater than that of wild-type strain when it was induced by isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside.

1. INTRODUÇÃO

Biossurfactantes são biomoléculas de superfície ativa sintetizados por várias espécies de microrganismos, durante o crescimento ou na fase estacionária do desenvolvimento, sendo bactérias e leveduras os principais produtores. Algumas cepas de *Bacillus subtilis* produzem o lipopeptídeo surfactina, um potente surfactante sintetizado por um complexo que consiste em três peptídeo sintetases (srfA-A, srfA-B e srfA-C) codificadas pelo operon *srfA* (KIM et al., 2009).

A surfactina é um lipopeptídeo cíclico que consiste de um heptapeptídeo ligado a uma cadeia de ácido graxo β -hidróxi de comprimento variável (13 a 15 átomos de carbono). Em uma concentração de 20 μ M, a surfactina é capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para 27 mN/m. Isto faz da surfactina o biossurfactante com maior potencial conhecido, e desperta o grande interesse para aplicações industriais. Em especial, representa uma alternativa para surfactantes químicos (SYMMANK et al., 2002).

Os surfactantes produzidos por microrganismos vêm recebendo considerável interesse nos últimos anos devido à baixa toxicidade e à sua biodegradabilidade, aliados a eficácia em extremos de temperatura, pH e salinidade, além da possibilidade de serem sintetizados a partir de fontes renováveis, como resíduos da agroindústria (MUKHERJEE & DAS, 2005).

Entre as aplicações comerciais dos biossurfactantes destacam-se a recuperação de petróleo, biorremediação de poluentes, formulação de lubrificantes, além de diferentes utilizações na indústria farmacêutica e de alimentos. A surfactina, em especial destaca-se por apresentar atividade antitumoral, antiviral, antibacteriana, antifúngica, hipocolesterolêmica e hemolítica (KIM; KIM; KIM, 2007). Entretanto, esta molécula ainda não é amplamente utilizada pela indústria devido ao alto custo de produção, associado aos baixos rendimentos.

A produção contínua de certas proteínas pode gerar um estresse fisiológico na célula que prejudicaria seu crescimento e causaria complicações na expressão

do gene de interesse, podendo tornar-se tóxica para a célula, inviabilizando o seu crescimento (CHAMBERLAIN et al., 1997). Sistemas de expressão contendo promotores que são regulados por indutores, repressores ou fatores ambientais são essenciais para o controle da expressão gênica, oferecendo algumas vantagens sobre os sistemas constitutivos, como a capacidade de controlar o nível de produção e modular a expressão da proteína. (KUIPERS et al., 1993).

O objetivo geral deste trabalho foi modificar geneticamente uma cepa de *Bacillus subtilis* selvagem, produtora natural do biossurfactante, a fim de melhorar as concentrações de surfactina obtidas e viabilizar a produção em escala industrial, criando um sistema de expressão controlado. A partir da substituição do promotor nativo do operon *srfA* da cepa selvagem pelo promotor regulado *Pgrac*, permitindo a indução da expressão gênica a partir da adição de IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo).

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

Modificar geneticamente uma cepa de *Bacillus subtilis* selvagem, produtora natural de surfactina, para que esta venha a produzir, de maneira controlada, por indução pela adição de IPTG, maiores concentrações deste biossurfactante.

Objetivos específicos:

1º) Construir um sistema de expressão do operon *srfA* controlado por um promotor regulado em *Bacillus subtilis*;

2º) Construir um cassete para integração, por recombinação homóloga, no DNA genômico de *Bacillus subtilis*;

3º) Inserir cassete de integração na região promotora do operon *srfA*;

4º) Avaliar atividade biossurfactante da molécula produzida por indução.

5º) Purificar e caracterizar, utilizando técnicas cromatográficas e ESI-MS (Espectrometria de Massas acoplada à Ionização por Electrospray), os compostos produzidos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Definição e classificação dos biossurfactantes

Surfactantes ou tensoativos são compostos orgânicos, constituídos por moléculas anfipáticas contendo uma região hidrofílica (polar) e outra hidrofóbica (apolar), com propriedades de atividade superficial. Podendo ser sintéticos, obtidos a partir de sínteses químicas, ou biossurfactantes, moléculas com características surfactantes produzidos por microrganismos. Os surfactantes sintéticos são utilizados em diversos setores para uma ampla variedade de propósitos, como emulsificação, detergência, solubilização e umidificação (COLLA & COSTA, 2003). Atualmente quase todos os surfactantes utilizados são quimicamente derivados do petróleo. Entretanto, o interesse por surfactantes microbiológicos tem aumentado nos últimos anos, devido às suas diversidades, características para o auxílio ambiental, a possibilidade de produção através de fermentações utilizando resíduos da agroindústria e suas potenciais aplicações em áreas como a proteção ambiental, recuperação de resíduos de óleos, cuidados à saúde e indústrias de processamento de alimentos (KIM et al., 2000).

Os biossurfactantes podem ser divididos em categorias de baixa ou alta massa molecular. Sendo glicolipídeos, soforolipídeos, lipídeos de trealose, ácidos graxos e fosfolipídeos citados como surfactantes microbiológicos de baixo peso molecular, produzidos extracelularmente e capazes de reduzir a tensão superficial do meio, enquanto os de alto peso molecular são os lipopolissacarídeos bioemulsificantes, os quais produzem emulsões no meio aquoso e não são normalmente excretados (WU & JU, 1998). Muitos dos surfactantes microbianos de alta massa molecular são também heteropolissacarídeos polianiónicos, contendo polissacarídeos e proteínas. Em alguns casos, os próprios fosfolipídeos da membrana celular agem como biossurfactantes (KARANTH; DEO; VEENANADIG, 1999).

Nas últimas décadas, diversos microrganismos têm sido relatados como produtores de vários tipos de surfactantes.

Os primeiros relatos envolvendo a utilização de biosurfactantes datam de 1949, quando Jarvis e Johnson (1949) detectaram as atividades antibiótica e hemolítica de um ramnolípídeo, e de 1968, quando Arima e colaboradores (1968) descobriram a existência de um novo composto biologicamente ativo produzido por *Bacillus subtilis*, denominado surfactina devido à sua grande atividade superficial (KAKINUMA et al., 1969).

Estes compostos anfifílicos químicos ou microbiológicos podem reduzir as tensões superficiais e interfaciais através da acumulação na interface de fluidos imiscíveis, aumentando a solubilidade, mobilidade, biodisponibilidade e conseqüentemente a biodegradação de compostos orgânicos insolúveis ou hidrofóbicos (SINGH; VAN HAMME; WARD, 2006).

Nas últimas décadas, diversos microrganismos têm sido relatados como produtores de vários tipos de surfactantes. Estes consistem em subprodutos metabólicos, sintetizados por várias espécies de microrganismos, durante o crescimento ou na fase estacionária do desenvolvimento, sendo leveduras e bactérias os principais produtores (RICARDO et al., 2009).

Os surfactantes microbiológicos apresentam uma série de vantagens se comparados aos seus concorrentes químicos sintéticos e vem recebendo considerável e crescente interesse devido às características como baixa toxicidade; eficácia em extremos de pH, temperatura e salinidade; capacidade de ser produzido a partir de fontes renováveis, como resíduos da agroindústria e biodegradabilidade. Isto os torna substitutos ideais dos emulsificantes convencionais em alimentos e cosméticos, originando maior apelo de mercado pelo fato desses produtos serem considerados naturais, além de apropriados para aplicação ambiental (SINGH & CAMEOTRA, 2004).

Atualmente estas moléculas vêm se tornando cada vez mais alvo de pesquisas pelo fato de apresentar atividade antimicrobiana, antiviral e antitumoral, além de ser capaz de modificar a adesão do microrganismo em superfícies

sólidas, podendo atuar de maneira importante no controle de formação de biofilme por bactérias patogênicas (CAMEOTRA & MAKKAR, 2004).

Os biossurfactantes são capazes de formar diversas estruturas tais como micelas, vesículas esféricas ou irregulares, estruturas lamelares, entre outras (Figura 1). Eles se acumulam em interfaces apresentando diferentes polaridades, em especial óleo/água e ar/água, e age como agente umectante em superfícies sólidas (água/sólido). Este processo dinâmico é baseado na habilidade dos biossurfactantes de reduzir a tensão superficial pelo remanejamento molecular, através do acúmulo na superfície de compostos insolúveis, influenciando as ligações de hidrogênio e outras interações hidrofóbicas-hidrofílicas, aumentando a área superficial destes, levando a um aumento da biodisponibilidade e consequente biodegradabilidade (COLLA & COSTA, 2003).

Em comum com todas as moléculas que atuam em superfícies, os biossurfactantes contêm um ou mais grupos lipofílicos e hidrofílicos. Os grupamentos lipofílicos podem ser uma proteína ou um peptídeo, apresentando partes hidrofóbicas ou cadeias carbonadas de 10 a 18 carbonos. Já os grupos hidrofílicos são ésteres, hidróxi, fosfato, carboxila ou carboidratos (MORIKAWA et al., 1993). Todos os biossurfactantes sob diferentes condições e em diferentes sistemas mostram habilidade de reduzir a tensão superficial e interfacial em misturas óleo/água.

Os biossurfactantes produzidos por bactérias, fungos filamentosos e leveduras apresentam grande diferença dos surfactantes sintéticos pela variabilidade na sua natureza hidrofóbica e hidrofílica (COLLA & COSTA, 2003).

Os biossurfactantes, de modo geral, podem ser classificados em: glicolipídeos, lipossacarídeos, lipopeptídeos, fosfolipídeos e ácidos graxos/lipídeos neutros (como os ácidos ustilágico e corinomicólico), além de surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (Tabela 1), sendo os lipopeptídeos os biossurfactantes mais efetivos (ZAJIC & SEFFENS, 1984). Os surfactantes lipoprotéicos são talvez os mais conhecidos por suas atividades antibióticas, sendo melhor caracterizados aqueles produzidos por *Bacillus spp.* incluindo surfactina, iturina, fengicina, liquenisina (MAIER.,2003), micosubtilisina e

bacilomicina (STELLER & VATER., 2000). Esse tipo de composto se caracteriza pela existência de peptídeos ligados a ácidos graxos, sendo que a porção protéica da molécula pode ser neutra ou aniônica e os aminoácidos estão freqüentemente dispostos em uma estrutura cíclica (MAIER.,2003).

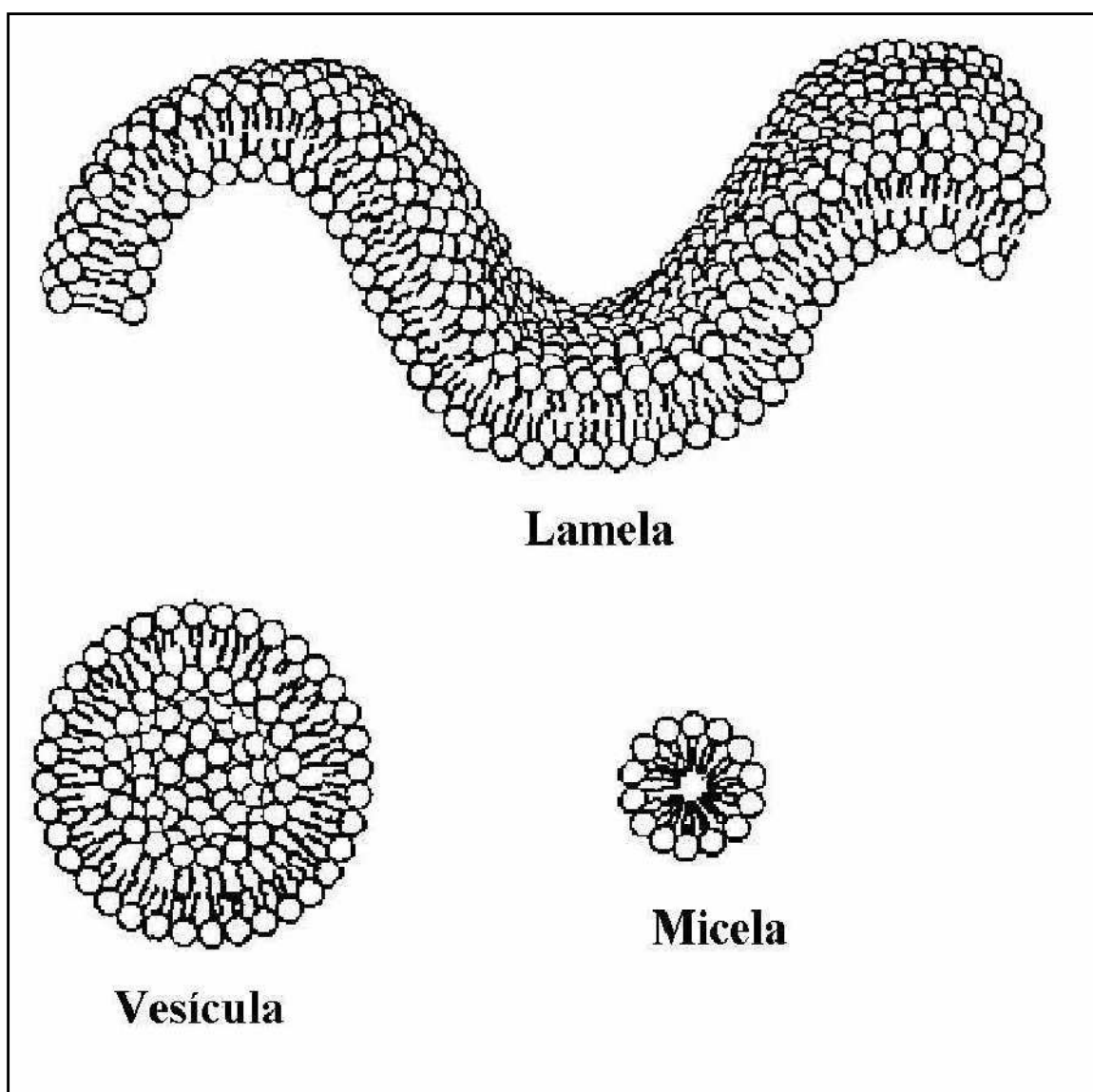


Figura 1. Estruturas básicas formadas por biossurfactantes

Fonte: Colla & Costa, 2003

Tabela 1. Tipos de biossurfactantes produzidos por microrganismos

Biossurfactante		Microrganismo
Glicolipídeos	Micolatos de trealose	Rhodococcus erythropolis Arthrobacter paraffineus Mycobacterium phlei
	Ésteres de trealose	Mycobacterium fortitum Micromonospora sp. Mycobacterium paraffinicum Rhodococcus erythropolis
	Micolatos de mono-di e trissacarídeos	Corynebacterium diptheriae Mycobacterium smegmatis Arthrobacter sp.
	Raminolipídeos	Pseudomonas sp. Torulopsis bombicola
	Soforolipídeos	Torulopsis petrophilum Candida sp.
		Candida sp.
Fosfolipídeos e ácidos graxos	Fosfolipídeos e ácidos graxos	Corynebacterium sp. Micrococcus sp. Acinetobacter sp.
	Ácidos graxos	Thiobacillus thiooxidans Aspergillus sp.
Lipopeptídeos	Lipopeptídeos e lipoproteínas	Bacillus brevis Bacillus polymyxa Pseudomonas rubescens Thiobacillus thiooxidans
	Surfactina	Bacillus subtilis Bacillus licheniformis
Poliméricos	Lipopolissacarídeos	Acinetobacter calcoaceticus RAG-1
	Heteropolissacarídeos	Acinetobacter calcoaceticus A1

Fonte: Adaptado de Colla & Costa, 2003

A concentração de biossurfactante no meio de cultura é expressa em termos de diluição crítica micelar (DCM), fator pelo qual a concentração efetiva excede a concentração crítica micelar (CCM) (CASSIDY & HUDAK, 2001), ou seja, a concentração acima da qual o surfactante começa a se agregar em micelas e não mais se observa uma maior redução da tensão superficial (COOPER et al., 1979). A CCM pode ser estimada pela relação entre a tensão superficial e as

diluições do meio de cultura, sendo a CCM correspondente à diluição na qual a tensão superficial começa a aumentar.

A caracterização e a quantificação de biossurfactantes podem ser feitas por cromatografia em camada delgada (CCD) e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), sendo esta última uma alternativa efetiva para a análise de biossurfactantes, em razão de sua maior sensibilidade e seletividade quando comparadas às medidas de tensão e análise por CCD (LIN et al., 1996). A análise por HPLC requer amostras de biossurfactantes relativamente puras, somente obtidas após operações trabalhosas de isolamento e purificação. A separação dos vários congêneres de biossurfactantes, produzidos por uma mesma espécie microbiana, é possível com o uso de cromatografia líquida - espectrometria de ionização de massa (LC/MS) (DÉZIEL et al., 1999).

3.2 Propriedades físico-químicas dos biossurfactantes

Os diferentes grupos de biossurfactantes exibem diversas propriedades e indicam uma variedade de funções fisiológicas no microrganismo produtor.

Biodegradabilidade, Tolerância a extremos de pH, temperatura e salinidade:

Ao contrário dos surfactantes sintéticos, os biossurfactantes, como são chamados aqueles de origem microbiana, são facilmente degradados e particularmente compatíveis para aplicações ambientais como biorremediação e derramamentos de óleo (MUTHUSAMY et al., 2008).

A maioria das moléculas de biossurfactantes se apresentam estáveis em condições ambientais adversas como pH e temperatura. Barros (2007) reportou em estudo do processo produtivo da surfactina, produzido pela linhagem LB5a de *Bacillus subtilis* em escala piloto utilizando manipueira como substrato, a estabilidade deste biossurfactante. Os resultados demonstraram que a surfactina manteve estabilidade frente à temperatura de 100°C por 140 minutos e 121°C por

60 minutos. Também foi estável na faixa de pH de 6 a 10 e suportou concentrações salinas testadas de até 20%.

Atividade superficial e interfacial:

Um bom biossurfactante tem a capacidade de reduzir a tensão superficial da água (20°C) de 72 para 27 mN/m (Muthusamy, 2008) em concentrações menores de 20 µM (PEYPOUX; BONMATIN; WALLACH, 1999), além de reduzir a tensão interfacial do sistema água/hexadecano de 43 mN/m para valores <1 mN/m (MUTHUSAMY et al., 2008).

Alguns biossurfactantes quando comparados a surfactantes sintéticos, como dodecilsulfato de sódio (SDS) e brometo de trimetil amônio (BTA), possui maior capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial e apresenta menores valores de concentração micelar crítica (CMC) (KIM et al., 1997).

Atividade anti-adesão (Atua na formação de biofilme):

Biossurfactantes são capazes de modificar a hidrofobicidade da superfície bacteriana e conseqüentemente, a adesão microbiana em superfícies sólidas. Estas propriedades dependem do tipo e da concentração do lipopeptídeo surfactante, como da hidrofobicidade inicial da bactéria (AHIMOU; JACCQUES; DELEU, 2000).

O controle do crescimento microbiano é requerido em muitos ambientes sensíveis, onde superfícies apresentam condições favoráveis para proliferação de microrganismos

Baixa toxicidade:

Poucos dados são disponíveis na literatura considerando a toxicidade de surfactantes microbianos. Eles geralmente são considerados produtos de baixa toxicidade ou mais freqüentemente como não-tóxicos, característica que os

tornam apropriados para diversos setores da indústria como, alimentício, farmacêutico, cosméticos, entre outros.

Em estudo para avaliar moléculas surfactantes, foi comparado, em termos de toxicidade e propriedades mutagênicas, um biossurfactante obtido a partir de *Pseudomonas aeruginosa* com um surfactante sintético (Marlon A-350) largamente utilizado pela indústria. Ambas as análises revelaram alta toxicidade e efeitos mutagênicos do surfactante, derivado químico. Enquanto o biossurfactante apresentou resultados que o revelaram não-tóxico e não-mutagênico (FLASZ et al., 1998).

Atividade antimicrobiana, antiinflamatória e antitumoral:

A atividade antimicrobiana dos biossurfactantes ainda não teve seu mecanismo de ação bem elucidado. Sabe-se apenas que suas propriedades surfactantes e sobre membranas aumentam a hidrofobicidade da membrana de *Bacillus*, facilitando sua adesividade sobre superfícies sólidas (AHIMOU; JACCQUES; DELEU, 2000). No entanto, muitos surfactantes lipopeptídicos possuem potentes atividades antibióticas e foram submetidos a diversos estudos na descoberta de novos antibióticos (CAMEOTRA & MAKKAR, 2004).

Nitsche (2004) avaliou a atividade antibiótica do lipopeptídeo surfactina produzido por uma cepa de *Bacillus subtilis* (LB5a) em meio de manipueira. Foram testadas bactérias gram-positivas, gram-negativas, além de alguns fungos filamentosos e leveduras. Todas as bactérias apresentaram susceptibilidade ao produto, sendo *Pseudomonas aeruginosa* a mais sensível, entre as gram-negativas, e *Micrococcus luteus* e *Bacillus cereus* as gram-positivas mais susceptíveis. O estudo não observou alteração no crescimento dos fungos e leveduras avaliados na presença do surfactante.

Alguns biossurfactantes são considerados alternativas apropriadas para agentes antimicrobianos sintéticos e podem ser usados de modo seguro e efetivo como agente terapêutico. O que vem a ser particularmente importante, devido ao aumento no número de bactérias patogênicas resistentes, exigindo tratamentos

constantes e a busca de outras linhas de tratamentos (SEYDLOVA & SVOBODOVA, 2008).

Por outro lado, a atividade antiinflamatória da surfactina foi comprovada tanto *in vivo* quanto *in vitro* e se deve à inibição direta e seletiva da Fosfolipase A₂ citosólica (PLA₂), enzima lipolítica que hidrolisa fosfolipídios de membrana, liberando, na presença de Ca⁺², ácido araquidônico, precursor de mediadores químicos do processo inflamatório, prostaglandinas e leucotrienos (KIM et al., 1997). Por sua vez, a atividade antitumoral contra células do carcinoma de Ehrlich foi relatada por Kameda et al., (1974), no caldo fermentado de *Bacillus natto*, no qual foram encontradas duas substâncias, sendo uma delas, surfactina.

3.3 Aplicações dos biossurfactantes

O potencial de aplicação de compostos de superfície ativa produzidos a partir de microrganismos é baseado em suas propriedades funcionais, citadas anteriormente. Estas propriedades são aplicadas em campos diversos da agricultura, construção e nas indústrias alimentícias, papel, metal, têxtil, farmacêutica e de cosméticos. Entretanto, os principais usos relacionam-se à indústria petrolífera, devido ao aumento da solubilidade dos componentes de petróleo. O potencial de recuperação de derivados de petróleo deve-se a sua utilização na limpeza de tanques, dispersão de óleos derramados em ecossistemas aquáticos, entre outras.

Os surfactantes podem ser utilizados em praticamente todos os setores da indústria moderna (CAMEOTRA & MAKKAR, 1998), pois sua natureza anfipática confere a eles a propriedade de formar microemulsões, possibilitando a solubilização de compostos hidrofóbicos em água. Devido a isto, suas aplicações são diversas, tais como emulsificantes em indústrias de alimentos e de cosméticos (KIM et al., 1997), componentes de produtos domésticos e industriais de limpeza, e aditivos na indústria de construção civil e do petróleo.

Entre uma das suas principais propriedades está a capacidade de formar e estabilizar emulsões. Propriedade esta que faz com que esta molécula desperte

grande interesse da indústria de alimentos, já que emulsificantes apresentam uma série de aplicações em alimentos, entre elas: melhorar a textura e vida de prateleira de produtos que contenham amido, pela formação de complexos com os componentes destes; modificar as propriedades reológicas da farinha de trigo, pela interação com o glúten; melhorar a consistência e textura de produtos à base de gorduras, pelo controle de polimorfismo e da estrutura cristalina das gorduras, além de promover a solubilização de aromas (BARROS et al., 2007).

3.4 Surfactina

Cepas de *Bacillus subtilis* produzem uma grande variedade de lipopeptídeos bioativos com grande potencial biotecnológico e aplicações em diferentes setores da indústria, como a farmacêutica e alimentícia em especial. Entre os quais estão os lipopeptídeos pertencentes a família das surfactinas, iturinas e fengicinas (CHEN et al., 2008).

A surfactina é produzida por várias cepas de *Bacillus subtilis* (KOWALI et al., 1998; COSTA, 2005) e sua estrutura geral, demonstrada na Figura 2, é a de um peptídeo cíclico de sete aminoácidos ligados a uma cadeia de ácido graxo β -hidróxi, sendo que esta cadeia pode variar de 13 a 15 átomos de carbono, permitindo a existência de diferentes compostos homólogos e isômeros (COSTA, 2005). O principal ácido graxo conjugado é o ácido 3 hidróxi-13-metil-tetradecanóico (KOWALL et al., 1998) ligado por ligação lactona, tal como os demais (PEYPOUX; BONMATIN; WALLACH, 1999).

A surfactina é um dos biosurfactantes mais poderosos já conhecido (DELEU et al., 2003; PEYPOUX et al., 1999). Tem diversas vantagens sobre os surfactantes sintéticos químicos, tais como a baixa concentração micelar crítica (CMC) e a biodegradabilidade (MULLIGAN, 2005).

Devido a sua natureza anfífila, a surfactina é solúvel em solventes polares e apolares. Sendo capaz de inibir a formação de coágulos, além de ser descrita como agente antibacteriano, antiviral e antitumoral, e ainda um poderoso emulsificante.

Em particular, a surfactina representa uma alternativa para os surfactantes químicos, os quais possuem um efeito prejudicial (PEYPOUX; BONMATIN, WALLACH, 1999).

Sabe-se que a atividade biológica da surfactina depende tanto da composição de aminoácidos e da sequência do peptídeo como da natureza da sua parte lipídica (KOWALL et al, 1998; BARROS et al.,2007). As substituições de aminoácidos são responsáveis pelas significativas mudanças em suas propriedades causadas pela modificação da distribuição polar/apolar e/ou da acessibilidade de grupos carboxílicos à cátions. Estas modificações acarretam em diferenças na capacidade hemolítica, quelação de metais, CMC e atividade superficial (BARROS et al., 2007).

A surfactina natural é uma mistura de isoformas que se diferenciam ligeiramente em suas propriedades físico-químicas devido à variações no tamanho da cadeia e a ligação do seu componente hidroxí ácido graxo e as substituições dos aminoácidos componentes do anel (KOWALL et al, 1998). Estas variações dependem da linhagem (KOWALL et al, 1998; HSIEH et al, 2004) e das condições nutricionais e ambientais (KOWALL et al, 1998).

O grupo de surfactinas melhores caracterizadas apresenta valores de razão massa/carga entre 1000 e 1060 (KIM et al., 2009). O enorme interesse em torno das propriedades da surfactina vem promovendo o surgimento de inúmeras pesquisas em busca de novas isoformas desta molécula, que apresentem aumento das propriedades biossurfactantes. Como resultado, inúmeras variantes de surfactina tem sido citadas (SONG et al., 2009; KIM et al., 2009; LIU et al., 2008).

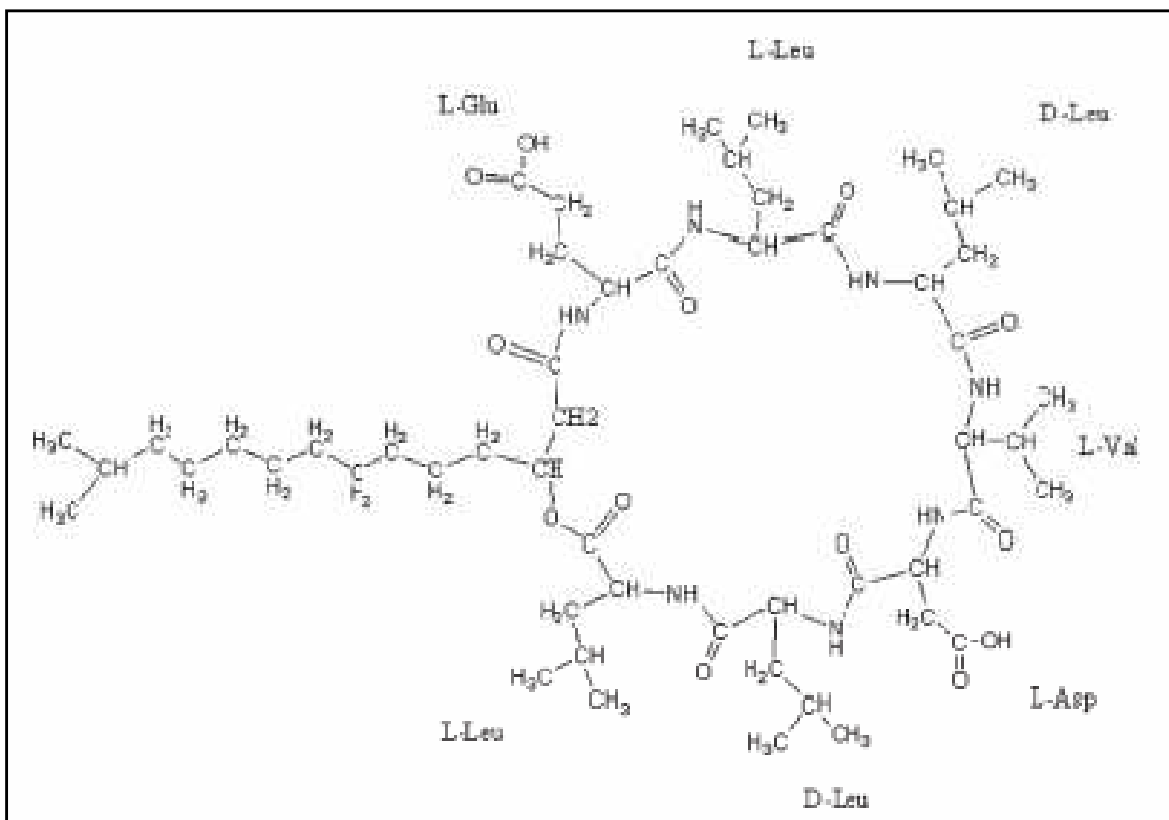


Figura 2. Estrutura do isômero mais comum da surfactina

A surfactina é conhecida por ter excepcional atividade superficial, reduzindo a tensão superficial da água (20 °C) de 72 para 27 mN/m (ARIMA; KAKINUMA; TAMURA, 1968; COOPER et al., 1981) em concentrações menores de 20 µM (PEYPOUX; BONMATIN; WALLACH, 1999), além de reduzir a tensão interfacial do sistema água/hexadecano de 43 para valores menores que 1 mN/m. Quando comparada a outros biossurfactantes (HAFENBURG; HOMMEL; KLEBER, 2003) e a alguns surfactantes sintéticos, como dodecilsulfato de sódio (SDS) e brometo de trimetil amônio (BTA) (KIM et al., 1998), possui maior capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial e apresenta menores valores de concentração micelar crítica (CMC) (KIM et al., 1998).

3.5 Metabólitos secundários ou peptídeos

Os peptídeos são biomoléculas que contêm de dois a dezenas de resíduos de aminoácidos unidos entre si através de ligações peptídicas. Se comparadas às proteínas, são quimicamente mais versáteis, pois podem ser esterificados em suas carboxilas terminais, acetilados em seus grupos terminais, fosforilados ou sulfatados em um ou mais resíduos (serina, treonina ou tirosina), lineares, semi-cíclicos (geralmente via uma ou mais ligações dissulfeto intra ou intercadeias peptídicas) ou cíclicos (via ligação entre os grupos amino e carboxila dos aminoácidos terminais). Muitos contêm um ácido piroglutâmico como resíduo N-terminal, outros apresentam D-aminoácidos e outros, ainda, possuem aminoácidos não usuais (GUTTE, 2000). Os peptídeos são também extremamente diversificados em termos funcionais. Muitos atuam como hormônios ou fatores liberadores destes, enquanto outros são neuropeptídeos, neurotransmissores, toxinas ou antibióticos naturais (MACHADO et al., 2004).

Os peptídeos são divididos em duas classes:

- Peptídeos sintetizados pela via ribossomal: são produzidos por todas as espécies de vida, incluindo as bactérias, como componentes principais do sistema de defesa do hospedeiro. Na síntese ribossômica de peptídeos, a formação das pontes peptídicas é direcionada pelos ribossomos e o RNAm funciona como molde determinando a sequência do aminoácido do produto. O número de aminoácidos incorporados naturalmente nos peptídeos ribossômicos está restrito a 20, codificados pelos códons de RNAm. Os quais podem consistir de mais de 3000 resíduos de aminoácidos (HANCOCK & CHAPPLE, 1999).
- Peptídeos sintetizados pela via não-ribossomal: são drasticamente modificados e amplamente produzidos por bactérias. São exemplos os glicopeptídeos como vancomicina. A síntese não-ribossômica utiliza uma grande variedade de substratos, como aminoácidos não-protéicos, hidroxíácidos e substâncias policetídicas, especialmente elaboradas para serem incorporadas na estrutura destes peptídeos. No processo biossintético eles podem ser modificados de várias maneiras pelos domínios integrados ou pelas funções codificadas por genes

separados, o que propicia uma diversidade enorme de peptídeos lineares ou cíclicos. O tamanho desses peptídeos varia de 2 a 48 aminoácidos (MACHADO et al., 2004).

As moléculas sintetizadas por via não-ribossômica, a partir de uma rota enzimática para a síntese de peptídeos, e que essa se desenrola através de um complexo enzimático modular chamado não-ribossomal peptídeo sintetase (NRPS), normalmente são cíclicas com uma grande quantidade de aminoácidos não protéicos e freqüentemente contêm aminoácidos conectados por ligação diferentes das peptídicas, como as ligações sulfídicas (CHALLIS & NAISMITH, 2004).

A habilidade destes complexos multienzimáticos de incluir tais aminoácidos e incorporá-los em ambos os peptídeos cíclicos e lineares resulta numa grande estrutura natural diversa das espécies bacterianas e fúngicas. Os peptídeos não-ribossômicos podem atuar como um esqueleto para a biossíntese de estruturas mais complexas ou podem ser incorporados como ácidos graxos ou policetonas. Tais estruturas podem ser biossintetizadas por sistemas de peptídeos sintetase mistos ou híbridos e policetídeo sintase. O número de metabólitos secundários estruturalmente identificados produzidos por este mecanismo de arranjo de tióis está se expandindo muito rapidamente (MACHADO et al., 2004).

3.6 Síntese não-ribossômica de peptídeos e biossíntese da surfactina

A biossíntese desta via ocorre através de uma série de reações enzimáticas parciais e repetitivas. Os aminoácidos que constituem a estrutura do peptídeo são incorporados seqüencialmente, onde a formação dos peptídeos não ribossômicos está ligada diretamente ao módulo que corresponde ao segmento de DNA que codifica o sistema multienzimático. A seqüência de eventos é determinada por um arranjo espacial de domínios catalíticos com os módulos em NRPS envolvidos na catálise de reações parciais. A enzima utiliza um módulo composto por cerca de

1000 aminoácidos, para a incorporação de um aminoácido em um peptídeo não-ribossômico sendo subdividido em regiões menores, envolvidas em reações enzimáticas específicas (CHIOCCHINI, 2006).

As peptídeos sintetases são enzimas modulares que constroem peptídeos de estruturas diversas e com importantes atividades biológicas. Segundo Mootz; Schwarzer; Marahiel (2000) sua organização modular sugere enorme potencial para construção de novos compostos por recombinação genética. A grande variedade de atividades biológicas dentro deste grupo de peptídeos é resultado da enorme diversidade estrutural que pode ser gerada por NRPS. Estas enzimas incorporam frequentemente resíduos incomuns tais como os aminoácidos não-protogenicos ou ácidos β - hidroxil, que podem mais tarde ser modificados por N-metilação, formação heterocíclica do anel ou epimerização no D-isômero (KONZ & MARAHIEL, 1999).

As peptídeos sintetases são compostas por uma seqüência de módulos ativando aminoácidos específicos, cada unidade modular tem aproximadamente 110 kDa e consiste em domínios catalíticos responsáveis pela adenilação (Domínio A), formação do tioéster (Domínio T) e condensação (Domínio C) de um aminoácido específico (MARAHIEL; STACHELHAUS; MOOTZ, 1997). Devido a sua estrutura modular, estas enzimas podem se transformar em um alvo potencial para manipulação combinatorial. Módulos distintos ou domínios podem ser trocados para alterar a especificidade das peptídeos sintetases, resultando em peptídeos modificados com aplicações biotecnológicas otimizadas (SYMMANK et al., 2002).

Ocorre uma relação linear entre as etapas de biossíntese e a seqüência de módulos. O primeiro módulo de uma NRPS está envolvido na incorporação e ativação do aminoácido N-terminal e os demais na incorporação dos aminoácidos subsequentes. As mínimas reações de NRPS são condensações, adenilação e tioesterificação. As regiões envolvidas nestas reações parciais estão localizadas em domínios, ou seja, de adenilação (domínio A), de formação do tioésteres (domínio P) e de condensação (domínio C).

Em analogia a biossíntese de ácidos graxos, onde se tem a proteína carreadora de acilas (ACP) (CHIOCCHINI, 2006) o domínio de formação de tioésteres também é conhecido como proteína carreadora de peptídeos (PCP). Vários outros domínios já foram descritos embora não sejam essenciais para a incorporação de aminoácidos.

Ao fim da síntese enzimática de peptídeos o produto é liberado da enzima por meio da atividade de tioesterase, geralmente catalisada pelo domínio de tioesterase (T). O domínio T está frequentemente inserido no último módulo das NRPS. Para as peptídeos sintetases se tornarem funcionais elas necessitam sofrer modificação, ocorrendo a incorporação do cofator 4'-fosfopantoteína (PAN) ao domínio PCP através de uma ligação covalente do tipo fosfodiéster ao resíduo de serina (CHIOCCHINI, 2006)

Os peptídeos produzidos em síntese não-ribossômica são de grande interesse econômico por apresentar um enorme potencial de atividades biológicas. Os genes que codificam as peptídeos sintetases têm sido clonados de diferentes origens e analisados em nível molecular (Symmank et al., 2002). Dentre os exemplos, podem ser citados o sistema de enzimas para a produção do imunomodulatório ciclosporina A (WEBER et al., 1994) de *Tolypocladium inflatum*, o precursor do antibiótico penicilina (MACCABE et al., 1991) de várias espécies de bactérias e fungos, e o lipopeptídeo surfactina de *Bacillus subtilis* (COSMINA et al., 1996).

Muitos destes peptídeos são cíclicos ou ramificados. Assim, segundo Mootz; Schwarzer; Marahiel (2000), NRPS tem a chave para síntese de peptídeos de estrutura complexa, os quais são extremamente difíceis para sintetizar.

Estes peptídeos representam um grupo de produtos naturais, com grande importância farmacêutica, sintetizado por microrganismos, incluindo fungos filamentosos, bactérias Gram-positivas e em menor extensão as Gram-negativas. Entre as bactérias Gram-positivas, o grupo dos Actinomycetes, assim como os membros do gênero *Bacillus* são as principais produtoras de NRPSs.

Os membros desta classe heterogênea de compostos naturais compreendem o antibiótico bacitracin A (KONZ & MARAHIEL, 1999), tirocidina A

(MOOTZ & MARAHIEL, 1997), vancomicina (VAN WAGENINGEN et al., 1998) e daptomicina (RAJA et al., 2003). São também de origem não-ribossômica o imunossupressor ciclosporina A (WEBER et al., 1994), os anti-tumorais bleomicina (DU et al., 2000) e epotilone (MOLNAR et al., 2000), bem como o biossurfactante surfactina (PEYPOUX; BONMATIN; WALLACH, 1999). A complexidade estrutural dos NRPSs reflete seu largo espectro de atividades.

O conjunto multienzimático, responsável pela síntese da surfactina, consiste de três grandes NRPSs: *srfA-A* (402 kDa), *srfA-B* (401 kDa) e *srfAC* (144 kDa), compreendendo um total de 7 módulos. Os genes NRPSs correspondentes são organizados no operon *srfA* (Figura 3).

Imediatamente abaixo da região codificadora de *srfA-C*, está localizado o gene *srfA-D*, sequência que codifica para a thioesterase tipo II (TE II). Aproximadamente 4 kb abaixo do operon *srfA*, está localizado o gene *sfp*, o qual codifica para fosfopanteinase (PPTase), requerida para a conversão do domínio PCP do complexo biossintético da surfactina de sua forma inativa para forma ativa (LAMBALOT et al., 1996).

De acordo com Lee et al., 2005, o gene *sfp*, o qual é requerido juntamente com o operon *srfA* para a biossíntese de surfactina (NAKANO et al., 1992), está localizado vários quilobases abaixo do operon *srfA* e codifica uma fosfopanteína transferase (PPTase) necessária para ativar a surfactina sintetase por modificação pós-transcricional.

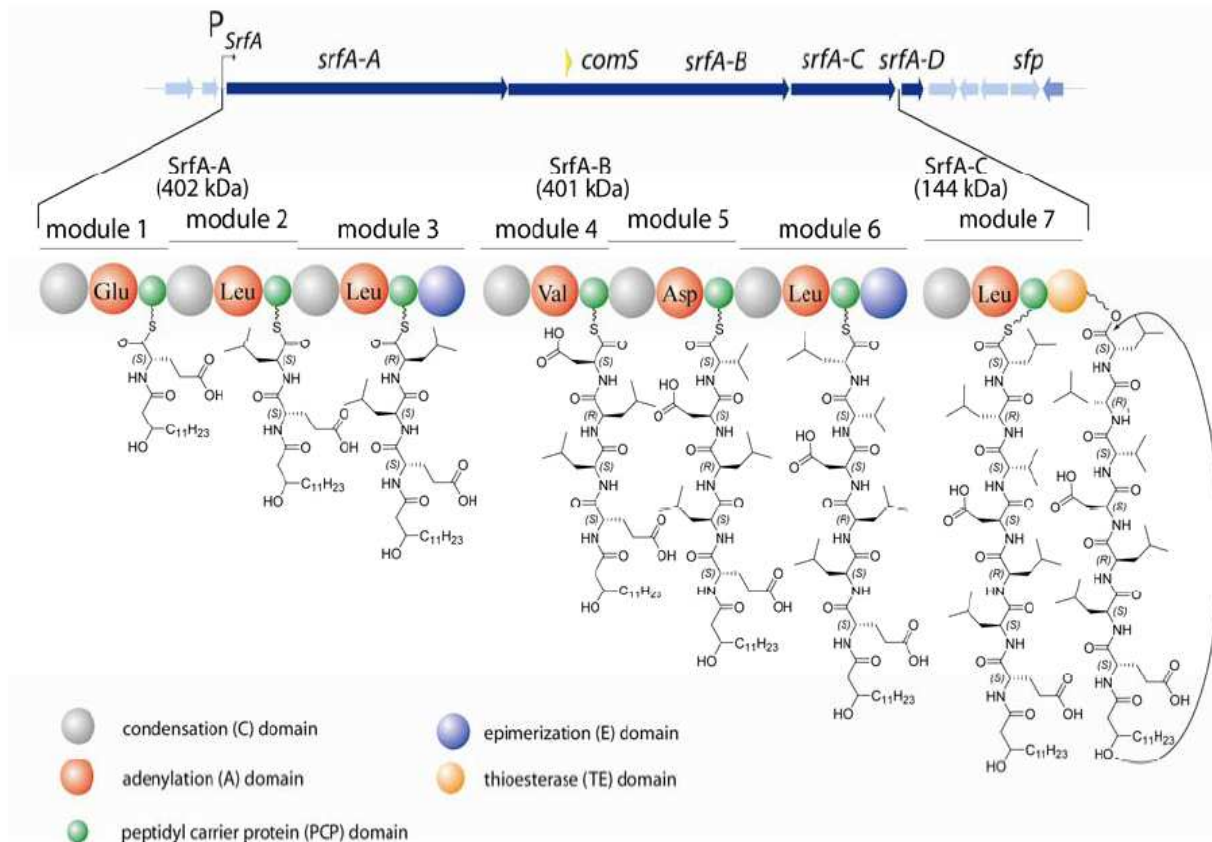


Figura 3. Operon *srfA* de *Bacillus subtilis*

Fonte: Chiocchini, 2006

3.7 Clonagem e expressão de genes heterólogos em *Bacillus subtilis*

A bactéria *Bacillus subtilis* é um bacilo gram positivo de solo, não patogênico, não colonizador de tecidos, naturalmente transformável (a capacidade de capturar DNA exógeno faz parte do seu ciclo de vida) e formador de esporos. Essas características lhe conferem vantagens para a expressão de proteínas heterólogas, valendo ressaltar que linhagens de *B. subtilis* são utilizadas há várias décadas para a produção de proteases que são secretadas empregadas na

indústria de fabricação de detergentes e sabão em pó e para fins industriais ou laboratoriais (HARWOOD, 1992).

Bactérias Gram-positivas são conhecidas por suas contribuições para a agricultura, área médica, biotecnologia de alimentos e para a produção de proteínas recombinantes. Entre elas, *Bacillus subtilis* se tornou um hospedeiro atrativo por várias razões: organismo não-patogênico e considerado GRAS (*generally regarded as safe*), ou seja, totalmente seguro para o homem e para os animais, assim como os insumos por eles produzidos, que são amplamente empregados em diversos processos industriais; capazes de secretar proteínas extracelulares funcionais no meio de cultura (atualmente cerca de 60% de enzimas comercialmente disponíveis são produzidas por *B. subtilis*); grande número de informações a respeito da transcrição, tradução, mecanismos de secreção, manipulação genética e fermentação em grande escala (PHAN et al., 2006).

Existem basicamente dois sistemas para clonagem e expressão de genes em *B. subtilis* sendo usados. O primeiro faz uso de plasmídeos que replicam de modo autônomo, e o outro permite a integração do cassete de expressão no cromossomo do microrganismo hospedeiro.

Os plasmídeos são importantes ferramentas utilizadas para estudar funções e expressões de proteínas bacterianas. Tentativas de usar plasmídeos para a expressão de proteínas recombinantes e promover a secreção destas no meio de cultura, freqüentemente, não tem obtido sucesso, devido à instabilidade destes vetores recombinantes (NGUYEN et al, 2005). A maioria dos plasmídeos disponíveis são derivados de plasmídeos naturais isolados de *Staphylococcus aureus* como os pC194, pUB110 e pE194. Quando estes plasmídeos replicam de maneira estável em *Bacillus*, a adição de DNA recombinante pode conferir instabilidade estrutural. A base molecular para instabilidade estrutural está relacionada com o modo de replicação. Estes plasmídeos replicam como círculos rolantes, o que resulta na formação de moléculas de fita simples sujeitas a eventos de recombinação intramolecular capazes de remover parcial ou totalmente seqüências heterólogas clonadas. (NGUYEN et al., 2005).

De acordo com Phan et al., (2006) existem dois obstáculos reduzindo o uso de *Bacillus subtilis* como organismo receptor para a expressão de proteínas heterólogas. São eles: produção de proteases extracelular que reconhecem e degradam proteínas heterólogas e vetores estáveis. O primeiro obstáculo tem sido resolvido através da construção de estirpes deficientes em protease, enquanto o segundo foi superado completamente pela introdução de plasmídeos usando o modo θ de replicação tal como as derivadas dos plasmídios pAM β 1 e pBS72 (TITOK et al., 2003).

Nguyen et al., (2005) Avaliaram uma série de vetores de expressão em estirpes de *Bacillus subtilis*. Estes vetores eram baseados no plasmídeo pMTLBS72 *E.coli-B.subtilis* recentemente descrito, que apresenta replicação circular θ , além do promotor constitutivo fraco P_{lepA} e três promotores controláveis: P_{gsiB} induzido por calor ou por etanol, P_{xyIA} e P_{spac} respondem respectivamente a adição de xilose e IPTG. A versatilidade desses vetores de expressão foi comprovada com o uso de um gene repórter e pelo aumento na produção da proteína HtpG. Os três vetores apresentaram completa estabilidade estrutural.

Phan et al. (2006) Construíram dois novos vetores para expressão intra e extra celular de proteínas recombinantes em *Bacillus subtilis*. Ambos os vetores usavam o promotor forte σ^A que antecede o operon groESL de *B. subtilis* ligado ao operador lac, permitindo sua indução pela adição de IPTG. Para obter a secreção de proteínas recombinantes, a região do gene Amy Q, que codifica para α -amilase de *Bacillus amyloliquefasciens* foi ligada ao promotor groE, o que resultou em alta produção de α -amilase.

A instabilidade de plasmídeos com origem de replicação autônoma levou ao desenvolvimento de vetores que integram no cromossomo de *B. subtilis*. Dois sistemas são utilizados freqüentemente: O primeiro promove a integração cromossomal a partir de um *crossover* simples, o que leva a integração de todo vetor (integração por adição), enquanto o segundo envolve dois eventos simultâneos, *crossover* duplo entre as regiões homólogas causando a deleção da região homóloga no organismo receptor (integração por substituição). Portanto,

no primeiro caso o vetor é integrado totalmente e no duplo *crossover* ocorre uma troca de seqüências entre as duas partes intercaladas pelas regiões de homologia.

Diversos vetores de integrativos já foram desenvolvidos e são capazes de produzir proteínas heterólogas sob controle de diferentes promotores como *P_{xylA}* (KIM; MOGK; SCHUMANN, 1996) induzido pela adição de xilose, e *P_{spac}* (HARTL, et al., 2001) induzido por IPTG.

A grande maioria dos plasmídeos integrativos tais como pJH101 (FERRARI et al., 1983) e pHV60 (MICHEL; NIAUDET; EHRLICH, 1983) não se replica em *B. subtilis* mas possui sequencias homólogas de genes não essenciais como *amyE* (SHIMOTSU & HENNER, 1986), *thrC* (GUÉROUT-FLEURY; FRANDSE; STRAGIER, 1996) e *lacA* (HARTL et al., 2001) ladeando a região promotora e a região múltipla de clonagem, além da presença de um gene que confere resistência a antibióticos. A linhagem recipiente deve ter o gene essencial interrompido por uma marca de resistência não presente no plasmídeo, para possibilitar a seleção da integração no cromossomo, visto que pode ocorrer apenas uma recombinação, onde a bactéria recombinante será resistente aos dois antibióticos ou a dupla recombinação, o que é desejado, onde a linhagem recipiente perde a marca de resistência anterior e adquire aquela presente no plasmídeo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismos, plasmídeos e meios de cultura

4.1.1 Microrganismos

As cepas de bactérias utilizadas durante a elaboração deste trabalho estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Cepas utilizadas neste trabalho

Estirpe	Genótipo	Referência
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332	Cepa selvagem	Cooper et al., 1981
<i>Bacillus subtilis</i> LB5a	Cepa selvagem	Nitschke et al, 2003
<i>Bacillus subtilis</i> Pgrac-Surf	Tet ^R /lacIPgracSrfA	Este trabalho
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44D/lacU169</i> (ϕ 80lacZDM15) <i>hsdR17</i> <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>hsdS gal</i> (λ clts857 <i>ind1</i> Sam7 <i>nin5</i> <i>lacUV5-T7 gene 1</i>)	Studier & Moffatt, 1986

4.1.2 Plasmídeos

Os plasmídeos usados para elaboração deste trabalho estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Plasmídeos utilizados neste trabalho

Plasmídeo	Referência
pHT01	Nguyen et al., 2005
pDG1515	Guérout-Fleury et al., 1995
pQE-30	Qiagen
pHCMC05	Nguyen et al., 2005
pET-28a	Novagen
pETSurf	Este trabalho

4.1.3 Meios de cultura para manutenção, seleção e fermentação

As bactérias foram crescidas em meio LB (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989), composto por 1% de peptona, 0,5% de extrato de levedura e 1% de cloreto de sódio. A preparação do meio sólido foi feita adicionando-se 2% de ágar bacteriológico. O meio LB agar foi autoclavado por 20 min a 115°C, e distribuído em placas de Petri descartáveis e estéreis.

O biossurfactante foi produzido em meio de fermentação, descrito por Chen et al., 2008, composto por 10 g de glicose, 10 g de peptona, 5 g de extrato de levedura, 5 g de NaC, 1,5 g de K_2HPO_4 , 1,5 g e de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ por litro em pH 7.0.

O meio Ágar Sangue, usado para determinação da atividade hemolítica do biossurfactante, foi preparado pela esterilização do meio de cultivo composto de 10 g de extrato de carne, 10 g de peptona, 5 g de NaCl, 15 g de agar por litro de água destilada, pH 7,0. Após o resfriamento, em torno de 45°C, foi adicionado sangue de carneiro desfibrinado, na proporção de 15% (v/v). O indutor IPTG foi adicionado na concentração de 0,5mM, quando necessário.

Quando necessário, utilizaram-se diferentes combinações dos antibióticos kanamicina, ampicilina, cloranfenicol e tetraciclina em meios seletivos.

Os antibióticos utilizados durante o trabalho e a concentração aplicada estão listados na Tabela 4.

Tabela 4. Antibióticos utilizados neste trabalho

Antibiótico	Concentração da solução estoque (mg/mL)	dissolvido	Concentração final
Ampicilina	50 mg/mL	H ₂ O	100 µg/mL
Kanamicina	50 mg/mL	H ₂ O	100 µg/mL
Tetraciclina	50 mg/mL	Etanol	20 µg/mL
Cloranfenicol	50 mg/mL	Etanol	100 µg/mL

4.2 Técnicas de manipulação do DNA

4.2.1 Amplificação de DNA por PCR

As reações de PCR contêm: 20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM de cada um dos quatro desoxiribonucleotídeos trifosfato, oligonucleotídeos específicos na concentração final de 0,5 mM; 20 ng de DNA *template* e 2,5 unidades de enzima *Taq* DNA Polimerase (Life Technologies) em um volume final de 50 µL. Foi utilizada a ciclagem de 2 min a 94°C, seguindo-se 25 ciclos de 1 min a 94°C, 2 min na temperatura de anelamento, 1 min à 68°C e 5 min à 68°C para extensão. Os oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR estão listados na Tabela 5.

Tabela 5. Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho

Oligonucleotídeo	Sítio	Sequência
DTM30	Xba I	5' CTA _g TCT AgA AgA CAA TCA gAT TTC TTT CgC TTg 3'
DTM31	Bam HI	5' CgC ggA TCC TgC TgC gTT CAA TCT TTT TTT ATT g 3'
DTM32	Hind III	5' CCC AAg CTT gAC AAT ATg gAA ATA ACT TTT TAC CCT TTA AC 3'
DTM33	Xho I	5' CCg CTC gAg Agg CAC CgA TTC AAA TTg TTT gTT C 3'
DTM34	Bam HI	5' CgC ggA TCC TTA gAT gTC gAg gAA AAg ACC gAA C 3'
DTM35	Sac I	5' C CTC gAg TTA ACg ATT Tag AAA TCC CTT TgA g 3'
DTM36	Sac I	5' C gAg CTC gAA AAg AAT gAT gTA AgC gTg AAA AAT TTT TTA TC 3'
DTM37	Hind III	5' CCC AAg CTT TT CCT TTA ATT ggg AAT TgT TAT C 3'
DTM38		5' ATg AAg ATT TAC ggA ATT TA 3'
DTM39		5' TTA TAA AAg CTC TTC gTA Cg 3'

4.2.2 Purificação de fragmentos de DNA e de produtos de PCR separados por eletroforese em gel de agarose

Os produtos de PCR foram purificados com o auxílio do kit *QIAquick PCR Purification* (Qiagen), onde o DNA foi ligado a uma membrana de sílica-gel e, após centrifugação a 18.000 g por 1 min, foram descartadas as impurezas. A coluna foi

então lavada com tampão contendo etanol e o DNA foi eluído em 10 mM Tris-HCl pH 8,0.

4.2.3 Digestão e ligação de DNA

As reações de digestão de DNA foram realizadas numa proporção de 1-2 mg de DNA por unidade de enzima de restrição em volumes de 30-50 μL , com tampão indicado para cada enzima fornecido pelo fabricante. As enzimas de restrição foram obtidas das empresas Invitrogen (Carlsbad, Califórnia), Promega (Madison, Wisconsin), New England (Ipswich, Massachusetts) e Fermentas (Burlington, Ontário).

Para clonar os produtos de PCR foram empregados o *TA Cloning Kit*, da Invitrogen (Carlsbad, Califórnia), e o *pGEM-T Vector System I*, da Promega (Madison, Wisconsin). As reações foram feitas seguindo as instruções do fabricante. As ligações foram incubadas a 16°C por 16 a 24 h. Todo o volume das reações de ligação foi utilizado para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α por choque térmico ou eletroporação.

4.2.4 Extração de plasmídeos

As culturas de 3-5 mL de LB foram centrifugadas e ressuspendidas em 100 μL da solução GET (Tris-HCl 25 mmol.L⁻¹; EDTA 10 mmol.L⁻¹; Glicose 50 mmol.L⁻¹; pH 8,0) e adicionadas de 200 μL de solução de lise alcalina (SDS 1% m/v; NaOH 0,2 mol. L⁻¹), preparada no momento. Foi homogeneizado por inversão do microtubo, mantido à temperatura ambiente por no máximo 5 min. Imediatamente foram adicionados 150 μL de acetato de amônio 7,5 mol.L⁻¹ ao lisado celular, o conteúdo do microtubo foi vigorosamente misturado por inversão e centrifugado a 16.000 g por 10 min. O sobrenadante obtido foi transferido para um novo microtubo (1,5 mL), ao qual foi adicionado 400 μL de isopropanol, e incubado a -20°C para precipitação do DNA. Após 30 min, no mínimo, a solução foi novamente centrifugada a 16.000xg e 4°C, por 10 min. O precipitado resultante foi lavado com

etanol 70% v/v gelado e seco em *SpeedVac Savant SC 110A* (Global Medical Instrumentation – Ramsey, Minnesota) por 5 min. O DNA foi ressuspendido em 50 μL de TE (Tris-HCl 10 mmol.L^{-1} ; EDTA 0,1 mmol.L^{-1} ; pH 8,0); no caso de um vetor de baixo número de cópias seriam apenas 30 μL . Os plasmídeos destinados ao seqüenciamento foram purificados com o sistema *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN – Valencia, Califórnia), seguindo as instruções do fornecedor.

Preparações em larga escala de DNA plasmideal foram feitas utilizando-se o sistema *Plasmid Midiprep Kit* fornecido pela empresa Qiagen. As células de culturas de 100 mL foram coletadas por centrifugação a 3.000 g por 15 min, ressuspendidas em 4 mL de tampão contendo 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA e 100 mg/mL RNase. Quatro mL de uma solução de lise (200 mM NaOH e 1% SDS) foram adicionados e a solução foi neutralizada com 4 mL de acetato de potássio 3 M pH 5,5. Após incubação no gelo por 15 min, a suspensão foi centrifugada a 4°C, por 45 min a 16.000 g. O sobrenadante foi aplicado em uma coluna previamente equilibrada com 4 mL de tampão contendo 750 mM NaCl; 50 mM MOPS pH 7,0; 15% isopropanol; 0,15% de Triton X100. A coluna foi lavada com 20 mL de 1 M NaCl; 50 mM MOPS pH 7,0 e 15% isopropanol. O DNA foi eluído em 5 mL de tampão composto por 1,25 M NaCl; 50 mM Tris- HCl pH 8,5; 15% isopropanol e posteriormente precipitado em 3,5 mL de isopropanol. A amostra foi centrifugada a 10.000 g por 30 min a 4°C. O sedimento contendo o DNA foi lavado com etanol gelado a 70%, seco e ressuspendido em TE.

4.2.5 Seqüenciamento de DNA

As reações do seqüenciamento foram realizadas em seqüenciador automático 3130xl *Genectic Analyzer*, gerenciado pelo programa *Foundation data Collection 3.0*, com o uso dos quatro dideoxinucleotídeos terminadores marcados por fluorescência (*Kit Big Dye 3.1*), de acordo com especificações do fabricante. O equipamento, o programa de gerenciamento e o kit com dideoxinucleotídeos terminadores foram obtidos da Applied Biosystems (Foster City, Califórnia).

4.2.6 PCR de colônia

Colônias isoladas foram ressuspensas em 20 μL de água deionizada estéril e aquecidas a 95°C por 3 min. A suspensão resultante foi utilizada como DNA molde na reação de PCR (25 μL de volume total). As concentrações dos componentes da mistura e os ciclos do termociclador seguiam as mesmas proporções estabelecidas em 4.2.1. Os produtos do PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose. Quando as bandas obtidas tinham tamanho compatível com o esperado para o DNA amplificado, os respectivos clones eram seqüenciados e/ou submetidos à análise de restrição.

4.3 Transformação de células de *E. coli*

4.3.1 Preparo de bactérias competentes para transformação de células por choque térmico

Células de *E. coli* DH5 α foram semeadas em meio LB-ágar e incubadas a 37°C por 16 h. Em seguida, uma colônia foi inoculada em 5,0 mL de meio PSI e incubada sob agitação de 200 rpm a 37°C por uma noite. Subseqüentemente, esta cultura foi inoculada em 200 mL de meio PSI e incubada sob as mesmas condições, até atingir densidade ótica de aproximadamente 0,6 à 600 nm ($\text{DO}_{600} = 0,6$). Em seguida a cultura foi transferida para frascos de centrifuga (previamente resfriados em gelo) e centrifugada a 2000xg, por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as bactérias ressuspensas gentilmente em 25 mL do tampão de transformação I (KOH 30 mmol.L^{-1} ; ácido acético 30 mmol.L^{-1} ; MgCl_2 50 mmol.L^{-1} ; CaCl_2 10 mmol.L^{-1} ; RuCl_2 100 mmol.L^{-1} ; glicerol 15% v/v; pH 5,8), estéril e gelado. A suspensão foi incubada por 15 min no gelo e depois centrifugada a 2000xg, por 15 min a 4°C. As bactérias foram ressuspensas em 8 mL do tampão de transformação II (MOPS 10 mmol.L^{-1} ; CaCl_2 75 mmol.L^{-1} ; RuCl_2 10 mmol.L^{-1} ; glicerol 15% v/v; pH 7,0), estéril e gelado. Alíquotas de 150 μL de

suspensão celular foram transferidos para microtubos de 0,5 mL, e estes foram congelados a -80°C para serem posteriormente utilizados nas transformações.

4.3.2 Transformação de bactérias por choque térmico

Para cada transformação, adicionaram-se 70 µL de célula competente ao microtubo (1,5 mL), onde foi realizada a reação de ligação; a mistura resultante foi incubada em gelo por 30 min. Posteriormente, o microtubo foi incubado a 42°C por 1min30s e re-incubado no gelo por 1 min. Adicionou-se 1 mL de meio LB líquido às células, que foram imediatamente incubadas a 37°C, sob agitação de 200 rpm, por 1 h. A cultura resultante foi centrifugada a 1500xg por 10 min à temperatura ambiente. Após essa etapa, 900 µL do sobrenadante foram descartados e o precipitado plaqueado em meio LB-ágar, com adição de antibiótico quando necessário. A placa foi incubada a 37°C por aproximadamente 16h.

4.3.3 Preparo de bactérias competentes para transformação por eletroporação.

As bactérias foram preparadas a partir de uma cultura líquida de 1,0 L de meio LB, inoculada com 10 mL de um pré-inóculo fresco. Este foi incubado por 16 h a 37°C, sob agitação de 200 rpm. A cultura foi submetida às mesmas condições de crescimento do pré-inóculo até que atingisse DO600 de 0,6. Após o período de crescimento, a cultura foi resfriada em banho de gelo durante 15 a 30 min e centrifugada a 1500 g, por 10 min a 4°C, em frasco de centrifuga estéril. O sobrenadante foi descartado, as células sedimentadas foram ressuspensas em 1,0 L de água deionizada, estéril, gelada e centrifugadas novamente, nas mesmas condições descritas anteriormente. As células foram recuperadas e lavadas com glicerol por duas vezes. Na primeira lavagem, as bactérias foram ressuspensas em 20 mL de glicerol 10% v/v gelado e centrifugadas nas mesmas condições anteriores. Na segunda, foram ressuspensas em 2 a 3 mL de glicerol 10% v/v gelado. Esta suspensão de células foi dividida em alíquotas de 50 µL em

microtubos de 0,5 mL, em banho de gelo, e estocadas a -80°C. Todas as etapas desse protocolo foram realizadas em ambiente estéril.

4.3.4 Transformação por eletroporação

Esse procedimento demanda o uso de equipamentos especiais, um eletroporador e cubetas de metal (*Gene Pulser Xcell*, da Bio-Rad – Hercules, Califórnia). As cubetas foram previamente preenchidas com etanol 70% v/v por 5 min. Depois, o etanol foi retirado em capela de fluxo laminar, onde as cubetas foram deixadas para secar. Todo o procedimento a partir de então foi realizado em capela de fluxo laminar. Posteriormente, as cubetas foram colocadas em banho de gelo até resfriar. De modo semelhante, a alíquota de células competentes foi retirada do estoque a -80°C e incubada em banho de gelo, por 1 min. Rapidamente, 40 µL de suspensão de células foram misturados a 0,3 – 2,0 µL de DNA, de acordo com a concentração do vetor, em microtubo estéril resfriado. A mistura de DNA e células foi transferida para a cubeta, com cuidado para evitar a formação de bolhas, e a cubeta carregada foi levada em banho de gelo até o eletroporador, onde foi acoplada. O aparelho foi ajustado para o protocolo de amostras bacterianas, com um pulso de 2500 V. Dado o pulso, o material foi levado em banho de gelo à capela de fluxo laminar, onde foi misturado a 1,0 ml de meio LB, em microtubo estéril. Essa cultura foi incubada a 37°C e 200 rpm por, no mínimo, 1 h. Após o crescimento, 100 – 200 µL de cultura foram plaqueados em LB-ágar seletivo com auxílio de uma alça de Drigalski. A placa foi incubada a 37°C por 16h.

4.4 Preparo e transformação de células competentes de *Bacillus subtilis* por competência natural

A transformação de *B. subtilis* foi realizada por competência natural seguindo método proposto por Klein; Kaletta; Schnell, (1992), com algumas modificações.

Células competentes foram preparadas da seguinte maneira: Para o pré-inóculo células de *Bacillus subtilis* foram cultivadas por aproximadamente 12 horas em meio HS a 37°C e 250rpm. No dia seguinte foi feito um inóculo em meio HS (1:100) e incubado a 37°C até atingir o início da fase estacionária. Para cada 10 mL de cultura foi adicionado 1 mL de glicerol estéril. O inóculo foi então mantido em banho de gelo por um período de 15 minutos e estocado em tubos eppendorf a uma temperatura de – 80°C.

Para transformar células de *B. subtilis*: 1mL de suspensão de células competentes foi descongelada a 37°C, adicionado 10 mL de meio LS e incubado a 30°C por 2 horas. Após o período de incubação para cada 1 mL de cultura foi adicionado 10µL de EGTA (0,1 M pH7,2). O plasmídeo foi adicionado na forma linearizada na concentração de 30ng e incubou-se por mais duas horas a 37°C. O inóculo foi centrifugado (4000rpm por 10 minutos) e plaqueado em meio seletivo.

4.5 Análise de DNA por eletroforese em gel de agarose

Todas as análises de DNA foram feitas por eletroforese em gel de agarose.

Foram utilizados géis de agarose em TAE (tampão Tris-HCl 40 mmol.L-1, ácido acético 20 mmol.L-1, EDTA 1,0 mmol.L-1 pH 8,0), em concentração de 0,8 a 2% m/v, com brometo de etídeo 0,005% v/v. Géis de agarose 0,8% foram usados para fragmentos acima e 2% para fragmentos abaixo de 500 pb. As amostras de DNA foram preparadas em tampão de amostra (Ficoll tipo 400 2,5%, azul de bromofenol 0,017% e *Xylene Cyanol* 0,017%). O padrão de massa molecular utilizado foi o *1kb DNA Extension Ladder*, obtido da Invitrogen (Carlsbad, Califórnia). A voltagem usada na eletroforese era constante e de 2-3 V por centímetro de gel. O sistema de foto-documentação EDAS (*Electrophoresis Documentation and Analysis System*), da Kodak (Rochester, Nova Iorque), foi utilizado para fotografia e análise de imagens.

4.6 Análise por southern blot

A análise por Southern blot foi realizada para confirmar a ocorrência do duplo crossing over e recombinação homóloga da região promotora do operon *srfA*.

Para esta análise, 10 µg de DNA genômico foram digeridos com as enzimas de restrição que flanqueiam a região correspondente ao cassete de integração, *Xba*I e *Xho*I (Invitrogen). As amostras foram separadas em gel de agarose 1% em tampão 1X TAE e transferidas para uma membrana de Nylon positivamente carregada (Hybond XL, Amersham) por capilaridade, com uma solução de NaOH 0,4 M. A pré-hibridização, a hibridização e a lavagem da membrana foram feitas como descrito por Romano (1998).

Após as lavagens, a membrana foi exposta ao filme radiográfico (Kodak T-Mat G/RA) a – 80°C. Foi utilizado como sonda o oligonucleotídeo DTM34 (primer *forward* usado para amplificar o gene que confere resistência a tetraciclina, localizado na região de integração). A extremidade 5' do oligo foi fosforilada com uma polinucleotídeo quinase (PNK) utilizando [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP como substrato. Depois a sonda marcada foi purificada em coluna contendo resina Sephadex-G50 (Sigma) de acordo com as instruções do fabricante.

4.7 SDS-PAGE (Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio)

Foram utilizados mini-géis com uma fase de empilhamento de 5% e uma de separação de 8, 10, 12 ou 15% de poliacrilamida. Na eletroforese foi utilizado o tampão de eletrodo (Tris 25 mmol.L⁻¹; glicina 250 mmol.L⁻¹ e SDS 0,1%) e a voltagem fixada em 120 V até o final da corrida. Em seguida, os géis eram corados.

4.8 Identificação de cepas de *Bacillus subtilis* produtoras de surfactina baseado em um método de PCR

Foi realizado um *screening* de bactérias com potencial de produção do biossurfactante surfactina entre as cepas pertencentes a coleção do laboratório de Bioaromas – FEA/UNICAMP. A seleção foi feita utilizando uma sequência específica de DNA como alvo para detectar as cepas produtoras de surfactina.

O fragmento de 675 pares de bases correspondente ao gene *sfp* de *Bacillus subtilis* (GenBank) na posição 167-841, foi amplificado usando os oligonucleotídeos DTM38 (*sfp forward*) e DTM39 (*sfp reverso*), desenhados a partir da sequência do genoma completo do organismo *Bacillus subtilis* depositado no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information).

4.9 Estratégia de clonagem

A modificação na região promotora do operon *srfA* de *Bacillus subtilis* foi dividida em 4 etapas:

1º) O primeiro passo foi a construção de um cassete (P_{grac}-Tet) com o promotor *Pgrac* e regiões homólogas ao DNA de *B. subtilis* para que ocorresse a integração no DNA genômico por um duplo *crossing over* (Figura 1).

2º) Na segunda etapa foi feita a transferência do cassete para o vetor de expressão pET-28a, que passou a ser chamado vetor de integração pETsurf.

3º) O próximo passo foi transformar células de *E. coli DH5α* competentes, com o vetor pETsurf, e confirmar a sequência dos fragmentos inseridos por seqüenciamento automático do DNA.

4º) Após confirmação por seqüenciamento o vetor de integração foi usado na forma linearizada para transformar células de *B. subtilis* competentes.

A Figura 2 apresenta o modelo de recombinação homóloga ocorrida no DNA genômico das cepas de *Bacillus subtilis*.

4.9.1 Construção do cassete de integração

O cassete Pgrac-Tet foi construído a partir de seqüências homólogas ao DNA genômico de *Bacillus subtilis* (Figura 4). Sendo RHFront os 700 pb que antecedem o início da região promotora do operon *srfA*, obtidas por PCR do DNA genômico, com a ajuda dos oligonucleotídeos DTM30 (5' CTA_g TCT AgA AgA CAA TCA gAT TTC TTT CgC TTg 3') e DTM31 (5' CgC ggA TCC TgC TgC gTT CAA TCT TTT TTT ATT g 3') e RHBack a seqüência inicial do operon, amplificada por PCR, usando os oligonucleotídeos DTM32 (5' CCC AAg CTT gAC AAT ATg gAA ATA ACT TTT TAC CCT TTA AC 3') e DTM33 (5' CCg CTC gAg Agg CAC CgA TTC AAA TTg TTT gTT C 3'). Além das regiões de recombinação o cassete é formado pelo gene que confere resistência ao antibiótico tetraciclina, amplificado por PCR a partir do vetor para expressão em *Bacillus* pDG1515 (Guérout-Fleury *et al.*, 1995) com o uso dos oligonucleotídeos DTM34 (5' CgC ggA TCC TTA gAT gTC gAg gAA AAg ACC gAA C 3') e DTM35 (5' C CTC gAg TTA ACg ATT Tag AAA TCC CTT TgA g 3'); gene *lacI*, responsável pela síntese do repressor *lac*; promotor *Pgrac*, amplificado por PCR a partir do vetor pHT01 (Schumann ET AL., 2006), com os oligonucleotídeos DTM36 (5' C gAg CTC gAA AAg AAT gAT gTA AgC gTg AAA AAT TTT TTA TC 3') e DTM37 (5' CCC AAg CTT TT CCT TTA ATT ggg AAT TgT TAT C 3'). O cassete foi introduzido no vetor pET-28a (Figura 5) entre os sítos de restrição das enzimas *xbaI* e *xhoI*.

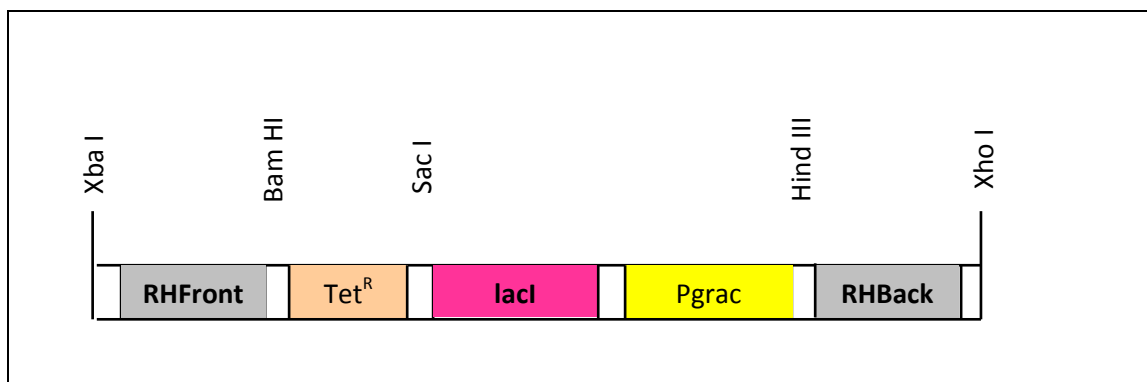


Figura 4. Esquema do cassete para integração no genoma de *B. subtilis*

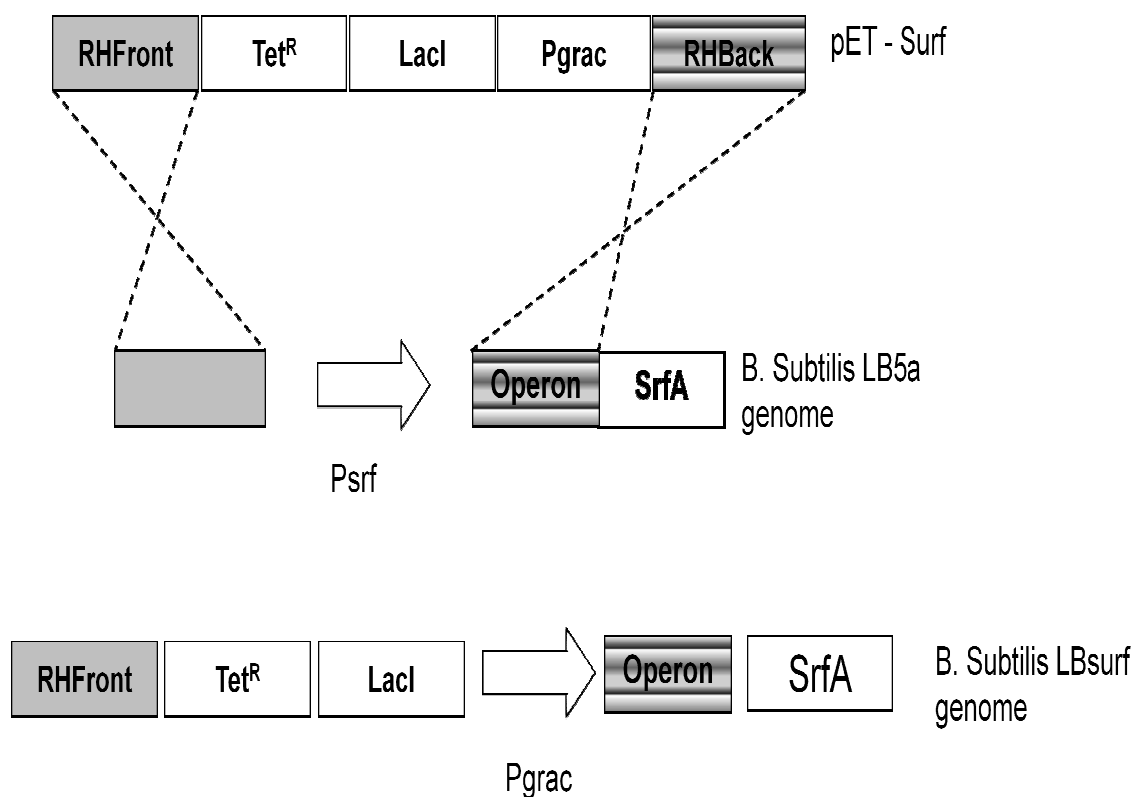


Figura 5. Construção do cassete de integração e inserção por recombinação homóloga no genoma de *B. subtilis*

4.9.1 Confirmação da recombinação homóloga

Para confirmar a inserção da nova região no genoma de *B. subtilis*, foi extraído o DNA de alguns clones selecionados na placa com antibiótico e realizada uma PCR de DNA genômico com os oligonucleotídeos DTM30 e DTM33, capazes de amplificar toda a sequência do cassete. O vetor de integração (pETsurf) foi usado como controle positivo.

A ocorrência do duplo *crossing over* e recombinação homóloga da região promotora do operon *srfA* também foi confirmada por Southern blotting, usando como sonda o primer DTM34.

4.10 Produção de surfactina e indução com IPTG (Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo)

Colônias isoladas foram inoculadas em 5 mL de meio LB, contendo 20 µg/mL de tetraciclina, quando se tratava de cepas modificadas geneticamente, estas foram deixadas crescer a 37°C, 250 rpm, por aproximadamente 12 horas. O volume de 5 mL do pré-inóculo foi transferido para um Erlenmeyer contendo 500 mL do meio de fermentação e incubados a 37°C sob agitação até atingir uma densidade ótica a 600 nm de 0,6 a 0,8. Foi adicionado um volume de IPTG para atingir a concentração final de 0,5mM. As culturas foram incubadas a 30°C sob agitação por até 48 horas.

4.11 Extração, purificação e caracterização do biossurfactante produzido

A extração do biossurfactante foi realizada após cultivo em meio de fermentação (Chen et al., 2008) incubado a 37°C sob agitação até atingir a densidade ótica a 600 nm de 0,6 a 0,8. Ao alcançar o crescimento celular esperado adicionou-se IPTG de modo a atingir a concentração final de 0,5mM. As culturas foram incubadas a 30°C e 250 rpm por mais 36 horas.

4.11.1 Extração:

A extração foi realizada por precipitação ácida, ajustou-se o pH do meio de cultivo livre de células para 2,0 com HCl 6N e o mesmo foi mantido a 4°C por aproximadamente 12 horas. O precipitado foi coletado por centrifugação a 12.000 g por 20 minutos e extraído com metanol. As amostras foram secas em liofilizador, dissolvidas em tampão PBS pH 7.4 e filtradas em filtro 0,22 µm.

4.11.2 Purificação:

Os lipopeptídeos foram separados por um sistema de cromatografia de fase reversa em HPLC.

O extrato bruto foi aplicado em uma coluna Sephasil Peptide C18 (5 μ m 4,6x100mm). A separação cromatográfica foi realizada utilizando acetonitrila: 0.1% de TFA (v/v) (fase A) e água: 0.1% de TFA (v/v) (fase B). Os lipopeptídeos foram eluídos em sistema de gradiente linear do solvente A de 30% a 80%, com uma vazão de 1mL/min. As amostras eluídas foram detectadas a 214 nm. Os picos cromatográficos foram comparados com o tempo de retenção do padrão de surfactina comercial (S-3523, Sigma) com 99,9% de pureza.

4.11.3 Espectrometria de massas:

Após purificação em HPLC as amostras de lipopeptídeos, obtidos a partir das cepas selvagens, cepa modificada geneticamente e padrão de surfactina comercial (S-3523, Sigma) foram analisadas no espectrômetro de massa Q-Tof *Ultima* (Waters Corporation – Milford, Massachusetts) pelo método de ionização ESI (*electrospray ionization*), num único tempo de voo (MS).

As condições para ESI no modo positivo foram as seguintes: gás de dessolvatação (nitrogênio) foi aquecido a 150°C; o capilar foi mantido a um potencial de 3.5 kV e a voltagem do cone foi de 25 kV. A fragmentação do peptídeo (MS/MS) foi adquirida selecionando-se o íon com a m/z alvo usando o analisador de massas quadrupolo seguido de 20 eV, dissociação de colisão induzida usando argônio na célula de colisão do quadrupolo e análise de massas pelo TOF. Os extratos foram dissolvidos em uma mistura de metanol:água (1:1 v/v). As amostras foram introduzidas na fonte a 5 μ L/min com uma seringa.

4.12 Avaliação da atividade do biossurfactante

4.12.1 Atividade hemolítica

Para verificar a atividade hemolítica dos compostos produzidos por *Bacillus subtilis*, foi utilizado o método de difusão em Agar. Os microrganismos foram inoculados, com palitos estéreis, sobre a superfície do meio Agar sangue. O antibiótico tetraciclina e o indutor IPTG foram adicionados, quando necessário, nas concentrações de 20µg/ml e 0,5mM respectivamente. As placas foram incubadas a 37°C por 72 horas e avaliadas através da leitura dos halos de hemólise.

4.12.2 Avaliação da tensão superficial

A medida da tensão superficial foi realizada em tensiômetro Krüss Processor Tensiometer modelo K12. Foram utilizados 10 mL de meio de cultivo, livre de células, em diferentes períodos de incubação. As análises foram realizadas pelo método de placa, utilizando uma placa de platina-irídio com perímetro molhado de 40,0 mm, comprimento de 19,9 mm e espessura de 0,10 mm, denominada placa de Wilhelmy.

4.12.3 Concentração do biossurfactante bruto

A extração foi realizada por precipitação ácida, ajustou-se o pH do meio de cultivo livre de células para 2,0 com HCl 6N e o mesmo foi mantido a 4°C por aproximadamente 12 horas. O precipitado foi coletado por centrifugação a 12.000 g por 20 minutos e extraído com metanol. As amostras foram secas em liofilizador.

As amostras semi-purificadas e secas durante este processo, foram consideradas surfactina bruta e as massas secas obtidas foram pesadas para avaliar o rendimento na produção do biossurfactante. Calculando-se posteriormente a concentração (m/v).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para facilitar o acompanhamento, os resultados foram divididos em duas partes diferentes.

Parte I: Engenharia genética

Troca do promotor *Psrf*, do operon *srfA* de *Bacillus subtilis* LB5a, pelo promotor *Pgrac*, regulado pelo indutor IPTG

Parte II: Produção e caracterização do biossurfactante

Parte I: Engenharia genética

Troca do promotor *Psrf*, do operon *srfA* de *Bacillus subtilis* LB5a, pelo promotor *Pgrac*, regulado pelo indutor IPTG

5.1 Screening de cepas de *bacillus subtilis* produtoras de surfactina

O primeiro passo na etapa de modificação genética da cepa de *Bacillus subtilis* selvagem LB5a, com o objetivo de aumentar a produção do lipopeptídeo surfactina, foi a escolha de uma bactéria com potencial para produção desta molécula.

Foi realizado um *screening*, para selecionar um microrganismo que apresentasse características que viabilizassem a produção do biossurfactante estudado, entre as cepas de *Bacillus subtilis*, isoladas a partir de resíduo gerado durante o processamento da mandioca (manipueira), as quais fazem parte da coleção de culturas do laboratório de Bioaromas da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP.

Por considerar os métodos clássicos usados na identificação de microrganismos capazes de produzir surfactina trabalhosos e demorados, sendo inclusive algumas vezes inconclusivos (Hsieh et al., 2004) optamos por utilizar sequências de DNA específicas como alvo para a detecção genética.

De acordo com Seydlova & Svobodova (2008) o gene *sfp* é o segundo gene essencial para a produção microbológica de surfactina, situado cerca de 4 kb abaixo do operon *srfA*, codifica uma enzima de aproximadamente 224 aminoácidos que pertence a família das 4'- fosfopanteteinases, responsável pela modificação pós-traducional das peptídeos sintetases, envolvidas na produção da surfactina, da forma inativa para ativa.

Sabendo que o gene *sfp* é exigido para a síntese de surfactina, e que apenas as cepas que o contém em seu DNA genômico seriam capazes de produzir o

biossurfactante funcional, escolhemos esta região como alvo de detecção genética e identificar as cepas com potencial de produção da surfactina.

As cepas isoladas de *B. subtilis* da coleção do laboratório de bioaromas foram submetidas a PCR de colônia com os primers específicos para região *sfp*. Seguindo protocolo proposto em Materiais e métodos (Figura 6).

A Figura 6 ilustra que entre as dez cepas da coleção que foram avaliadas, apenas a cepa LB5a, já citada como produtora de surfactina (Nitschke et al, 2004), apresentou a banda de amplificação equivalente ao gene *sfp*, de aproximadamente 675 pares de base (Hsieh et al., 2004). Fato este que nos levou a escolher esta cepa para sofrer modificação genética, com o intuito de criar um sistema de expressão mais produtivo e regulado deste lipopeptídeo. As demais cepas não mostraram indícios do gene *sfp*, sendo então eliminadas do estudo.

Em estudos para avaliar a importância da presença do gene *sfp* completo no genoma de cepas de *Bacillus*, Lee et al., (2005) inseriu, por recombinação homóloga, o gene *sfp* no cromossomo da cepa de *Bacillus subtilis* 168, que é comprovadamente uma bactéria não produtora do lipopeptídeo surfactina, conseguindo células transformadas produtoras de surfactina. As novas cepas modificadas, com a presença do gene *sfp* no genoma, apresentaram o mesmo potencial de produção, capacidade de redução da tensão superficial e atividade hemolítica da cepa de *B. subtilis* C9, capaz de sintetizar o biossurfactante, enquanto a cepa 168, não modificada, não apresentou produção de surfactina e nenhuma redução significativa da tensão superficial.

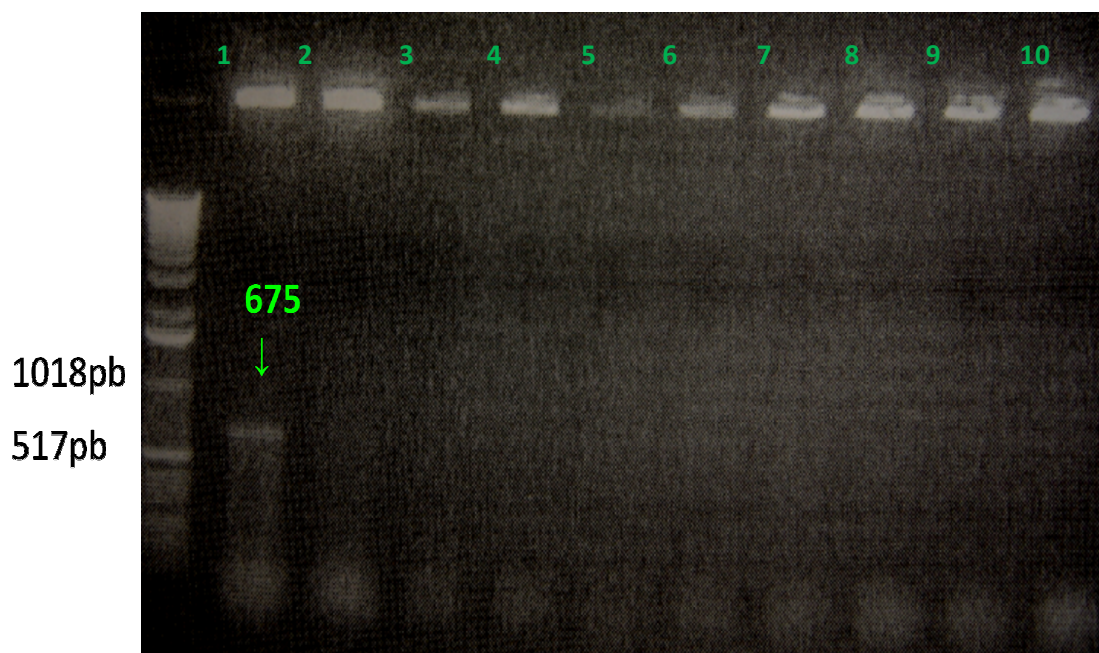


Figura 6. PCR de colônia para detecção do gene *sfp*. Amplificação do gene *sfp*, utilizando os primers específicos para região, a partir de dez cepas de *Bacillus subtilis* da coleção de culturas do Laboratório de Bioaromas DCA/FEA/UNICAMP. Gel de agarose 0,8%.

5.2 Construção do vetor de integração pETSurf

As diferentes etapas para a construção do novo vetor de integração por recombinação homóloga foram realizadas com sucesso.

A primeira etapa na criação do novo vetor foi a construção de um cassete para integração no DNA genômico de *Bacillus subtilis* LB5a (Figura 7). Todos os fragmentos constituintes deste cassete foram amplificados por PCR, nas condições descritas em materiais e métodos, e clonados em vetor de clonagem comercial (pGEM-T vector system, da Promega).

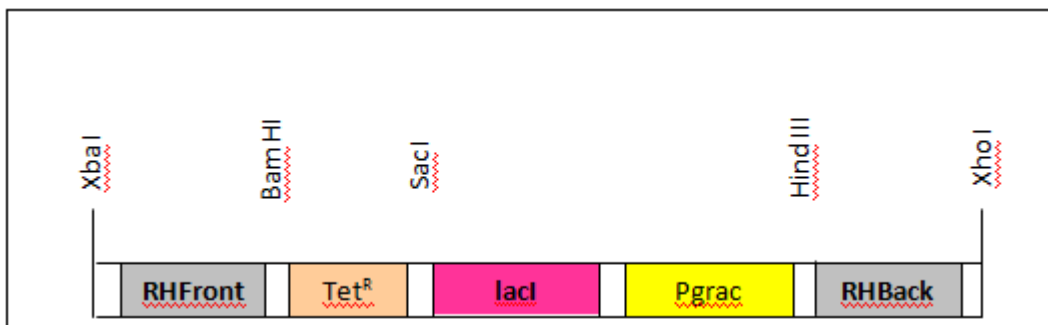


Figura 7. Esquema do cassete para integração no genoma de *B. subtilis* LB5a

5.3 Desenho dos primers para amplificação das sequências RHFront e RHBack

Para o desenho dos iniciadores que seriam utilizados na amplificação das sequências homólogas ao DNA de *B. subtilis* LB5a, foi feita previamente uma análise detalhada da região correspondente ao operon *srfA*. Optou-se pela seleção dos 700 pares de base que antecedem o início da região promotora (*Psrf*), região que passamos a chamar RHFront e os 700 pares de bases que fazem parte da sequência inicial do operon, aqui citada como RHBack. Os *primers* utilizados para isolar os fragmentos RHFront e RHBack foram desenhados a partir da sequência do genoma completo do organismo *Bacillus subtilis* depositado no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), sob o número de entrada Z99105.

Segundo Yan et al (2008) o número mínimo de pares de bases com total homologia ao DNA genômico de *Bacillus subtilis*, para que ocorra uma integração linear de DNA por um evento de *crossover* duplo, é de aproximadamente 500 pares de bases. Enquanto grande número de autores trabalha com vetores de integração construídos com região homóloga de 700 a 1000 pares de bases (NGUYEN et al., 2005; LEE et al., 2005; TSUGE & ITAYA, 2001).

5.4 Amplificação dos fragmentos e genes para construção do cassete

O DNA cromossomal da linhagem LB5a de *Bacillus subtilis* (Figura 8A) e os pares de iniciadores RHFront e RHback (forward e reverso) foram utilizados, para amplificação por PCR do fragmentos homólogos que iriam flanquear o cassete de integração do vetor pET-Surf, responsáveis pela substituição da região promotora original pela nova região *Pgrac*. A análise em gel de agarose mostrou bandas de aproximadamente 700 pares de bases, para ambos os fragmentos, área anterior ao operon designada RHFront (1) e a sequência inicial do operon RHback (2), quando comparadas ao padrão de DNA utilizado. Concluindo que as bandas de amplificação obtidas foram correspondentes a área de amplificação para qual cada um dos *primers* iniciadores foram sintetizados (Figura 8B).

O produto de ambas as amplificações por PCR foram inseridos no vetor de clonagem pGEM-T da Promega (separadamente). Após transformação bacteriana, os clones transformados foram submetidos a procedimentos para extração de DNA plasmidial.

O DNA plasmidial dos clones derivados a partir da inserção das regiões de homologia ao DNA genômico de *B.subtilis* foram caracterizados através de digestões com as enzimas de restrição apropriadas. As clivagens foram realizadas com as enzimas que flanqueava cada fragmento. RHFront foi digerido com *XbaI* e *BamHI* e *RHBack* com *HindIII* e *XhoI*. Os clones que apresentaram fragmento liberado compatível com o esperado foram enviados para o seqüenciamento, o qual confirmou que estes continham seqüências idênticas a do banco de dados do NCBI sob o número de entrada Z99105.

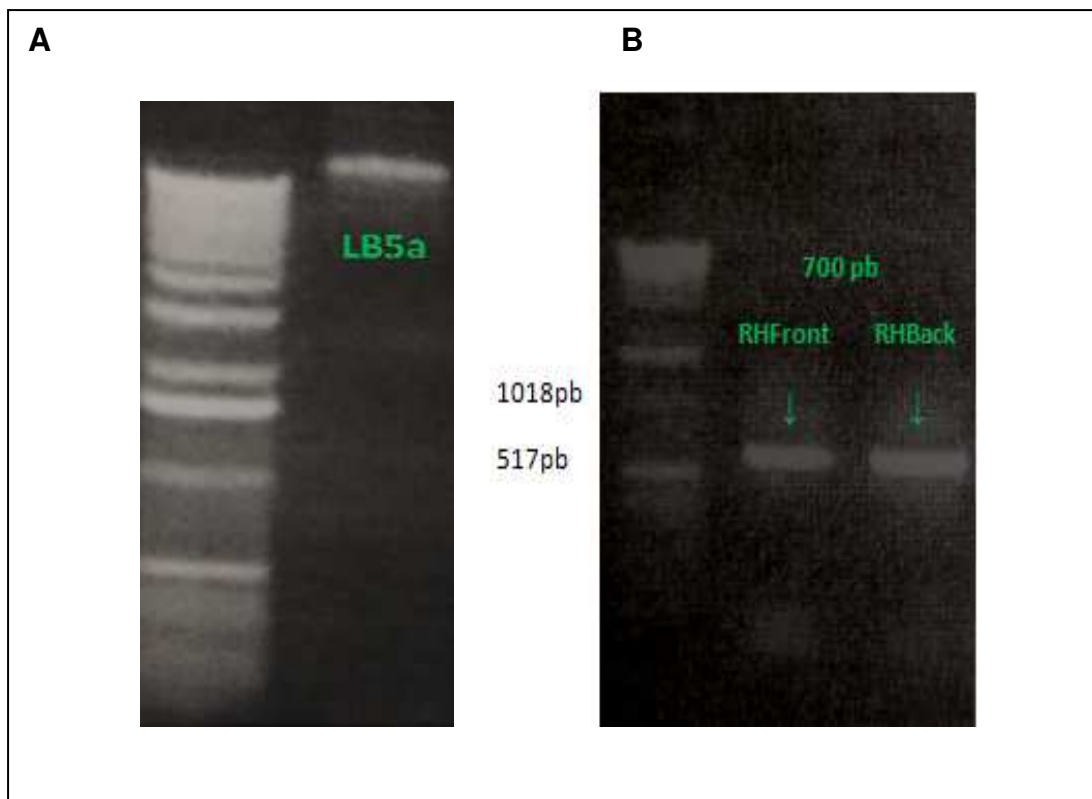


Figura 8. Amplificação dos fragmentos RHFront e RHBack. **A)** Amostra de DNA genômico extraído da cepa de *Bacillus subtilis* LB5a. **B)** Fragmentos RHFront e RHBack amplificados. Gel de agarose 0,8%.

A região que continha o gene *lacI* e o promotor *Pgrac* foi amplificada a partir do vetor pHT01 (Nguyen et al., 2006). O promotor *Pgrac* é constituído a partir do forte promotor que antecede o operon *groE* de *Bacillus subtilis* e o operador *lac* de *Escherichia coli*. Este sistema de expressão é baseado no modelo do operon *lac* de *E.coli*, o qual é controlado negativamente pelo repressor *lac*, sendo a atividade da proteína repressora modulada pela adição da molécula de IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo). Portanto a nova região promotora escolhida para substituir o promotor *Psrf*, além de ser constituída por um forte promotor está acoplada a um sistema que nos permite a indução dos genes que compõem o operon responsável pela síntese de surfactina.

De acordo com a Figura 9 o fragmento de aproximadamente 1600 pares de bases, constituído pelo promotor *pGrac* e o gene responsável pela síntese do repressor (*lacI*), foi amplificado com sucesso.

Os clones derivados deste fragmento sofreram análise de restrição com as enzimas *SacI* e *HindIII* e foram enviados para seqüenciamento. O alinhamento foi feito com a sequência contida no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). A identidade das sequências foi de 100%.

Após a introdução de DNA recombinado nas células da bactéria *Bacillus subtilis*, a seleção de recombinantes é um passo essencial em Engenharia Genética, uma vez que, entre as colônias originadas a partir de células transformadas, é necessário escolher aquelas onde o processo de clonagem de genes se deu com sucesso. Ou seja, deve-se selecionar as colônias hospedeiras que contenham o DNA recombinado (rDNA) construído em laboratório e constituído pelo vetor de clonagem com fragmento de interesse inserido.

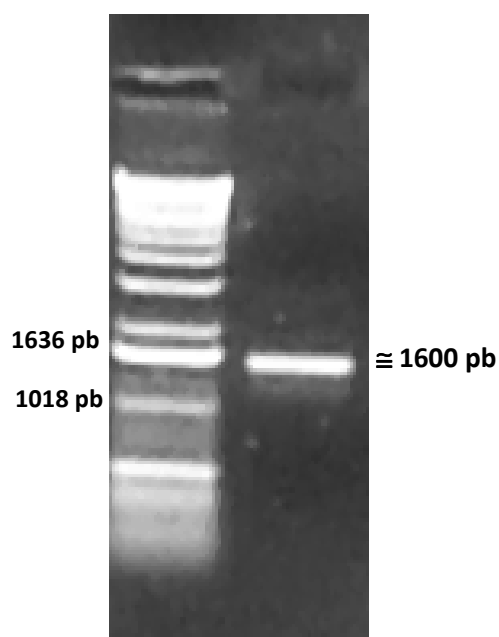


Figura 9. Amplificação dos fragmentos *lacI* e promotor *Pgrac*. Gel de agarose 0,8%.

O processo de seleção pode ser feito, de forma direta, com base no ganho de resistência a um antibiótico, caso em que a marca de seleção do vetor de clonagem, é um gene que confere resistência a esse antibiótico.

A resistência ao antibiótico tetraciclina foi escolhida como marca genética para seleção das cepas de *Bacillus subtilis* modificadas, ou seja, as que tiveram o cassete de integração inserido em seu DNA genômico de forma eficiente. O gene que confere resistência ao antibiótico tetraciclina (tet) foi amplificado a partir do vetor de *Bacillus subtilis* pDG1515 (*Bacillus* Genetic Stock Center). De acordo com a Figura 10, o gene de aproximadamente 1700 pares de bases foi amplificado com sucesso, o que também foi confirmado durante o sequenciamento.

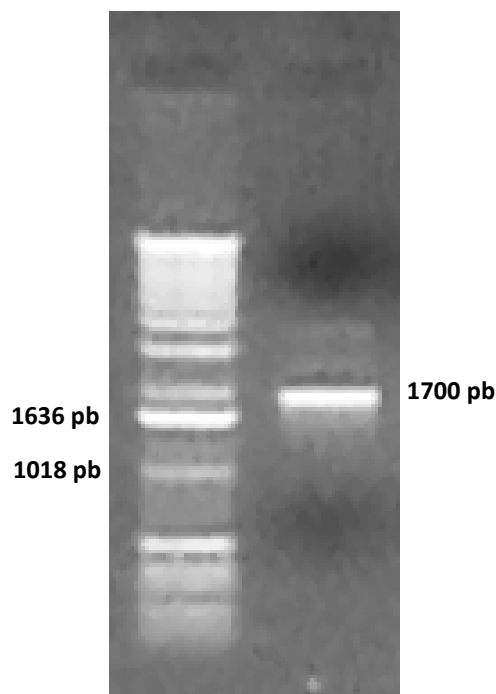


Figura 10. Amplificação do gene que confere resistência ao antibiótico tetraciclina (tet). Gel de agarose 0,8%.

5.5 Inserção do cassete de integração no vetor pET-28a

O vetor pET-28a foi escolhido como base para as construções de montagem do vetor pET-Surf. Este plasmídeo apresenta um amplo repertório de sítios que facilitam as etapas a seguir.

Para obtenção dos fragmentos que seriam subclonados no vetor pET-28a, os vetores resultantes das ligações no vetor de clonagem pGEM-T (Promega) com os fragmentos constituintes do cassete de integração, foram digeridos com as enzimas que os flanqueavam. Os fragmentos resultantes das clivagens enzimáticas foram extraídos do gel e purificados.

O cassete foi introduzido no vetor pET28a em 3 fases, de acordo com a Figura 11.

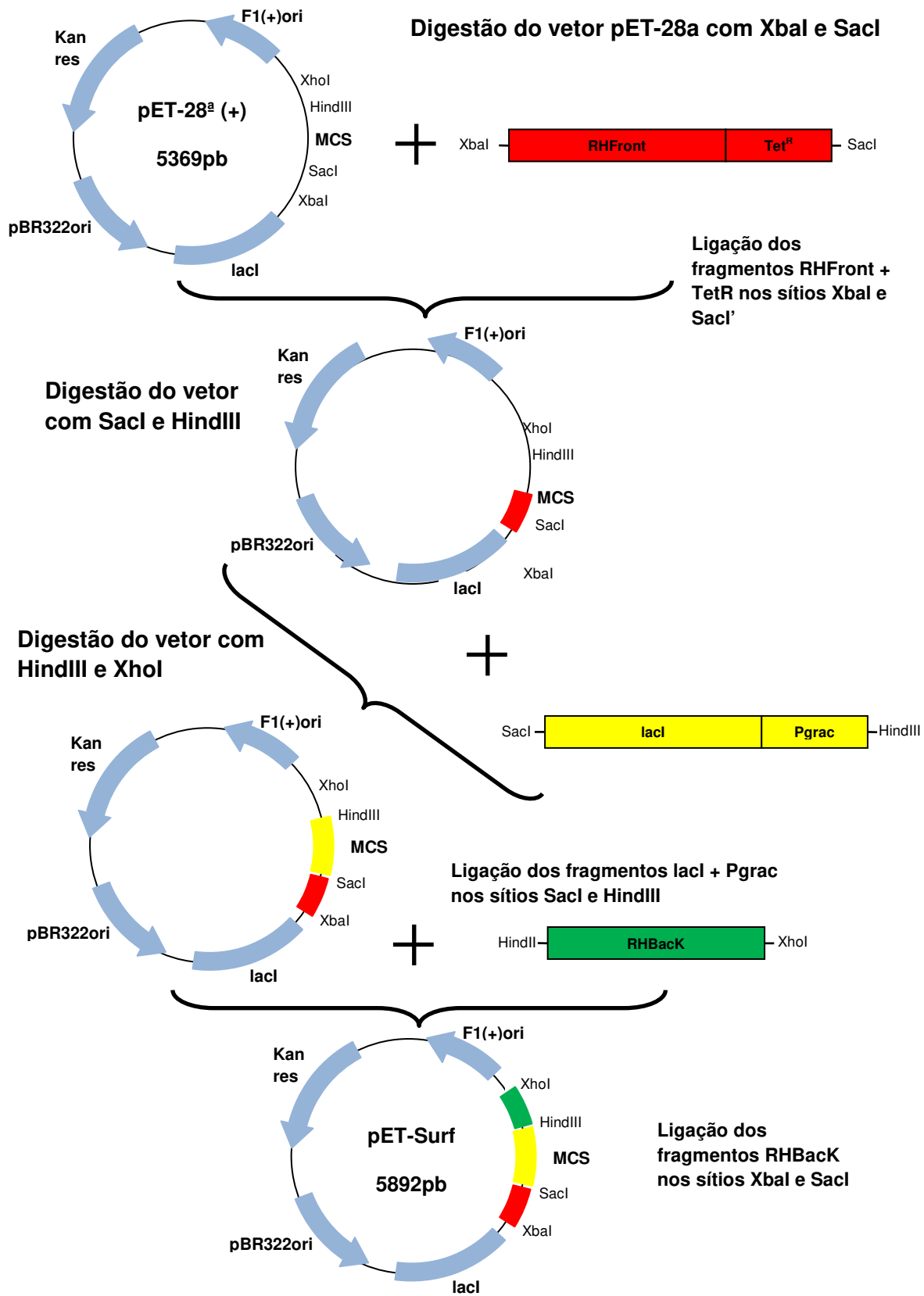


Figura 11. Estratégia para inserção do cassete de integração no vetor pET-28a

Durante a primeira etapa o vetor pET-28a foi linearizado com as enzimas de restrição *XbaI* e *SacI* e purificado, para que RHFront, primeira região de recombinação, e a região codificadora da marca de *tet* (resultantes da digestão do vetor pGEM-T, no qual foram clonadas, com as mesmas enzimas) fossem integrados.

Na segunda fase foram introduzidos no vetor a sequência do promotor *Pgrac* e a região codificadora do repressor *lacI*, entre os sítios *SacI* e *HindIII*. A segunda sequência homóloga ao DNA genômico de *B. subtilis* foi inserida na terceira etapa entre os sítios *HindIII* e *XhoI*.

Após a completa inserção do cassete de integração no vetor de expressão pET-28a, foi realizada uma análise do perfil de restrição do novo vetor, que foi denominado pET-Surf.

Posteriormente aos procedimentos de transformação em *E.coli* e extração de DNA plasmidial foram realizadas análises de restrição que comprovaram a presença do inserto no vetor e a integridade do mesmo. Foi feita a clivagem do vetor pET-Surf com 3 pares de enzimas de restrições, da qual se esperava a liberação de uma banda referente a uma parte de cassete integrada e uma segunda banda correspondente ao plasmídeo e o complemento do cassete.

De acordo com a Figura 12 todas as digestões, com as enzimas selecionadas para análise de restrição, liberaram fragmentos compatíveis com o esperado. Primeira digestão, realizada com as enzimas *BamHI* e *HindIII*, liberou um fragmento de aproximadamente 3300 pares de bases, o que corresponde a região composta pelo genes *tet* e *lacI*, além do promotor *pGrac*, que estão flanqueados por estas duas enzimas. A clivagem *XbaI* e *SacI* liberou o fragmento de 2300 pares de base formado pelas sequências RHFront e gene *tet*. A análise do fragmento liberado por *XbaI* e *HindIII* confirmou a presença do fragmento formado pelas regiões RHFront, *Tet*, *lacI* e *Pgrac*, de aproximadamente 4000 pares de bases.

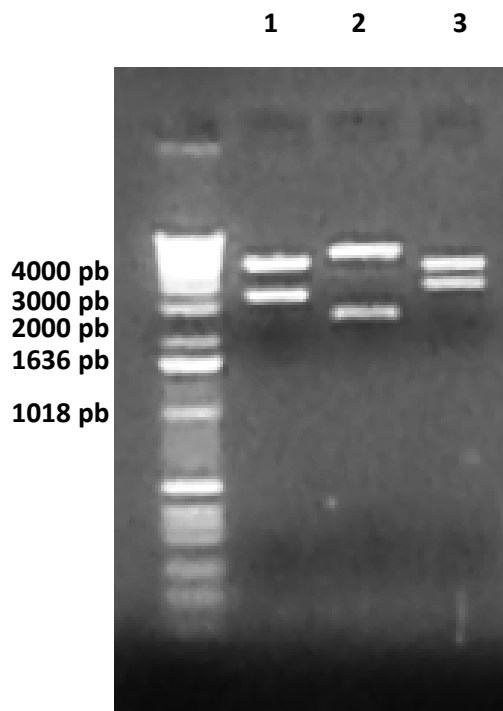


Figura 12. Análise de restrição do vetor de integração para *Bacillus subtilis* pET-Surf. 1) Clivagem do vetor pET-Surf com as enzimas de restrição BamHI e HindIII. 2) Clivagem do vetor pET-Surf com as enzimas de restrição XbaI e SacI. 3) Clivagem do vetor pET-Surf com as enzimas de restrição XbaI e HindIII. Gel de agarose 0,8%.

O vetor pET-Surf também foi avaliado através de um teste de PCR para detecção do cassete de integração (Figura 13).

As amplificações foram realizadas com alguns *primers*, forward e reverso, utilizados durante as amplificações para obtenção dos fragmentos que compõem o cassete. A primeira amplificação foi realizada com o primer RHFront *forward* e tet reverso, a qual amplificou com fidelidade o fragmento de aproximadamente 2400 pares de bases, responsáveis pela sequência de recombinação homóloga inicial (700 pb), além do gene da marca de seleção tet (1700 pb). O segundo teste de PCR utilizou os *primers* *lacI* Forward e RHBack Reverso, o fragmento originado também ficou dentro do esperado, 2300 pares de bases, que correspondem aos fragmentos *lacI* mais promotor *pGrac*, além da segunda região de recombinação. A análise do fragmento de amplificação do vetor pET-Surf utilizando os oligos tet

forward e *lacI* reverso mostrou uma única banda equivalente ao segmento de 3300 pares de bases constituintes da região formada pelo gene que confere resistência a tetraciclina, o gene do repressor *lac* e o promotor *pGrac*.

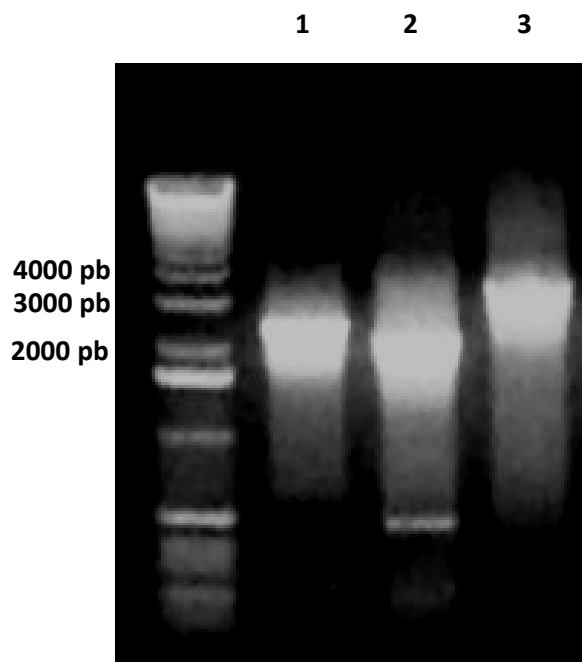


Figura 13. Análise de PCR do vetor pET-Surf para amplificar fragmentos inseridos no cassete de integração. 1) Amplificação realizada com os primers DTM30 e DTM35. 2) Amplificação realizada com os primers DTM36 e DTM33. 3) Amplificação realizada com os primers DTM34 e DTM37. Gel de agarose 0,8%.

5.6 Transformação da cepa de *Bacillus subtilis* LB5a com o vetor pET-Surf e seleção dos clones transformantes

O vetor contendo o cassete de integração do promotor *Pgrac* (pET-Surf), regulado pela molécula repressora sintetizada pelo gene *lacI*, foi digerido com a enzima *BglI* (Promega), para que este ficasse na forma linearizada, facilitando assim a integração do cassete no DNA genômico da cepa de *Bacillus subtilis*. O produto da digestão purificado foi utilizado para transformação da linhagem de *B. subtilis*.

Para validar a construção a cepa selecionada (*Bacillus subtilis* LB5a) foi transformada pelo método de competência natural de *Bacillus*, de acordo com protocolo sugerido por Klein; Kaletta; Schnell, (1992), com algumas modificações. Foram utilizados cerca de 30 ng de DNA do vetor pET-Surf e 1 mL de meio contendo as células de *bacillus* competentes. Após período de incubação a 30° C, as células foram plaqueadas em meio de cultura, contendo o antibiótico tetraciclina, para promover a seleção de possíveis clones positivos.

A competência genética é a habilidade natural que um microrganismo possui de absorver o DNA exógeno, presente no meio ambiente, e integrá-lo em seu próprio genoma (DUBNAU, 1999). Dentre os microrganismos que apresentam competência natural comprovada, *Bacillus subtilis* é o mais estudado. Para permitir a incorporação do DNA encontrado no ambiente, as células de *Bacillus* sintetizam um sistema específico para absorver e ligar o DNA estranho (MIRONCZUK; KOVACS; KUIPERS, 2008).

A eficiência de células de *B. subtilis* LB5a transformadas foi alta. Para confirmar se o método de seleção pela marca de antibiótico estava funcionando, a cepa selvagem, não transformada, foi riscada em placas com e sem a presença do antibiótico, o mesmo foi feito dois clones positivos, ou seja, com duas colônias selecionadas das placas com tetraciclina (Figura 14). O resultado comprovou que as células de *Bacillus subtilis* LB5a adquiriram resistência ao antibiótico.

Algumas espécies do gênero *Bacillus* têm sido usadas não apenas para produção industrial de moléculas de interesse, como enzimas e antibióticos, mas também encontram aplicações durante o processamento de alimentos fermentados. Entretanto, *B. subtilis* tem sido extensivamente estudado pelo fato de ser transformado geneticamente de modo eficiente. Baseado neste fato, esse microrganismo tem sido usado com frequência como uma bactéria hospedeira para engenharia genética.



A



B

Figura 14. Placas da seleção após a transformação de *B.subtilis* com *pET-Surf* (LB 20µg/mL de tetraciclina). A) Seleção em meio LB com tetraciclina. B) Placa com dois clones positivos e a cepa LB5-a em meio com tetraciclina.

Durante o desenvolvimento da competência natural, as células desenvolvem a habilidade de incorporar DNA externo e submeter-se a recombinação homóloga entre DNA cromossômico e uma fita de DNA exógeno (ASHICAGA, 2000). Fato este bastante aproveitado por pesquisadores para inserir novas sequências de DNA no genoma de *B. subtilis*, para que este venha a expressar proteínas heterólogas de interesse em diversos setores industriais.

O DNA genômico de três clones isolados a partir das placas com o antibiótico utilizado como marca de seleção na concentração de 100 µg/mL foi isolado e analisado por um teste de PCR. A reação para a amplificação do cassete de integração, para comprovar a completa integração do cassete no DNA da cepa *B. subtilis* LB5a por recombinação homóloga e a substituição do promotor *pSrf* pelo promotor regulado *pGrac* no operon *SrfA*, foi preparada com os primers RHFront forward e RHBack reverso, além de 20 ng de DNA genômico dos clones selecionados como positivos. Utilizamos ainda o vetor pET-Surf como controle positivo para avaliar a eficiência da reação de PCR e a cepa não transformada como controle negativo.

Dos três clones avaliados, apenas um, juntamente com o vetor pET-Surf (controle positivo), amplificou uma banda no tamanho esperado de 4700 pares de bases (Figura 15 canaleta 2). Sendo que os demais clones apresentaram uma banda de amplificação semelhante a banda da cepa original, ou seja não transformada, com tamanho próximo a sequência formada pela região promotora original do operon de *Bacillus*.

O Southern blot foi realizado para confirmar a presença do cassete de integração. O DNA genômico de dois clones selecionados no meio com tetraciclina, sendo um deles o que apresentou, durante teste de PCR, a banda de amplificação correspondente ao fragmento inserido no DNA genômico de *B. subtilis* LB5a, juntamente com o DNA da cepa não transformada e o DNA plasmidial do vetor pET-Surf sofreram digestão total com as enzimas *XbaI* e *XhoI*, que flanqueiam o cassete inserido.

Para um dos clones (Figura 16 canaleta 2), o mesmo que foi confirmado como positivo durante PCR, e o vetor pET-Surf, usado como controle positivo

foram obtidos sinais intensos de hibridação. Enquanto o controle negativo, cepa não transformada de *B. subtilis* LB5a e para o segundo clone testado nenhum sinal foi observado. Tais resultados sugerem a presença do cassete integrado e preservado no DNA genômico da nova cepa de *Bacillus* que passou a ser determinada *Bacillus subtilis* pGrac-SrfA.

Portanto, a ocorrência do duplo *crossing over* e recombinação homóloga da região promotora do operon *srfA* também foi confirmada por *Southern blotting*, usando como sonda o primer DTM34.

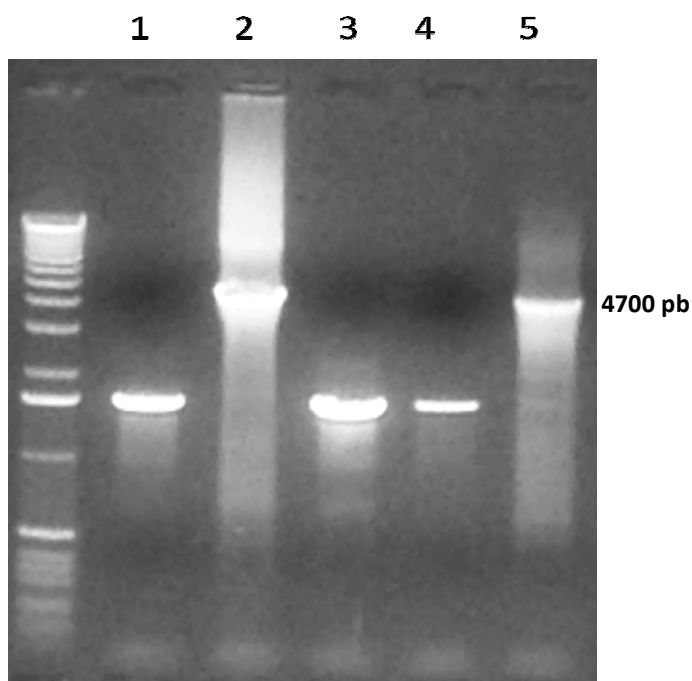


Figura 15. PCR do DNA genômico de cepas de *Bacillus subtilis* transformadas com pET-Surf. Linhas de 1 a 4) clones selecionados como positivos ou Tet^R . 5) vetor construído para integração pET-Surf. Gel de agarose 0,8%.

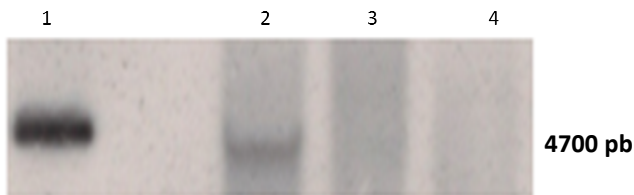


Figura 16: Southern blot realizado após digestão total do DNA genômico, com as enzimas *xba*I e *h*ho que flanqueiam a região inserida no genoma de *B.subtilis*. 1) controle positivo (vetor pET-Surf). 2 e 3) clones positivos selecionados. 4) Cepa selvagem de *B.subtilis* usada como controle negativo.

Parte II:

Produção e caracterização do biossurfactante produzido

5.7 Avaliação da atividade do biossurfactante

Devido ao seu caráter anfifílico surfactantes podem induzir a hemólise, quando apresentados em dadas concentrações (MORÁN; MARTÍNEZ; SENERIZ, 2002). Segundo Seydlova & Svobodova (2007), a molécula de surfactina apresentará atividade hemolítica apenas quando apresentada em altas concentrações o que equivale a cerca de 40 a 60 μ M.

Aproveitando essa propriedade dos biossurfactantes, muitos pesquisadores fazem busca ou *screening* por novos microrganismos produtores de moléculas biossurfactantes a partir de métodos que utilizam como meio de cultura o Agar sangue e observam então a formação dos chamados halos de hemólise (MORÁN; MARTÍNEZ; SENERIZ, 2002).

Para verificarmos se a nova cepa de *Bacillus subtilis* pGrac-SrfA produz o biossurfactante ativo em quantidade significativa, utilizamos o método de difusão em agar para avaliar o potencial hemolítico e compararmos a cepa modificada geneticamente com a cepa selvagem usada como hospedeira.

Foram avaliados para a produção de surfactina pelo teste de atividade hemolítica neste trabalho, a bactéria não modificada *B.subtilis* LB5a, a cepa

Bacillus subtilis pGrac-SrfA, além de mais outros dois clones que não apresentaram banda de amplificação correspondente ao cassete de integração, mas que foram isoladas pela marca de seleção tet. Os microrganismos foram inoculados, com palitos estéreis, sobre a superfície do meio Agar sangue. O indutor IPTG foi adicionado na concentração de 0,5mM e as placas foram incubadas a 37°C por até 48 horas.

Durante avaliação das placas, após o período de incubação em estufa, observamos que a cepa *Bacillus subtilis* pGrac-SrfA apresentou o maior halo de hemólise quando induzida com IPTG. Este resultado confirma que o sistema de indução para produção de surfactina construído, alcançou o objetivo proposto de aumentar a síntese deste lipopeptídeo (Figura 17).

A produção de compostos tensoativos, por fermentação submersa, tem como característica a formação acentuada de espuma, devido as propriedades destas moléculas. Quando o biossurfactante começa a ser produzido e, portanto, secretado para o meio, grandes quantidades de espuma são formadas.

A Figura 18 apresenta a formação de espuma após 36 horas de incubação em meio de fermentação, com a adição do indutor (IPTG) a 30°C, para a cepa selvagem (*B.subtilis* LB5a) e a modificada geneticamente, com sistema de produção regulado pelo indutor. Podemos concluir que a cepa de *Bacillus subtilis* pGrac-SrfA apresentou produção de espuma acentuada e em maior quantidade, ou seja maior produção da molécula com poder tensoativo.

Segundo Costa (2005), a formação de espuma ocorre na medida em que o biossurfactante é sintetizado, culminando com a expulsão desta molécula a partir de 18 horas de fermentação.

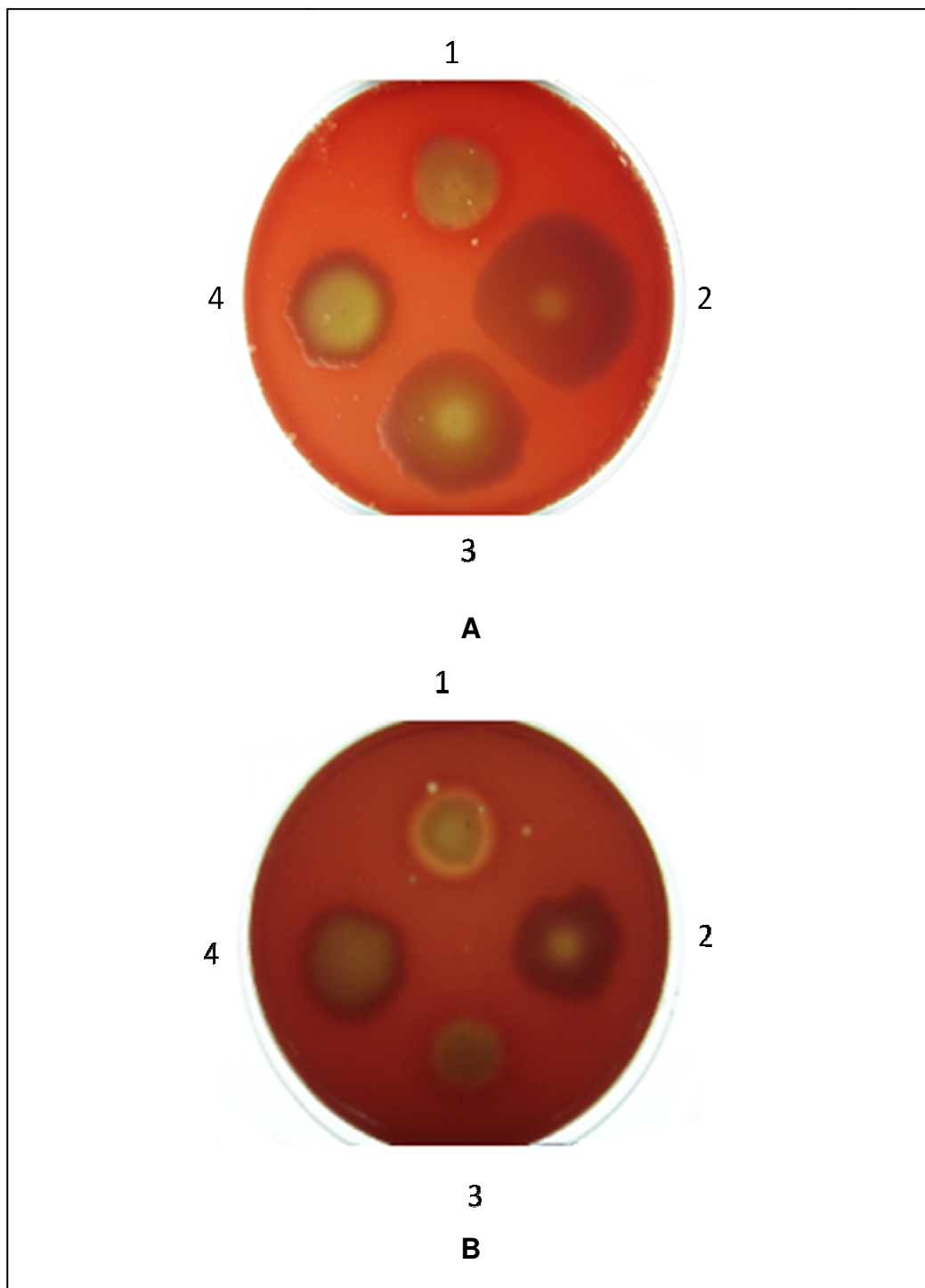


Figura 17. Avaliação da atividade hemolítica após cultivo das bactérias em placas de Agar sangue 1) *Bacillus subtilis* pGrac-srfA; 2) *Bacillus subtilis* LB5a; 3 e 4) Cepas isoladas em meio de seleção com tetraciclina; A) Sem adição do indutor IPTG. B) Com adição do indutor IPTG.

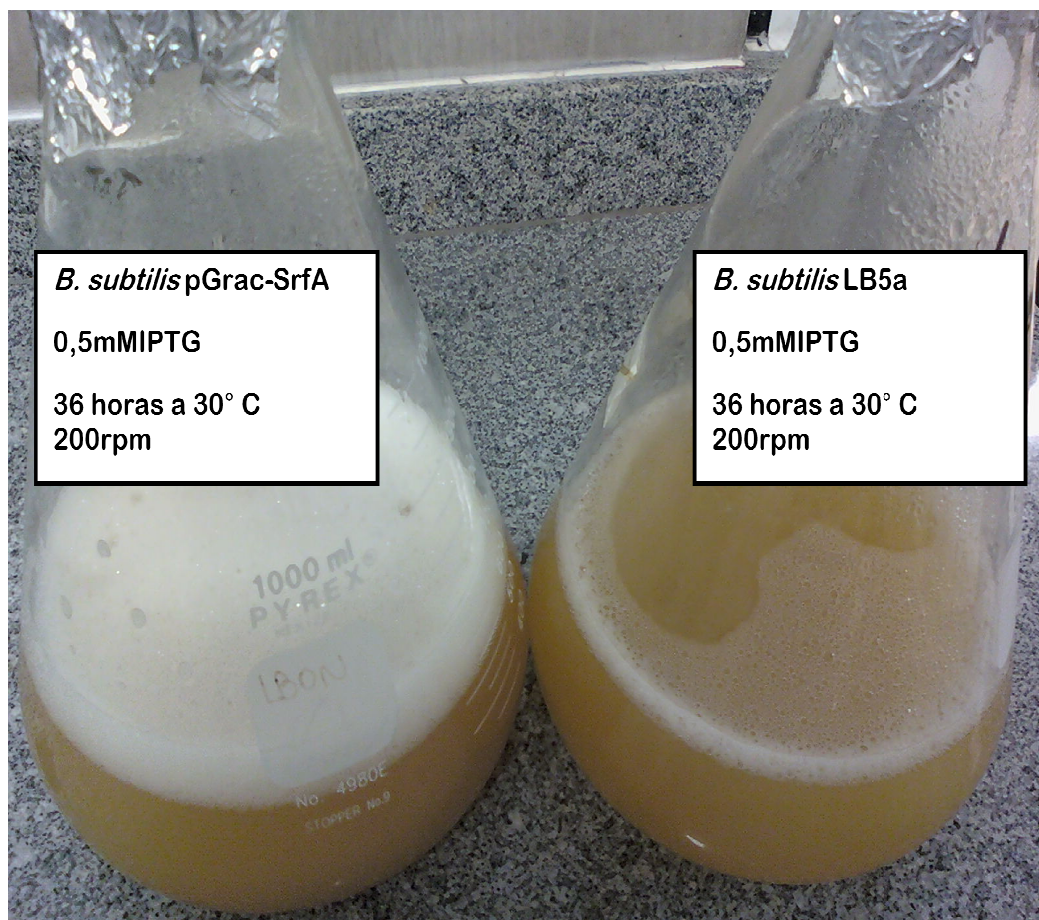


Figura 18. Avaliação da produção de espuma durante produção de biossurfactante. Fermentação submersa das cepas de *Bacillus subtilis* LB5a e pGrac-SrfA na presença do indutor IPTG.

A redução da tensão superficial é utilizada como critério primário para selecionar microrganismos produtores de biossurfactantes, embora agentes emulsificantes e dispersantes não possuam, necessariamente, habilidade de reduzir a tensão superficial (YOUSSEF et al., 2004; SHEPERD et al., 1995).

Neste sentido, as cepas de *Bacillus subtilis*, analisadas para a produção do agente biossurfactante durante este estudo, foram avaliadas em diferentes períodos de incubação, após a adição de IPTG, com a finalidade de observar possíveis alterações na tensão superficial dos meios de cultura.

De acordo com a Tabela 6, os resultados demonstram que ambas as cepas avaliadas apresentaram os menores valores de tensão superficial (mN/m) após 36

horas de incubação sob agitação a 30°C. A cepa pGra c-SrfA apresentou melhor capacidade de alteração da tensão superficial do meio, reduzindo a tensão inicial de 72,31 para 30,18 mN/m.

Tabela 6. Valores de tensão superficial (mN/m) obtidos pelo isolado de *Bacillus subtilis* LB5a e pela cepa pGrac-SrfA em diferentes tempos de fermentação.

Cepas	Tempo (h)	TS (mN/m)
<i>B. subtilis</i> LB5a	0	74,06 ± 0,02
	12	73,23 ± 0,06
	24	46,30 ± 0,10
	36	38,72 ± 0,23
	48	48,52 ± 0,16
<i>B. subtilis</i> pGrac-SrfA	0	72,31 ± 0,08
	12	71,45 ± 0,17
	24	39,60 ± 0,14
	36	30,18 ± 0,08
	48	41,19 ± 0,09

Nota: Os resultados são as médias e desvios padrão de três ensaios independentes

5.8 Produção do biossurfactante

Este estudo teve por objetivo comparar a produção do biossurfactante surfactina, produzido pela cepa de *Bacillus subtilis* modificada geneticamente, com a cepa selvagem *B. subtilis* LB5a, citada como produtora natural da molécula.

A cepa de *B. subtilis pGrac-SrfA* que foi modificada, para permitir a produção regulada de surfactina, juntamente com a cepa *Bacillus subtilis* LB5a foi utilizada para a produção de surfactina a partir de um meio de fermentação. Após 36 horas de fermentação, na presença de 0,5mM de IPTG e 100µg/mL de tetraciclina, a 30°C e 200rpm, a cultura foi centri fugada a 12000 g por 30 minutos. A Amostra centrifugada foi precipitada pelo ajuste do pH para 2 com HCl (6mol/L) e acondicionamento a 4°C por 12 horas. O precipitado foi coletado por centrifugação e extraído duas vezes com metanol. A solução foi seca em liofilizador, dissolvida em tampão PBS (0,02 mol/l pH 7.4) e filtrada em membrana de 0,22µm.

As amostras semi purificadas e liofilizadas foram consideradas surfactina bruta e as massas secas obtidas foram pesadas para avaliar o rendimento na produção do biossurfactante.

A cepa modificada, *Bacillus subtilis pGrac-SrfA*, apresentou grande potencial para produção do biossurfactante surfactina. Após 36 horas de indução com IPTG, apresentou um aumento de aproximadamente 57% na produção do lipopeptídeo, quando comparada com a cepa selvagem produtora do surfactante nas mesmas condições de fermentação (Tabela 7).

Tabela 7. Rendimento do biossurfactante bruto após 36 horas de fermentação

Cepas avaliadas	Rendimento (g/L)
<i>Bacillus subtilis</i> selvagem	1,9 ± 0,25
<i>Bacillus subtilis</i> modificado	3,0 ± 0,15

Nota: Os resultados são as médias e desvios padrão de três ensaios independentes

5.9 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA SURFACTINA PRODUZIDA POR *BACILLUS SUBTILIS* pGrac-SrfA

5.9.1 Purificação de lipopeptídeos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Na tentativa de elucidar o surfactante obtido, procederam-se as análises de purificação e caracterização das moléculas obtidas a partir da cepa modificada, sempre confrontando com as moléculas obtidas a partir da cepa selvagem e o padrão de surfactina comercial (S-3523, Sigma) com 99,9% de pureza.

A surfactina bruta foi purificada em sistema HPLC de fase reversa em coluna Sephasil Peptide (C18 5 µm 4,6x100mm). A detecção foi realizada a 280nm. A fase móvel constituída por acetonitrila com 0.1% de TFA e água com 0.1% de TFA. As frações foram eluídas com um gradiente linear do solvente A de 30 a 80% em um fluxo de 1mL/min.

As amostras de surfactina bruta obtidas das cepas de *B. subtilis*, modificada geneticamente (pGrac-SrfA) e a selvagem (LB5a), apresentaram diferentes números de picos isolados. No entanto, com perfis semelhantes, eluídos com mesmo gradiente e tempo de retenção, os quais foram semelhantes ao perfil apresentado pelo padrão (Figuras 19, 20 e 21).

A surfactina obtida da cepa selvagem apresentou 5 picos principais, enquanto que para a amostra da cepa modificada foram eluídos 6 picos e o padrão de surfactina apresentou 4 frações principais. Esta diferença pode estar relacionada com o número de isoformas apresentado em cada amostra.

Na tentativa de caracterizar as isoformas produzidas por cada cepa, os principais picos coletados durante avaliação em HPLC foram submetidos à análise por espectrometria de massas.

As cepas de *B. subtilis* são conhecidas pela capacidade de produzir diversos tipos de lipopeptídeos, particularmente iturina, surfactina, fengicina e liquenisina (Mukherjee et al., 2005). Algumas cepas produzem apenas um tipo de

lipopeptídeo, enquanto outras produzem dois ou mais tipos de moléculas simultaneamente. A elucidação da estrutura do surfactante produzido se faz necessária porque as propriedades tensoativas e biológicas dos lipopeptídeos dependem da sua composição química.

A surfactina obtida naturalmente a partir de microrganismo se caracteriza por compreender uma mistura de isoformas com propriedades fisiológicas que as diferem, de modo sutil, devido as variações no comprimento da cadeia de ácidos graxos, como na substituição de algum aminoácido do anel peptídico (Lim et al., 2005).

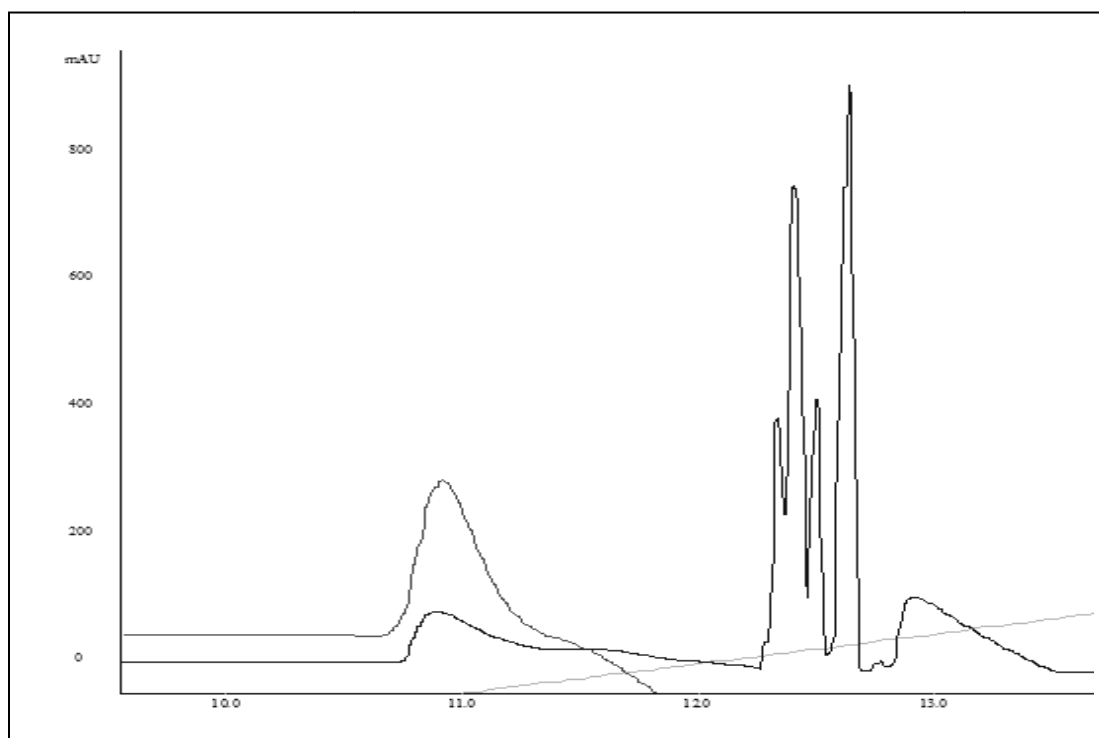


Figura 19: Perfil de eluição do padrão de surfactina (S-3523, Sigma) purificado em sistema HPLC de fase reversa em coluna Sephasil Peptide (C18 5 μ m 4,6x100mm). A detecção foi realizada a 280nm.

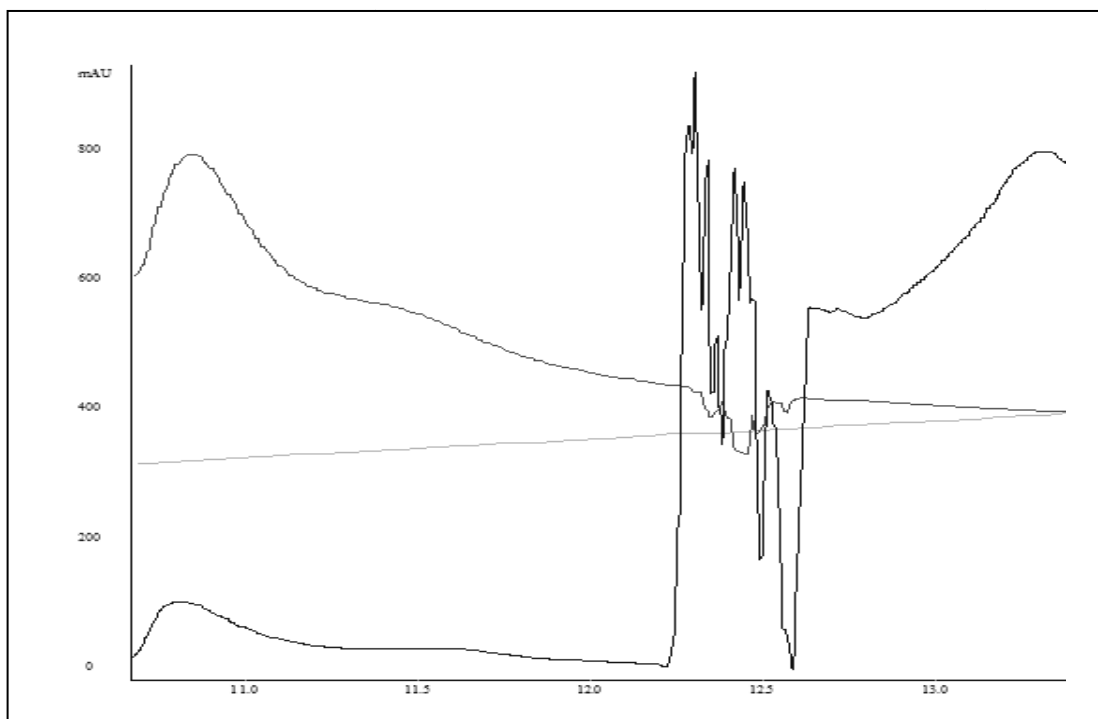


Figura 20: Perfil de eluição da amostra de surfactina produzida pela cepa de *B.subtilis* LB5a purificada em sistema HPLC de fase reversa em coluna Sephasil Peptide (C18 5 μ m 4,6x100mm). A detecção foi realizada a 280nm.

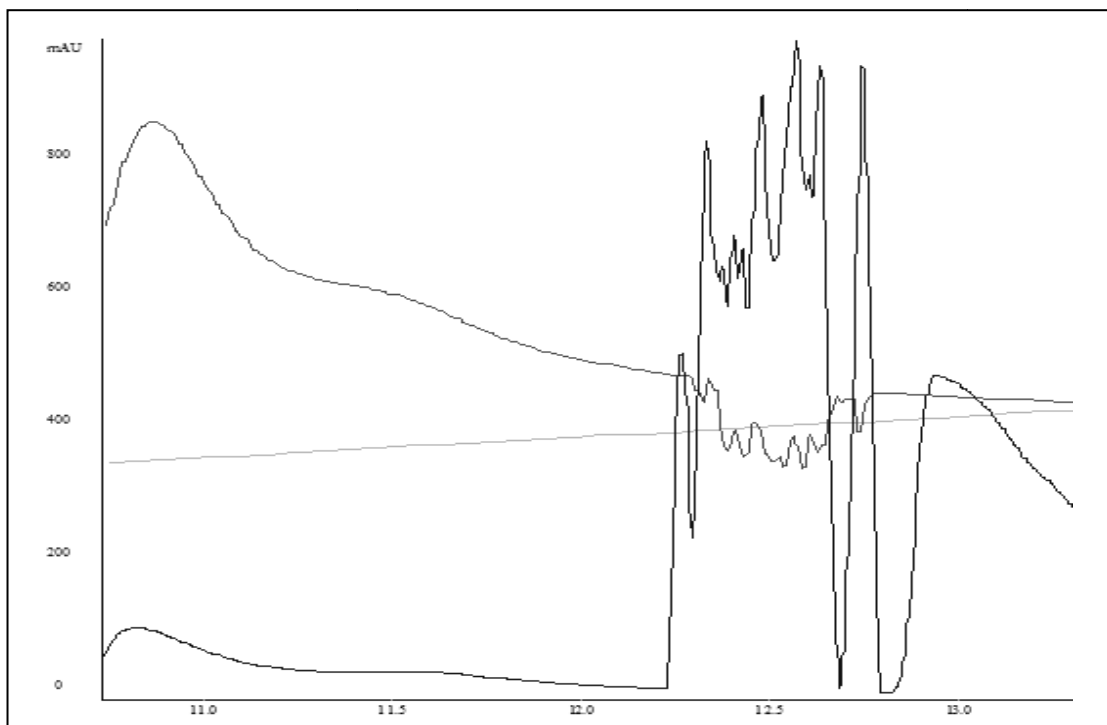


Figura 21: Perfil de eluição da amostra de surfactina produzida pela cepa de *B. subtilis* pGrac-SrfA purificada em sistema HPLC de fase reversa em coluna Sephasil Peptide (C18 5 μ m 4,6x100mm). A detecção foi realizada a 280nm.

5.9.2 Análise dos lipopeptídeos purificados em HPLC

As Figuras 22, 23 e 24 apresentam os espectros de massas gerados a partir dos principais picos coletados, durante purificação em HPLC, das amostras obtidas das cepas de *Bacillus subtilis* LB5a, *Bacillus subtilis* pGrac-SrfA e do padrão de surfactina (S-3523, Sigma).

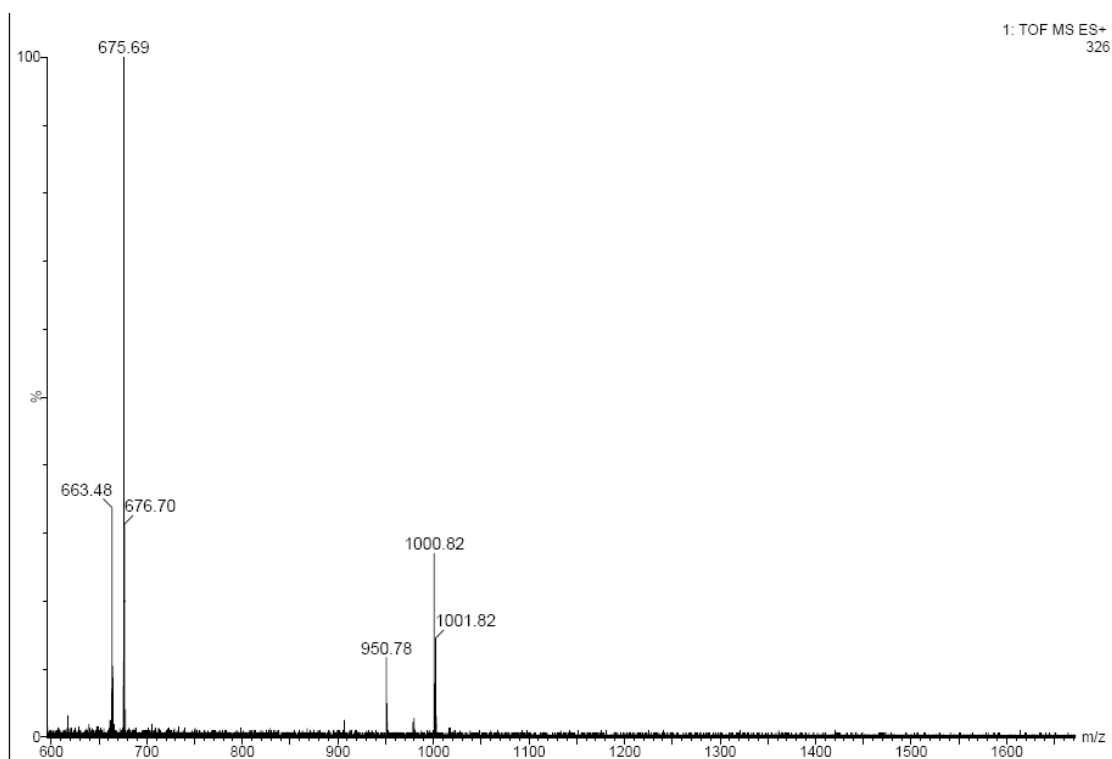
Quando comparamos os espectros de massas relativos às diferentes amostras observamos que o perfil de metabólitos para ambas as cepas, selvagem e modificada geneticamente, não variou de modo significativo. Sendo que os principais picos encontrados nos espectros das amostras dos microrganismos também estiveram presentes no padrão.

As amostras obtidas das duas cepas estudadas apresentaram uma série de íons com razão massa/carga na região de 950, 994, 1000 e 1016. Sendo estas moléculas isoformas do lipopeptídeo surfactina encontradas com frequência (KIM et al., 2009). Os picos encontrados com m/z de 663 e 785 são citados, em estudo para caracterizar um lipopeptídeo produzido por *Bacillus*, realizado por Liu; Yang; Um (2008), como fragmentos de surfactina contendo resíduos de ácido carboxílico.

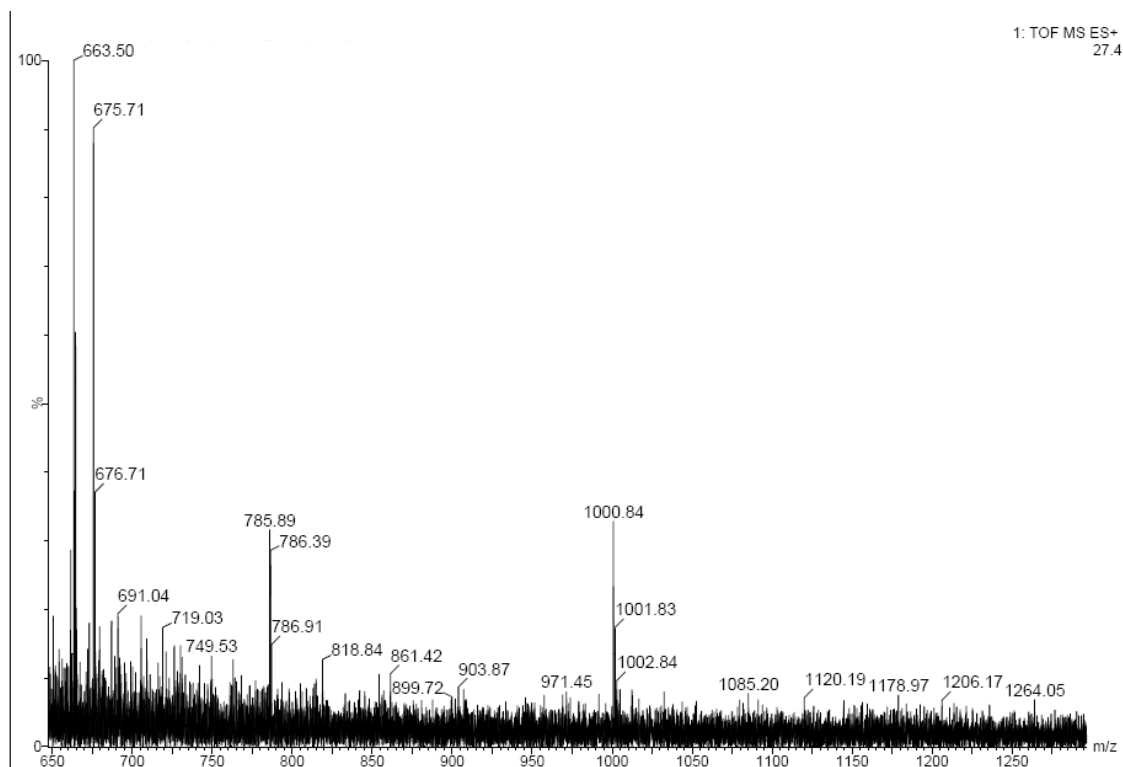
Os picos de maior intensidade obtidos pelas frações do padrão de surfactina foram os mesmos encontrados em maior abundância por ambas as cepas. Sendo a molécula de m/z 1000,80 a principal isoforma de surfactina encontrada neste estudo.

A surfactina natural é uma mistura de isoformas que se diferenciam ligeiramente em suas propriedades físico-químicas devido a variações no tamanho da cadeia e a ligação do seu componente hidroxí ácido graxo e as substituições dos aminoácidos componentes do anel (Kowall et al, 1998). Estas variações dependem da linhagem (Kowall et al, 1998; Hsieh et al, 2004) e das condições nutricionais e ambientais (Kowall et al, 1998).

O grupo de surfactinas melhores caracterizadas apresenta valores de razão massa/carga entre 1000 e 1060 (Kim et al., 2009). O enorme interesse em torno das propriedades da surfactina vem promovendo o surgimento de inúmeras pesquisas em busca de novas isoformas desta molécula, que apresentem aumento das propriedades biossurfactantes. Como resultado, inúmeras variantes de surfactina tem sido citados (Kim et al., 2009; Liu et al., 2008; Song et al., 2009).



(A)



(B)

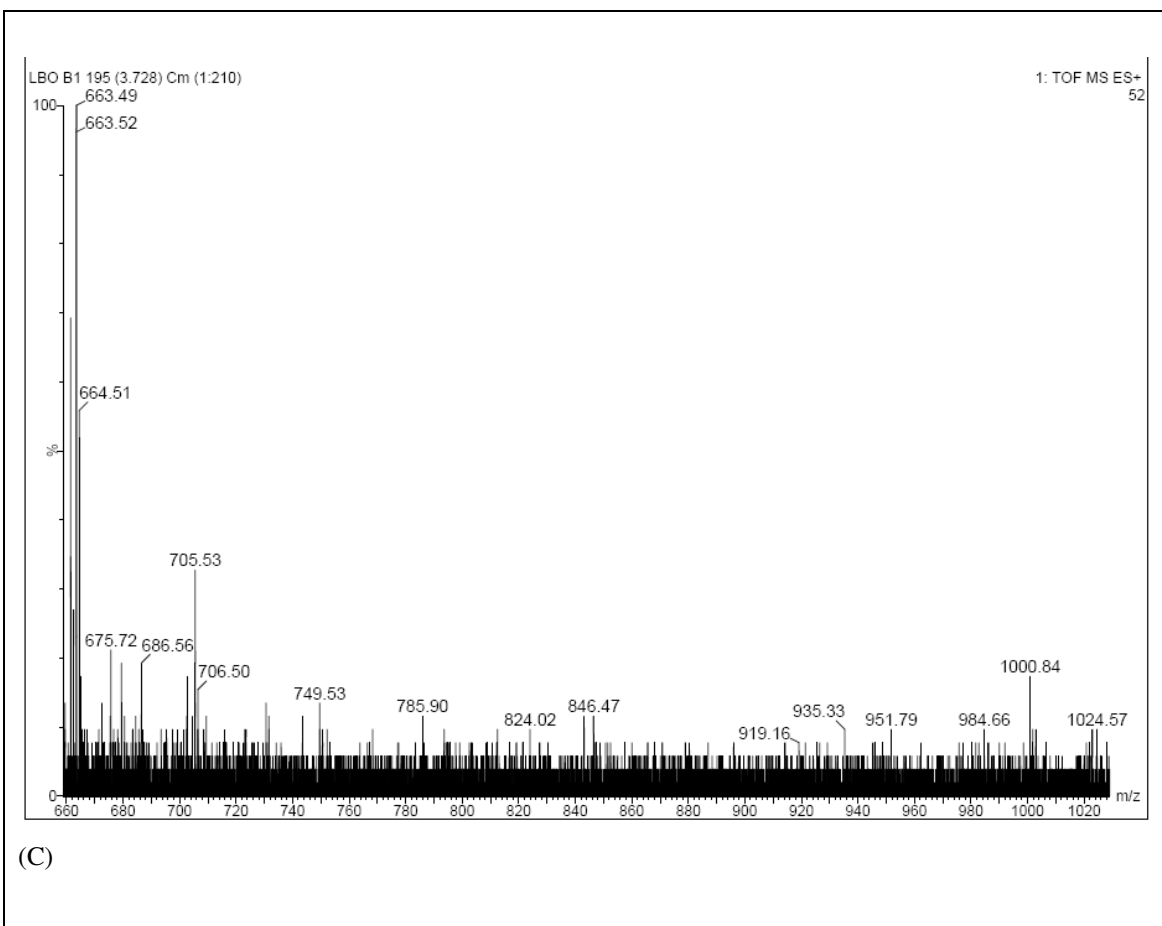
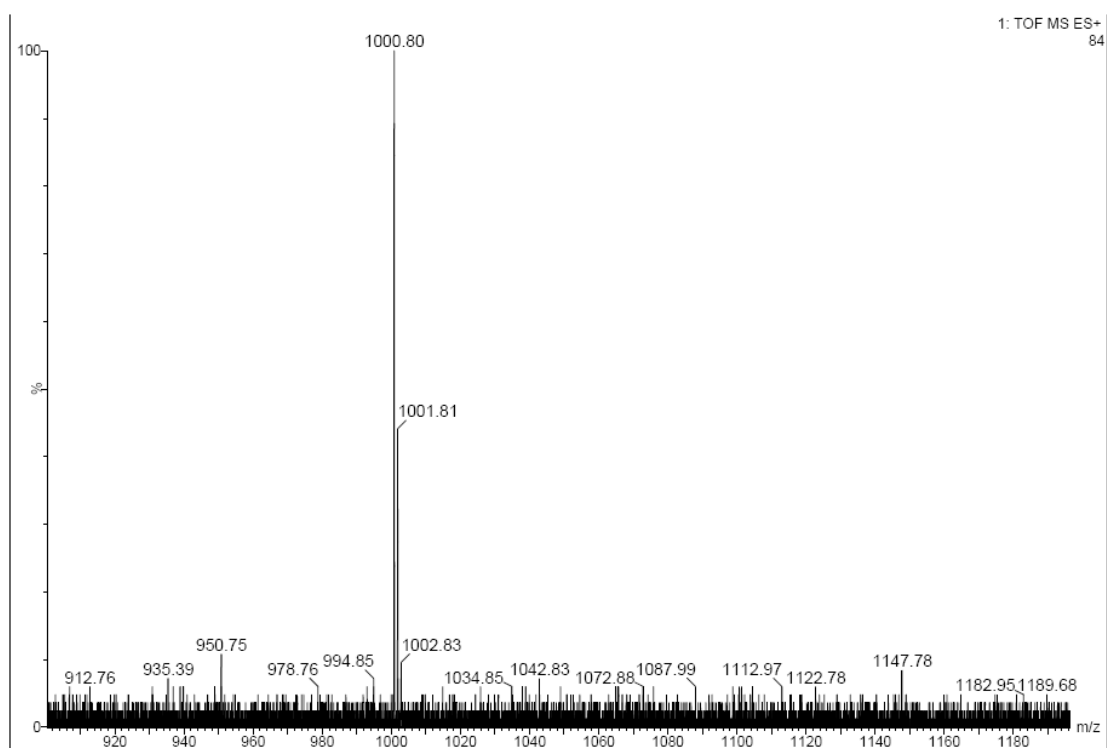
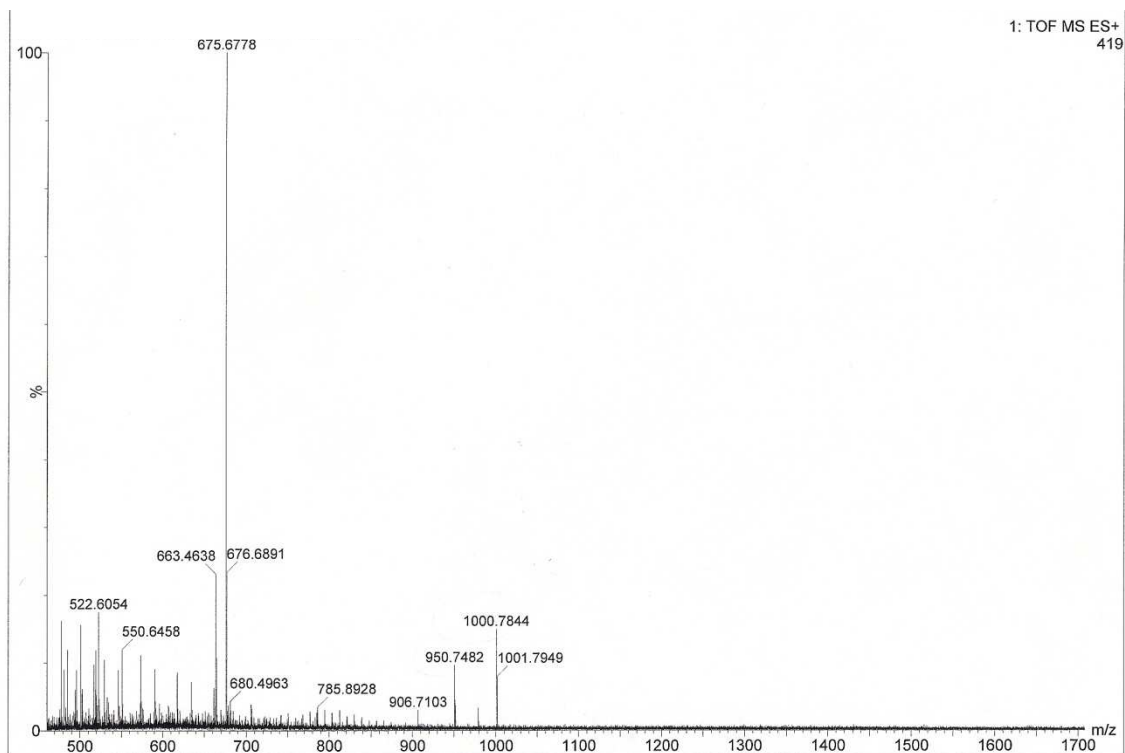


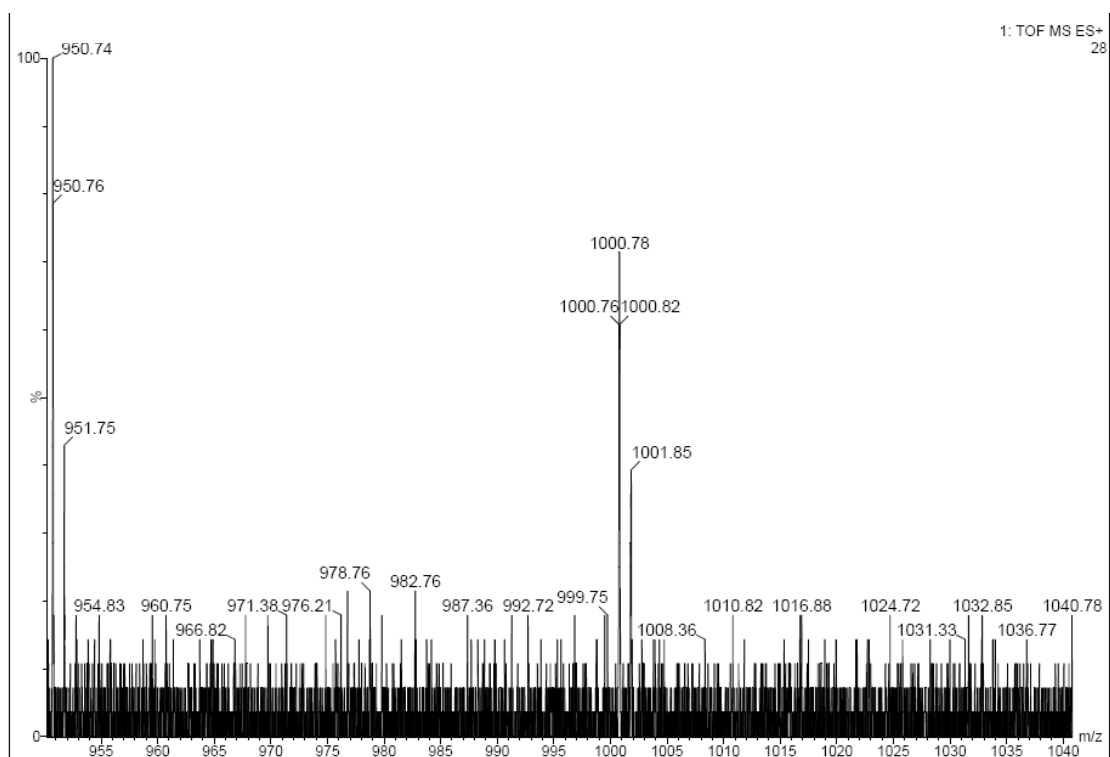
Figura 22. Espectros de massa obtidos por ESI/MS para frações purificadas por HPLC da amostra obtida a partir da cepa selvagem. A) pico 1; B) pico 2; C) pico 3.



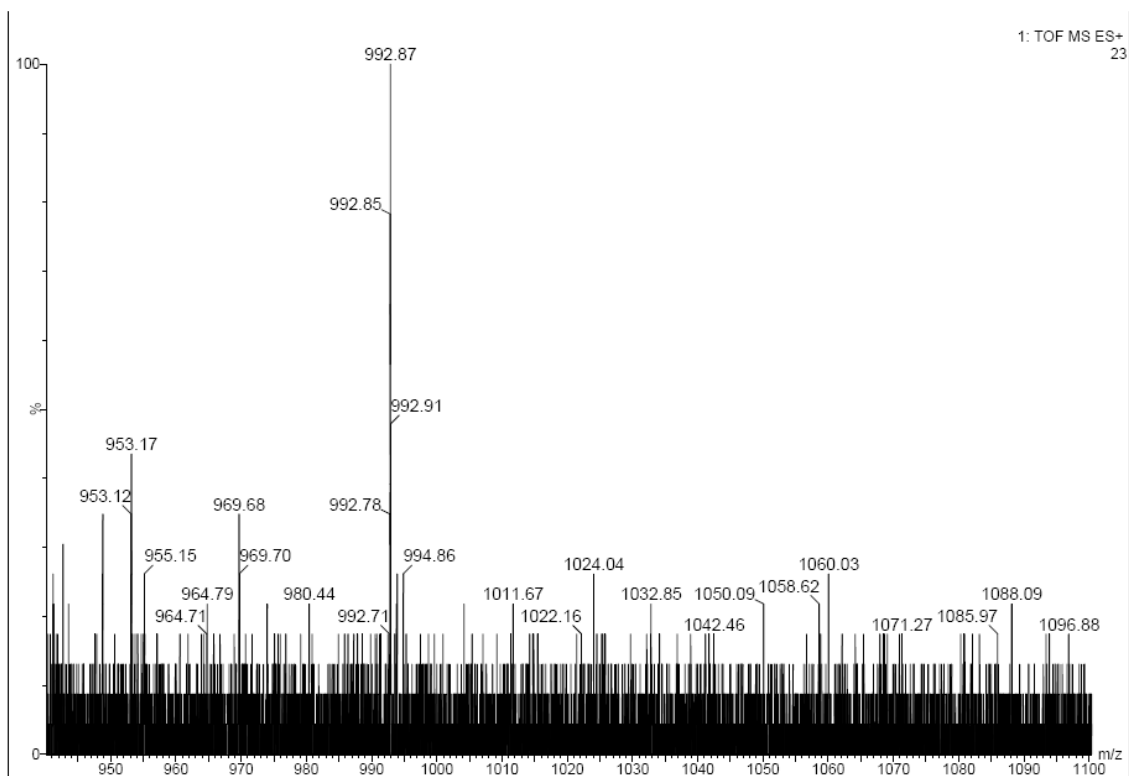
(A)



(B)



(C) Clone



(D)

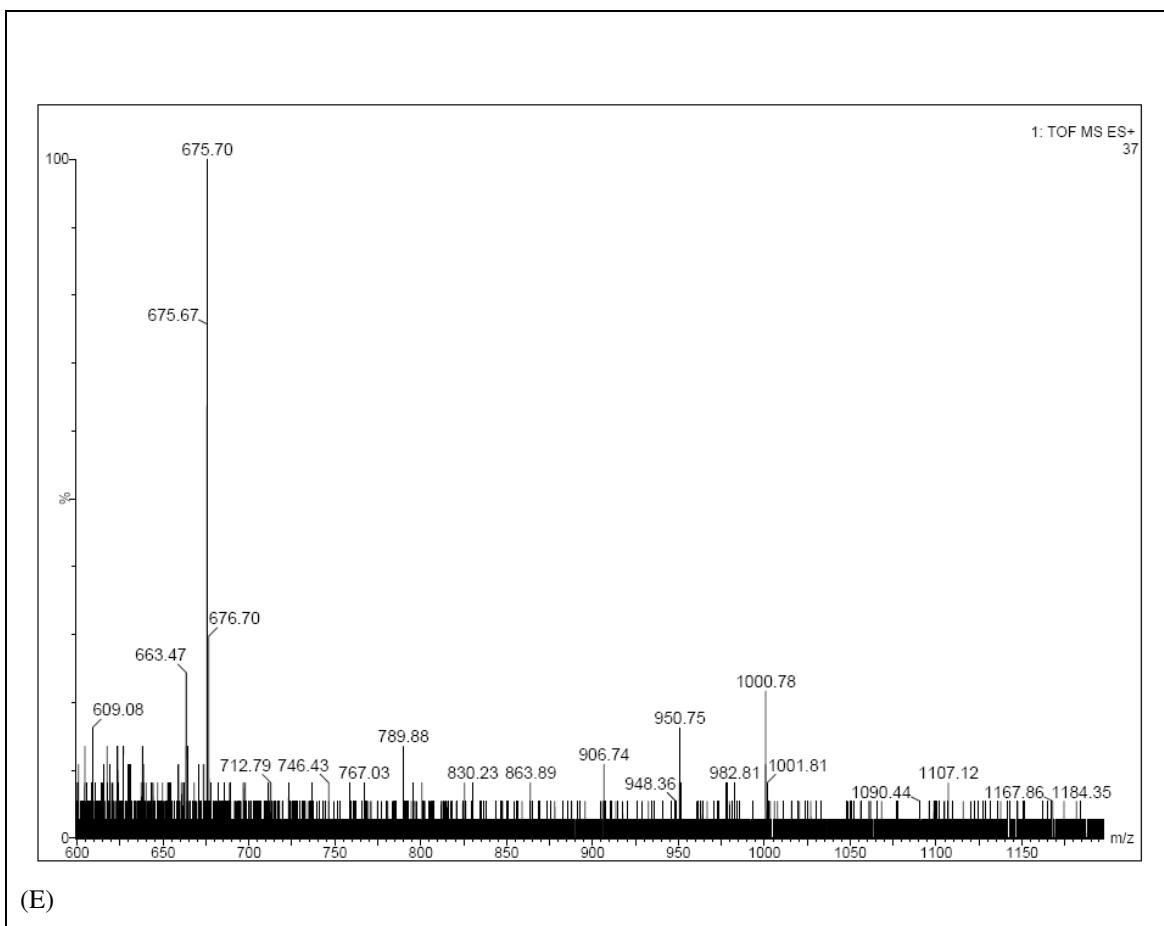
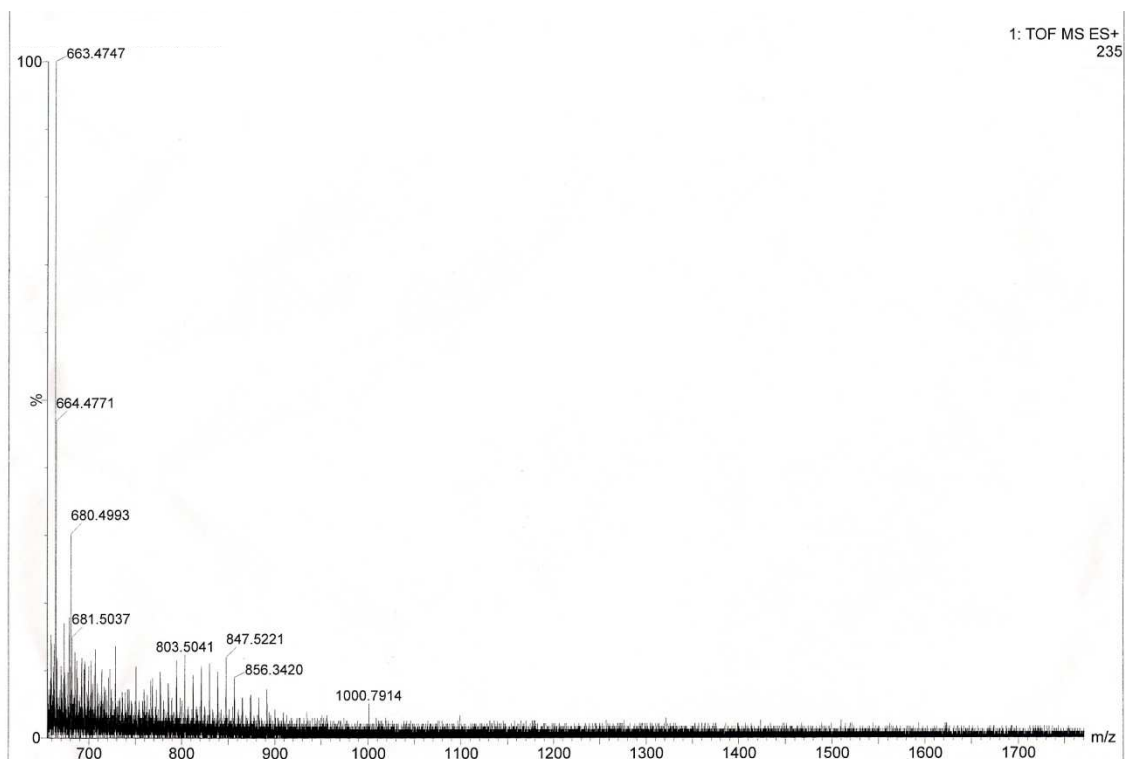


Figura 23. Espectros de massa obtidos por ESI/MS para frações purificadas por HPLC da amostra obtida a partir da cepa *B.subtilis* pGrac-SrfA. A) pico 1; B) pico 2; C) pico 3; D) pico 4; E) pico 5.



(A)

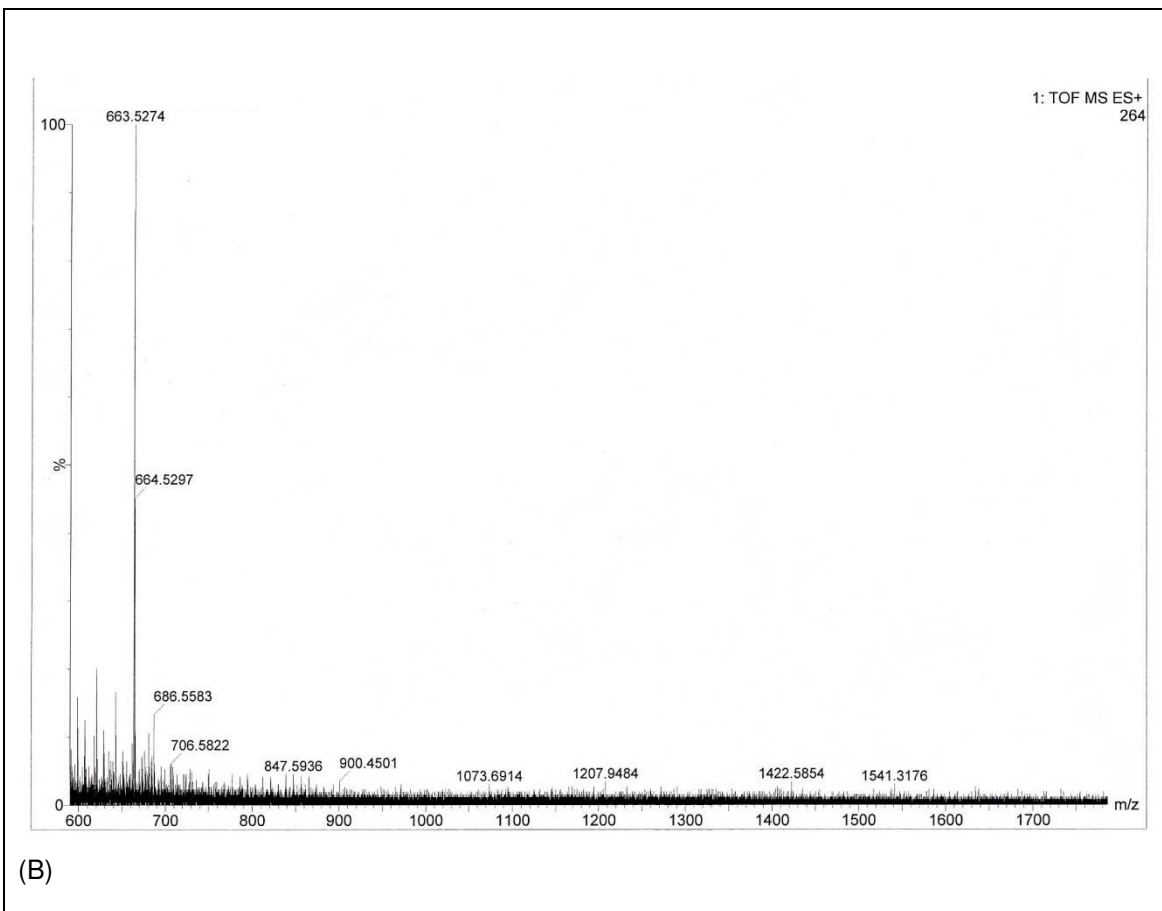


Figura 24. Espectros de massa obtidos por ESI/MS para frações purificadas por HPLC da amostra obtida a partir do padrão comercial de surfactina. A) pico 1; B) pico 2.

6. CONCLUSÃO

- A produção de biossurfactante pela cepa de *B.subtilis* pGrac-SrfA, que apresenta o operon *srfA* sob controle da região promotora *Pgrac*, a qual permite a expressão regulada desta molécula a partir da adição do indutor, resultou na obtenção de 3,0 g/L do biossurfactante surfactina, após 36 horas de fermentação na presença de IPTG.
- A modificação genética realizada na cepa de *Bacillus subtilis* selvagem LB5a gerou um aumento em torno de 57% na produção do tensoativo surfactina.
- O biossurfactante produzido pela nova cepa *Bacillus subtilis* pGrac-SrfA apresentou capacidade de reduzir a tensão superficial do meio de cultivo de 72,31mN/m para 30,18mN/m, além de apresentar maior potencial hemolítico e capacidade de formação de espuma, quando comparado com a cepa selvagem.
- Foi confirmada por espectrometria de massas, a presença de homólogos do lipopeptídeo surfactina com predominância da isoforma 1000, 18.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHIMOU, F., JACQUES, P., DELEU, M. Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. *Enzyme and Microbial Technology*, v.27, p.749-754, 2000.

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 Communication*, v.31, p.488-494, 1968.

ASHIKAGA S., NANAMIYA, H., OHASHI, T., KAWAMURA, F. Natural Genetic Competence in *Bacillus subtilis* Natto OK2. *Journal of Bacteriology*, v.182, p.2411–2415, 2000.

BARROS, F.F.C. Estudo das variáveis de processo e ampliação de escala na produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* em manipueira. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2007.

CAMEOTRA, S. S., MAKAR, R. S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Current Opinion in Microbiology*. v.7, p.262-266, 2004.

CARRILLO, C., TERUEL, J. A., ARANDA, F. J., ORTIZ, A. Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochemica et Biophysica Acta*, v.1611, p.91-97, 2003.

CHALLIS, G.L., NAISMITH, J.H. Structural aspects of non-ribosomal peptide biosynthesis. *Current Opinion in Structural Biology*, v.14, p.748-756, 2004.

CHAMBERLAIN, L.M., J.M. WELLS, K. ROBINSON, K.M. SCHOFIELD, R.W.F. LE PAGE. Mucosal immunization with recombinant *Lactococcus lactis*. In: Pozzi, G.,

Wells, J.M. *Gram-positive bacteria as vaccine vehicles for mucosal immunization*. Biotechnology Intelligence Unit. Landes, Austin, U.S.A. 1997. p.83-106.

CHEN, H., WANG, L., SU, C. X., GONG, G. H., WANG, P., YU Z. L. Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. *Letters in Applied Microbiology*, v.47, p.180-186, 2008.

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. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften, Marburg/Lahn, Germany, 2006.

COLLA, L.M., COSTA, J.A.V. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. *Vetor*, v.13, p.85-103, 2003.

COOPER, D.G., MACDONALD, C.R., DUFF, S.J.B., KOSARIC, N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Applied and Environmental Microbiology*, v.42, p.408-412, 1981.

COSMINA, P., RODRIGUEZ, F., DE FERRA, F., GRANDI, G., PEREGO, M., VENEMA, G. & VAN SINDEREN, D. Sequence and analysis of the genetic locus responsible for surfactin synthesis in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, v.8, p.821-831, 1993.

COSTA, G. A. N. Produção biotecnológica de surfactante de *Bacillus subtilis* em resíduo agroindustrial, caracterização e aplicações. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2005.

DELEU, M., RAZAFINDRALAMBO, H., POPINEAU, Y., JACQUES, P., THONART, P., PAQUOT M. Interfacial and emulsifying properties of lipopeptides from *Bacillus subtilis*. *Colloids and Surfaces A*, v.152, p.3-10, 1999.

DEZIEL, E., LEPINE, F., DENNIE, D., BOISMENU, D., MAMER, O.A., VILLEMUR, R. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. *Biochemica et Biophysica Acta*, v.1440, p.244-252, 1999.

DU, L., CHEN, M., SANCHEZ, C. AND SHEN, B. An Oxidation Domain in the BImIII Nonribosomal Peptide Synthetase Probably Catalyzing Thiazole Formation in the Biosynthesis of the Antitumor Drug Bleomycin in *Streptomyces verticillus* ATCC15003. *FEMS Microbiology Letters*, v.189, p.171-175, 2000.

DUBNAU, D. DNA uptake in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, v.53, p.217-244, 1999.

FERRARI, F.A., NGUYEN, A., LANG, D., HOCH, J.A. Construction and properties of integrable plasmid for *Bacillus subtilis*. *The Journal of Bacteriology*, v.154, p.1513-1515, 1983.

FLASZ, A., ROCHA, C. A., MOSQUERA, B., SAJO, C. A comparative study of the toxicity of a synthetic surfactant and one produced by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 55925. *Journal of Medical Sciences Research*, v.26, p.181-185, 1998.

GUÉROUT-FLEURY, A.M., FRANDSE, N., STRAGIER, P. Plasmids for ectopic integration in *Bacillus subtilis*. *Gene*, v.180, p.57-61, 1996.

GUÉROUT-FLEURY, A.M., SHAZAND, K., FRANDSE, N., STRAGIER, P. Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. *Gene*, v.167, p.335-336, 1995.

GUTTE, B. Peptides: synthesis, structure, and applications. New York: Academic Press, 2000.

HAFENBURG, D., HOMMEL, R., KLEBER, H. Extracellular microbial lipids as biosurfactants. *Advances in Biochemical Engineering*, v.33, p.53-93, 2003.

HANAHAN, D. DNA Cloning: A Practical Approach. Virginia: IRL Press, 1983.

HANCOCK, R.E.W., CHAPLE, D.S. Peptide antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.43, p.1317-1323, 1999.

HARTL, B., WEHRL, W., WIEGERT, T., HOMUTH, G., SCHUMANN, W. Development of a new integration site within the *Bacillus subtilis* chromosome and construction of compatible expression cassettes. *Journal of Bacteriology*, v.183, p.2696-2699, 2001.

HARWOOD, C.R. *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. *Trends in Biotechnology*, v.10, p.247-256, 1992.

HSIEH, F.C., LI, M.C., LIN, T.C., KAO, S.S. Rapid detection and characterization of surfactin-producing *Bacillus subtilis* and closely related species based on PCR. *Current Microbiology*, v.49, p.186-191, 2004.

HUSSAIN, A., ARNOLD, J. J., KHAN, M. A., AHSAN, F., J. Absorption enhancers in pulmonary protein delivery. *Controlled Release*, v.94, p.15-19, 2004.

JARVIS, F.G., JOHNSON, M.J. Glyco-lipide produced by *Pseudomonas Aeruginosa*. *Journal of the American Chemical Society*, v.71, p.4124-4126, 1949.

KAKINUMA, A., HORI, M., SUGIRO, H., YOSHIDA, I., ISONO, M.; TAMURA, G., ARIMA, K. Determination of the location of lactone ring in surfactin. *Agricultural and Biological Chemistry*, v.33, p.1523-1524, 1969.

KAMEDA, Y., MATSUI, K., HISATO, K., YAMADA, T., SAGAI, H. Antitumor activity of *Bacillus natto* III. Isolation and characterization of a cytolytic substance on Ehrlich ascites carcinoma cells in the culture medium of *Bacillus natto* KMD 1126. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v.20, p.1551-1553, 1974.

KARANTH, N. G. K., DEO, P. G., VEENANADIG, N. K. Microbial production of biosurfactants and their importance. *Current Science*, v.77, p.116-126, 1999.

KIM, L., MOGK, A., SCHUMANN, W. A xylose-inducible *Bacillus subtilis* integration vector and its application. *Gene*, v.181, p.71-76, 1996.

KIM, H., YOON, B., LEE, C., SUH, H., OH, H., KATSURAGI, T., TANI, Y.J. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v.84, p.41-46, 1997.

KIM, K., JUNG, S. Y., LEE, D. K., JUNG, J. K., PARK, J. K., KIM, D. K., AND LEE, C. H. Suppression of inflammatory responses by surfactin, a selective inhibitor of platelet cytosolic phospholipase A2. *Biochemical Pharmacology*, v.55, p.975-985, 1998.

KIM, S.H., LIM, E.J., LEE, S.O., LEE, J.D., LEE, T.H.. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L - 417. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v.31, p.249-253, 2000.

KIM, S.Y., KIM, J.Y., KIM, S.H. Surfactin from *Bacillus subtilis* displays anti-proliferative effect *via* apoptosis induction, cell cycle arrest and survival signaling suppression. *FEBS Letters*, v.581, p.865-871, 2007.

KIM, K.M., LEE, J.Y., KIM, C.K., KANG, J.S. Isolation and Characterization of Surfactin Produced by *Bacillus polyfermenticus* KJS-2. *Archives of Pharmacal Research*, v.32, p.711-715, 2009.

KLEIN, C., KALETTA, N., SCHNELL, K.D. Analysis of genes involved in biosynthesis of the lantibiotic subtilin. *Applied and Environmental Microbiology*, v.58, p.132-142, 1992.

KONZ, D., MARAHIEL, M.A. How do peptide synthetases generate structural diversity. *Chemistry & Biology*, v.6, p.39-48, 1999.

KOWALL, M., VATER, J., KLUGE, B., STEIN, T., FRANKE, P., ZIESSOW, D. J. Separation and characterization of surfactin isoforms produced by *Bacillus subtilis*. *Colloid and Interface Science*, v.204, p.1-8, 1998.

KUIPERS, O.P., BEERTHUYZEN, M.M., SIEZEN, R.J., DE VOS, W.M. Characterization of the nisin gene cluster *nisABTCIPR* of *Lactococcus lactis*. Requirement of expression of the *nisA* and *nisI* genes for development of immunity. *European Journal of Biochemistry*, v.216, p.281-291, 1993.

LAMBALOT, R. H., GEHRING, A. M., FLUGEL, R. S., ZUBER, P., LACELLE, M., MARAHIEL, M. A., REID, R., KHOSLA, C., WALSH, C.T. A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases. *Chemistry and Biology*, v.3, p.923-936, 1996.

LEE, Y.K., KIM, S.B., PARK, C.S., KIM, J.G., OH, H.M., YOON, B.D. AND KIM, H.S. Chromosomal integration of *sfp* gene in *Bacillus subtilis* to enhance bioavailability of hydrophobic liquids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.67, p.789-794, 2005.

LIM, J.H., PARK, B.K., KIM, M.S., HWANG, M.H., RHEE, M.H., PARK, S.C., YUN, H.I. The anti-thrombotic activity of surfactins. *Journal of Veterinary Science*, v.4, p.353-355, 2005.

LIN, S.C. Biosurfactants: Recent advances. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v.66, p.109-120, 1996.

LIU, X.Y., YANG, S.H., UM, B.Z. Isolation and characterization of a C12-lipopeptide produced by *Bacillus subtilis* HSO 121. *Journal of Peptide Science*, v.14, p.864-875, 2008.

MACCABE, A., VAN LIEMPT, H., PALISSA, H., UNKLES, S.E., RIACH, M.B.R., PFEIFER, E., VON DOHREN, H., KINGHORN, J.R. Delta-(L-alpha-aminoadipyl)-L-cysteiny-D-valine synthetase from *Aspergillus nidulans*. Molecular characterization of the *acvA* gene encoding the first enzyme of the penicillin biosynthetic pathway. *Journal of Biological Chemistry*, v.266, p.12646-12654, 1991.

MACHADO, A., LIRIA, C.L., PROTI, P.B., REMUZGO, C., MIRANDA, T. Chemical and enzymatic peptide syntheses: basic aspects and applications. *Química Nova*, v.27, p.781-789, 2004.

MAIER, R. M. Biosurfactants: evolution and diversity. *Advances in Applied Microbiology*, v.52, p.101-121, 2003.

MARAHIEL, M.A., STACHELHAUS, T., MOOTZ, H.D. Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chemical reviews*, v.97, p.2651-2673, 1997.

MICHEL, B., NIAUDET, B., EHRLICH, S.D. Intermolecular recombination during transformation of *Bacillus subtilis* competent cells by monomeric and dimeric plasmids. *Plasmid*, v.10, p.1-10, 1983.

MIRONCZUK, A.M., KOVACS, A.T., KUIPERS, O.P. Induction of natural competence in *Bacillus cereus* ATCC14579. *Microbial Biotechnology*, v.1, p.226-235, 2008.

MOLNAR, I., SCHUPP, T., ONO, M., ZIRKLE, R., MILNAMOW, M., NOWAK-THOMPSON, B., ENGEL, N., TOUPET, C., STRATMANN, A., CYR, D.D., GORLACH, J., MAYO, J.M., HU, A., GOFF, S., SCHMID, J., LIGON, J.M. The biosynthetic gene cluster for the microtubule-stabilizing agents epothilones A and B from *Sorangium cellulosum* So ce90. *Chemistry & Biology*, v.7, p.97-109, 2000.

MOOTZ, H., MARAHIEL, M.A. Biosynthetic systems for nonribosomal peptide antibiotic assembly. *Current Opinion in Chemical Biology*, v.1, p.543-551, 1997.

MOOTZ, H. D., SCHWARZER, D., MARAHIEL, M. A. Construction of hybrid peptide synthetases by module and domain fusions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.97, p.5848-5853, 2000.

MORÁN, A.C., MARTÍNEZ, A.M., SINERIZ, F. Quantification of surfactin in culture supernatants by hemolytic activity. *Biotechnology letters*, v.24, p.177-180, 2002.

MORIKAWA, M., DAIDO, H., TAKAO, T., MURATA, S., SHIMONISHI, Y., IMANAKA, T. A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS 38. *Journal of Bacteriology*, v.175, p.6459-6466, 1993.

MUKHERJEE, A.K., DAS, K. Correlation between diverse cyclic lipopeptides production and regulation of growth and substrate utilization by *Bacillus subtilis* strains in a particular habitat. *FEMS Microbiology Ecology*, v.54, p.479-489, 2005.

MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants, *Environmental Pollution*, v.133, p.183-198, 2005.

MUTHUSAMY, K., GOPALAKRISHNAN, S., RAVI, T.K., SIVACHIDAMBARAM, P. Biosurfactants: Properties, commercial production and application. *Current Science*, v.94, p.736-747, 2008.

NAKANO, M.M., CORBELL N., BESSON J., ZUBER P. Isolation and characterization of *sfp*: a gene that functions in the production of the lipopeptide biosurfactant, surfactin, in *Bacillus subtilis*. *Molecular and General Genetics*, v.232, p.313-321, 1992.

NITSCHKE, M. Produção e caracterização de biossurfactante de *Bacillus subtilis* utilizando manipueira como substrato. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2004.

NGUYEN, D.H., NGUYEN, Q.A., FERREIRA, R.C., FERREIRA, L.C.S., TRAN, L.T., SCHUMANN, W. Construction of plasmid-based expression vectors for *Bacillus subtilis* exhibiting full structural stability. *Plasmid*, v.54, p.241-248, 2005.

OKUMURA, K., IWAKAWA, S., YOSHIDA, S., SEKI, T., KOMADA, F. Intratracheal delivery of insulin absorption from solution and aerosol by rat lung. *The International Journal of Pharmaceutics*, v.88, p.63-73, 1992.

OLIVERA, N. L., COMMENDATORE, M. G., MORAN, A. C., ESTEVES, J. L. Biosurfactant-enhanced degradation of residual hydrocarbons from ship bilge wastes. *The Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v.25, p.70-73, 2000.

PEYPOUX, F., BONMATIN, J. M., WALLACH, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.51, p.553-563, 1999.

PHAN, T.T.P., NGUYEN, H.D., SCHUMANN, W. Novel plasmid based expression vectors for intra- and extracellular production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. *Science*, v.46, p.189-195, 2006.

RAJA, A., LABONTE, J., LEBBOS, J., KIRKPATRICK, P. Daptomycin. *Nature Reviews Drug Discovery*, v.2, p.943-944, 2003.

RIVARDO, F. TURNER, R. J. ALLEGRONE, G. CERI, H. MARTINOTTI, M. G. Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus* spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.3, p.541-553, 2009.

ROMANO, E. Manual de transformação genética de plantas. In: extração de DNA de tecidos vegetais. Embrapa, Brasília, 1998.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, vol. I. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. ISBN 0-87969-309-6.

SEYDLOVA, G., SVOBODOVA, J. Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications. *Central European Journal of Medicine*, v.3, p.123-133, 2008.

SHEPHERD, R., ROCKEY, J., SHUTHERLAND, I.W., ROLLER, S. Novel biomulsifiers from microorganisms for use in foods. *Journal of Biotechnology*, v.40, p.207-217, 1995.

SHIMOTSU, H., HENNER, D.J. Construction of a single-copy integration vector and its use in analysis of regulation of the *trp* operon of *Bacillus subtilis*. *Gene*, v.43, p.85-94, 1996.

SINGH, P., CAMEOTRA, S.S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends in Biotechnology*, v.22, p.142-146, 2004.

SINGH A., VAN HAMME J.D., WARD O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology. Part 2. Application aspects. *Biotechnology Advances*, 25, 99-121, 2006.

SONG, Y., TALATY, N., DATSENKO, K., WANNER, B.L., COOKS, R.G. In vivo recognition of *Bacillus subtilis* by desorption electrospray ionization mass spectrometry (DESI-MS). *Analyst*, v.134, p.838-841, 2009.

STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses, and specific functions. *Molecular Microbiology*, v.56, p.845-847, 2005.

STELLER, S., VATER, J. Purification of the fengycin synthetase multienzyme system from *Bacillus subtilis* b213. *Journal of Chromatography*, v.737, p.267-275, 2000.

STUDIER, F.W., MOFFATT, B.A. Use of bacteriophage T7 RNAPolymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, v.189, p.113-130, 1986.

SYMMANK, H., FRANKE, P., SAENGER, W., BERNHARD, F. Modification of biologically active peptides: production of a novel lipohexapeptide after engineering of *Bacillus subtilis* surfactin synthetase. *Protein engineering*, v.15, p.913-921, 2002.

TITOK, M.A., CHAPUIS, Y.V., SELEZNEVA, A.V., LAGODICH, V.A., JANNIERE, L. *Bacillus subtilis* soil isolates: plasmid replicon analysis and construction of a new theta-replicating vector. *Plasmid*, v.49, p.53-62, 2003.

TSUGE, K., ITAYA, M. Recombinational transfer of 100-kb genomic DNA to plasmid in *Bacillus subtilis* 168. *Journal of Bacteriology*, v.183, p.5453-5458, 2001.

VAN WAGENINGEN, A.M., KIRKPATRICK, P.N., WILLIAMS, D.H., HARRIS, B.R., KERSHAW, J.K., LENNARD, N.J., JONES, M., JONES, S.J., SOLENBERG, P. Sequencing and analysis of genes involved in the biosynthesis of a vancomycin group antibiotic. *The Journal of Biological Chemistry*, v.5, p.155-162, 1998.

VOLLENBROICH, D., ÖZEL, M., VATER, J., KAMP, R. M., PAULI, G. Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biologicals*, v.25, p.289-297, 1997.

WEBER, G., SCHORGENDORFER, K., SCHNEIDER-SCHERZER, E., LEITNER, E. The peptide synthetase catalyzing cyclosporine production in *Tolypocladium niveum* is encoded by a giant 45.8-kilobase open reading frame. *Current Genetics*, v.26, p.120-125, 1994.

WU, J. e JU, L.K. Extracellular particles of polymeric material formed in n-hexadecane fermentation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biotechnology*, v.59, p.191-202, 1998.

YAN, X., YU, H.J., HONG, Q., LI, S.P. Cre/lox system and PCR-based genome engineering in *Bacillus subtilis*, *Applied and Environmental Microbiology*, v.74, p.5556-5562, 2008.

YOUSSEF, N.H., DUNCAN, K.E., NAGLE, D.P., SAVAGE, K.N., KNAPP, R.M., MC INERNEY, M.J. Comparasion of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganism. *Journal of Microbiology Methods*, v.56, p.339-347, 2004.

ZAJIC, J. E., SEFFENS, W. Biosurfactants. *Critical Review in Biotechnology*, v.1, p.87-107, 1984.