

### CESAR AUGUSTO PIEDRAHITA AGUIRRE

# "ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ITURINA POR *Bacillus subtilis,* EM FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA UTILIZANDO COMO SUBSTRATO FARELOS DE SOJA, ARROZ, TRIGO E CASCA DE ARROZ"

# "STUDY OF THE PRODUCTION OF ITURIN BY *Bacillus subtilis* IN SOLID STATE FERMENTATION USING AS SUBSTRATE SOYBEAN MEAL, RICE MEAL, WHEAT BRAN AND HUSK RICE"

CAMPINAS - SP 2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

### **CESAR AUGUSTO PIEDRAHITA AGUIRRE**

## "ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ITURINA POR *Bacillus subtilis,* EM FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA UTILIZANDO COMO SUBSTRATO FARELOS DE SOJA, ARROZ, TRIGO E CASCA DE ARROZ"

### "STUDY OF THE PRODUCTION OF ITURIN BY *Bacillus subtilis* IN SOLID STATE FERMENTATION USING AS SUBSTRATE SOYBEAN MEAL, RICE MEAL, WHEAT BRAN AND HUSK RICE"

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Thesis presented to the Faculty of Food Engineering of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Food Engineering.

Orientador: Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO CESAR AUGUSTO PIEDRAHITA AGUIRRE E ORIENTADA PELO PROF. DR. RANULFO MONTE ALEGRE

### CAMPINAS - SP 2013

Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos Claudia Aparecida Romano de Souza - CRB 8/5816

 Piedrahita Aguirre, Cesar Augusto, 1980-Estudo da produção de iturina por *Bacillus subtilis*, em fermentação semisólida utilizando como substrato farelos de soja, arroz, trigo e casca de arroz / Cesar Augusto Piedrahita Aguirre. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.
 Orientador: Ranulfo Monte Alegre. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Bacillus subtilis*. 2. Fermentação. 3. Bioreatores. 4. Lipopeptideos. I. Monte Alegre, Ranulfo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

#### Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Study of production of iturin by Bacillus subtilis in solid state fermentation using as substrate soybean meal, rice meal, wheat bran and husk rice Palavras-chave em inglês: Bacillus subtilis Fermentation Bioreactors Lipopeptides Área de concentração: Engenharia de Alimentos Titulação: Doutor em Engenharia de Alimentos Banca examinadora: Ranulfo Monte Alegre [Orientador] Alexandre Nunes Ponezi Crispin Humberto Garcia Cruz Reinaldo Gaspar Bastos Vanildo Luiz Del Bianchi Data de defesa: 19-11-2013 Programa de Pós-Graduação: Engenharia de Alimentos

#### COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre (FEA/UNICAMP) - Orientador

Prof. Dr. Alexandre Ponezzi - (CPQBA/UNICAMP) - Membro Titular

Profa. Dra. Telma Teixeira Franco - (FEQ/UNICAMP) - Membro Titular

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi (IBILCE/UNESP) - Membro Titular

Prof. Dr. João Claudio Thomeo (IBILCE/UNESP) - Membro Titular

Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos (CCA/UFSCAR) - Membro Suplente

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo (FEA/UNICAMP) - Membro Suplente

Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz (IBILCE-UNESP) - Membro Suplente

### **RESUMO GERAL**

Este trabalho se propôs a estudar a produção da iturina A por Bacillus subtilis em fermentação semi-sólida em biorreatores de leito empacotado. O trabalho foi desenvolvido em quatro partes. Em uma primeira parte foi feito um *screening* com cepas silvestres e seus mutantes obtidos a partir da exposição de luz UV e acridina laranja. A cepa Bacillus subtilis subsp. subtilis NRRL NRS-1270 foi a que apresentou maior atividade antagônica contra os fungos Aspergillus fumigatus Fresenius NRRL 164, Aspergillus fumigatus Fresenius NRRL 166 e Aspergillus flavus var. oryzae NRRL 484. O extrato metanólico obtido da fermentação semi-sólida do Bacillus subtilis subsp. subtilis NRRL NRS-1270 foi analisado através da espectrometria de massas encontrando-se lipopeptídeos com massa molecular entre m/z 1021,43 e m/z 1087,48, mas sem a presença da iturina A. Em uma segunda etapa a cepa Bacillus Iso 1 foi isolada a partir das raízes de soja, e ante a dificuldade de identificar a iturina A através da cromatografia liquida de alta eficiência (HPLC), foi desenvolvida a metodologia de purificação da iturina A utilizando a cromatografia em coluna de vidro preenchida com sílica gel 60. A iturina A foi eluída com três sistemas de solventes compostos por 20 mL de clorofórmio-metanol-água (65:25:4, v/v/v), fração 1, seguido de 20 mL de clorofórmio-metanol-água (30:50:10, v/v/v), fração 2, e a fração final composta por 10 mL de clorofórmio-metanol-água (20:60:15, v/v/v). As frações obtidas foram analisadas através da HPLC e da espectrometria de massa, identificando 5 isômeros da iturina A (C13-C16). Na terceira etapa, foi feito um delineamento composto central rotacional (DCCR) para avaliar o efeito da casca de arroz como suporte inerte e da vazão volumétrica de ar na produção de iturina A; como substratos foram utilizados o farelo de soja desengordurado e o farelo de trigo. Nenhuma variável do DCCR foi estatisticamente significativa, mas operacionalmente foram importantes, devido à redução da oxigenação do Bacillus Iso 1 pela baixa vazão de ar e menor concentração de casca de arroz, favorecendo a produção de iturina; nestas condições obteve-se 6,88 g/kg de substrato seco de iturina A.

Esta é a maior quantidade de iturina A produzida em biorreatores de leito empacotado (coluna) com aeração forçada até hoje. Na quarta etapa, a partir dos resultados obtidos no DCCR foram estudados os parâmetros do processo: queda de pressão, consumo de oxigênio e perfis de temperatura, visando entender o comportamento da fermentação a 0,4 L/min e 0,8 L/min. A máxima produção de iturina obtida foi 5,58 g/kg de substrato seco com a vazão de 0,4 L/min. O incremento na queda de pressão é ocasionado não unicamente pelo incremento da vazão volumétrica, mas também pela produção do biopolímero  $\gamma$ -PGA o qual ocupa os espaços livres entre as partículas, dificultando o fluxo normal de ar através do leito, reduzindo o consumo de oxigênio. A baixa oxigenação favoreceu a alta produção da iturina A e gerou baixo calor metabólico (5,75 W/kg-dry substrato min). Os resultados obtidos podem ser úteis na elaboração de estratégias para ampliação de escala do processo em fermentadores aerados de leito empacotado.

### ABSTRACT

This work covers a study of the production of iturin A by *Bacillus* by solid-state fermentation in packed bed bioreactors. The study was conducted in four parts. At first a screening was conducted with wild strains and their mutants obtained from exposure to UV light and mutagenic agent acridine orange. The strain Bacillus subtilis subsp subtilis NRRL NRS 1270 showed the highest antagonistic activity against Aspergillus fumigatus NRRL 164, Aspergillus fumigatus NRRL 166 and Aspergillus flavus var . oryzae NRRL 484. A methanolic extract obtained by solid state fermentation of Bacillus subtilis subsp subtilis NRRL NRS 1270 was analyzed with mass spectrometry showing lipopeptides with molecular mass between m/z 1021.43 and m/z 1087.48, but without the presence of iturin A. In the second stage, the strain *Bacillus Iso* 1 was isolated from soybean roots. Given the difficulty of identifying iturin A by high performance liquid chromatography (HPLC), a iturin A purification methodology was developed using glass column chromatography packed with activated Silica gel 60 and alumina. This methodology involved three solvent systems for elution of the iturin A from the column. A first fraction consisted of 20 ml of chloroform-methanol-water (65:25:4, v/v/v) and was followed by 20 ml of chloroform methanol- water (30:50:10, v/v/v), that was then followed by a final fraction consisting of 10 ml of chloroform-methanol-water (20:60:15, v/v/v). The fractions obtained of fermentation were analyzed by both HPLC and mass spectrometry, identifying five iturin A isomers ( $C_{13}$ - $C_{16}$ ). In the third stage of the study, an experimental design was constructed in the form of a central composite rotational design (CCRD) to evaluate the effect of rice husk as an inert support and air flow rates to the iturin A production, using defatted soybean meal and wheat bran as substrate. Although none of the studied variables showed statistical significance, the operational importance of reduction of oxygenation of the *Bacillus Iso* 1 fermentation due to the low concentration of rice husk and air flow rate was observed to favor the production of iturin; in these conditions high productivity was obtained reaching 6.88 g/kg-dry substrate of iturin A. Concluding from available literature, this is the highest concentration of iturin A ever produced in packed bed bioreactor (column) with forced aeration to date. In the fourth stage, in order to understand the behavior of the fermentation

under aeration conditions between 0.4 L/min and 0.8 L/min, the following process parameters were studied, based on the results obtained from the CCRD: pressure drop, oxygen consumption and temperature profiles. The maximum production of iturin obtained was 5.58 g/kg-dry substrate with the air flow rate at 0.4 L/. The increase of the pressure gradients is caused not only by increasing the volumetric air flow rate but also by the production of biopolymer  $\gamma$ -PGA by *Bacillus iso* 1, which occupies the free interparticle space, hindering or preventing the normal flow of air through the bed and thus leading to reduced oxygen consumption. The low oxygenation favored the high iturin A production and resulted in low metabolic heat generation (5.75 W/kg-dry substrate.min). The results of this work are expected to be conducive for designing strategies to scale up the process in aerated packed bed bioreactors.

# SUMÁRIO

RESUMO GERALvii
ABSTRACTix
SUMÁRIOxi
LISTA DE ILUSTRAÇÕESxxi
LISTA DE TABELASxxv
CAPÍTULO 1: Apresentação do trabalho e revisão bibliográfica1
1.1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA
1.2 OBJETIVOS
1.2.1 OBJETIVOS GERAIS6
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS
1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA7
1.3.1 FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA7
1.3.2 BIORREATORES PARA FSS
1.3.3 PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DA FSS14
1.3.4 LIPOPEPTÍDEOS
1.3.5 ITURINA A
1.3.6 PRODUÇÃO DE ITURINA A EM FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA20
1.3.7 PURIFICAÇÃO DA ITURINA A22
1.4 ESTRATÉGIAS ADOTADAS24
1.5 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA25
CAPÍTULO 2: Antagonismo de diferentes cepas do Bacillus contra Aspergillus flavus
var. oryzae e Aspergillus fumigatus
2.1 INTRODUÇÃO
2.2 MATERIAL E MÉTODOS
2.2.1 MICRO-ORGANISMO E SUA MANUTENÇÃO
2.2.2 PREPARO DO INÓCULO40

2.2.3 INDUÇÃO À MUTANOGÊNESE	40
2.2.4. SELEÇÃO DOS BACILLUS COM ATIVIDADE ANTAGÔNICA	41
2.2.5. ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS BACILLUS	41
2.2.6 FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA	42
2.2.7 ESPECTROMETRIA DE MASSAS	43
2.3 RESULTADOS	43
2.3.1 ATIVIDADE ANTAGÔNICA	43
2.3.2 ATIVIDADE HEMOLÍTICA	45
2.3.3 EXTRAÇÃO E ESPECTROMETRIA DE MASSA	46
2.4 DISCUSSÃO	47
2.5 CONCLUSÃO	48
2.6 AGRADECIMENTOS	49
2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
CAPÍTULO 3: Rapid purification and quantification of lipopeptide iturin A prod	uced
in solid state fermentation by a new strain. <i>Bacillus Iso</i> 1	
3.1 INTRODUCTION	57
3.1 INTRODUCTION	57 59
3.1 INTRODUCTION	<b>57</b> <b>59</b> 59
3.1 INTRODUCTION	<b>57</b> <b>59</b> 59 60
3.1 INTRODUCTION	<b>57</b> <b>59</b> 60 60
3.1 INTRODUCTION	<b>57</b> <b>59</b> 60 60 60
3.1 INTRODUCTION	<b>57</b> <b>59</b> 60 60 60 61
3.1 INTRODUCTION	<b>57</b> <b>59</b> 60 60 61 61
3.1 INTRODUCTION	57 59 60 60 61 61 61
3.1 INTRODUCTION	57 59 60 60 61 61 61 62 62
3.1 INTRODUCTION	57 59 60 60 61 61 61 62 62 62 62
3.1 INTRODUCTION	57 59 60 60 61 61 61 62 62 62 63
3.1 INTRODUCTION	60 60 60 61 61 62 62 63 63 65

3.5 CONCLUSIONS	70
3.6 REFERENCES	70
CAPÍTULO 4: Production of lipopeptide Iturin A using novel strain Bacillus	<i>iso</i> 1 in
a Packed Bed Bioreactor	77
4.1 INTRODUCTION	80
4.2 MATERIAL AND METHODS	82
4.2.1 MICROORGANISM AND CULTURE CONDITIONS	
4.2.3 EXTRACTION AND PURIFICATION OF ITURIN A	
4.2.4 REAGENTS	
4.2.5 ANALYSIS	
4.3 RESULTS AND DISCUSSION	
4.4 CONCLUSIONS	
4.5. REFERENCES	90
CAPÍTULO 5: The influence of process parameters in production of lipo	peptide
iturin a using aerated packed bed bioreactors in solid state fermentation	95
5.1 INTRODUCTION	99
5.2 METHODOLOGY	
5.2.1 MICROORGANISM	101
J.2.1 WIEROOROANIJIW	101
5.2.2 SOLID STATE FERMENTATION MEDIUM	<b>101</b> 101
5.2.2 SOLID STATE FERMENTATION MEDIUM 5.2.3 SOLID STATE FERMENTATIONS	<b> 101</b> 101 102 102
<ul> <li>5.2.1 MICROOROTTION 1</li> <li>5.2.2 SOLID STATE FERMENTATION MEDIUM</li> <li>5.2.3 SOLID STATE FERMENTATIONS</li> <li>5.2.4 DETERMINATION OF γ-POLYGLUTAMIC ACID (γ-PGA)</li> </ul>	<b> 101</b> 101 102 102 103
<ul> <li>5.2.1 MICROOROTHISM</li> <li>5.2.2 SOLID STATE FERMENTATION MEDIUM</li> <li>5.2.3 SOLID STATE FERMENTATIONS</li> <li>5.2.4 DETERMINATION OF γ-POLYGLUTAMIC ACID (γ-PGA)</li> <li>5.2.5 DETERMINATION OF ITURIN A</li> </ul>	<b> 101</b> 101 102 102 103 104
<ul> <li>5.2.1 MICROORONI (ISM 1990)</li> <li>5.2.2 SOLID STATE FERMENTATION MEDIUM</li></ul>	101 101 102 102 103 104 105
<ul> <li>5.2.1 MICROORONI (ISM 1990)</li> <li>5.2.2 SOLID STATE FERMENTATION MEDIUM</li></ul>	101 101 102 102 103 104 105
<ul> <li>5.2.1 MICROORONI (IGM 1)</li> <li>5.2.2 SOLID STATE FERMENTATION MEDIUM</li></ul>	101 101 102 102 103 103 104 105 BED 108
<ul> <li>5.2.1 MICROORONI (IGM 1)</li> <li>5.2.2 SOLID STATE FERMENTATION MEDIUM</li></ul>	101 101 102 102 103 103 104 105 BED 108 111
<ul> <li>5.2.1 MICROORGATHISM</li> <li>5.2.2 SOLID STATE FERMENTATION MEDIUM</li> <li>5.2.3 SOLID STATE FERMENTATIONS</li> <li>5.2.4 DETERMINATION OF γ-POLYGLUTAMIC ACID (γ-PGA)</li> <li>5.2.5 DETERMINATION OF ITURIN A</li> <li>5.3 RESULTS AND DISCUSSION</li> <li>5.3.1 PRODUCTION OF ITURIN A</li> <li>5.3.2 PRESSURE DROP IN THE COLUMN AND PERMEABILITY OF THE</li> <li>5.3.3 TEMPERATURE GRADIENTS</li> <li>5.4 CONCLUSION</li> </ul>	101 101 102 102 103 103 104 105 BED 108 111 113

CAPÍTULO 6: Conclusões e sugestões para trabalhos futuros
6.1 CONCLUSÕES GERAIS121
6.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 122
APÊNDICE A: Preparação do meio de cultura para a fermentação submersa 123
APÊNDICE B: Curva de crescimento e consumo de oxigênio do Bacillus iso 1 em
fermentação submersa127

"El conocimiento es una aventura incierta que conlleva en sí misma y permanentemente el riesgo de ilusión y de error."

(Edgar Morin)

"Los grandes conocimientos engendran las grandes dudas."

(Aristóteles)

Este trabalho é dedicado a Andrea e minha família

companheiros nas horas mais difíceis

e grandes incentivadores de meus pensamentos.

### AGRADECIMENTOS

A meus pais, Jose Ariosto e Amparo, minha irmã, Tatiana e meu cunhado, Juan Carlos, pelo carinho e apoio incondicional.

Ao Prof. Ranulfo pela orientação e incentivo ao desenvolvimento da tese, pela paciência e exemplo de profissional, sempre aguçando a nossa curiosidade científica.

Aos membros da Comissão Examinadora pela contribuição e auxílio.

Às Professoras Susanne Rath e Ljubica Tasic pelo apoio e colaboração incondicional no desenvolvimento desta tese.

À Claudinha, amiga incrível e forte que eu tive o prazer de conhecer e de contar nesses 5 anos no laboratório, um grande exemplo de ser humano.

Aos meus colegas e amigos de laboratório, Gabriel, Tatiane, Beatriz, Renato, Andreia, Meiri, Jenny, Silvia e Yaneth..... pelos bons momentos e conselhos.

Aos meus amigos, Remi, Nenis, Lucielen, Geraldo, Alexandre e Olga, pessoas maravilhosas que conheci aqui em Campinas e que me dão alegria todas as vezes que encontro ou falo, nem que seja pela internet.

Ao meu grande amigo, Marcus Bruno... Amigo incondicional e exemplo de ser humano, obrigado pelos conselhos e conversas animadas...

A dona Maria, grande pessoa e companheira de boas conversas... Obrigado...

A Mauro, Fredão e Reinaldo, obrigado pela colaboração.

A Marcos e Cosme, funcionários exemplares.... Muito obrigado mesmo.....

Ao Departamento de Engenharia de Alimentos da Unicamp e à FAPESP por tornarem possível a realização deste trabalho

# LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 11
<b>Figura 1.1:</b> Tipos de biorreatores utilizados na fermentação em estado sólido, classificados segundo agitação e aeração. Adaptado de Mitchell et al. (2000)
Figura 1.2: Biorreator tipo bandeja. Fonte: Ali e Zulkali. (2011)10
<b>Figura 1.3:</b> Biorreatores de leito empacotado: a) Desenho tradicional. b) Tubo perfurado no eixo central (coluna). Fonte: Mitchell, Krieger e Berovic, 2006 <b>11</b>
Figura 1.4: Biorreatores de tambor rotativo: a) Tambor rotativo. b) Tambor agitado. Fonte:Mitchell, Krieger e Berovic (2006).12
<b>Figura 1.5:</b> Biorreatores de leito fluidizado. a) Biorreator de leito fluidizado; b) Biorreator de leito fluidizado com fluidização central. Fonte: Mitchell, Krieger e Berovic, (2006). <b> 13</b>
Figura 1.6: Distribuição das patentes entre as três principais categorias14
Adaptado de Gasparotto et al. (2012)14
Figura 1.7: Estrutura primaria: (A) Surfactina; (B) Iturina; (C) Fengicina16
Fonte: Kanlayavattanakul e Lourith (2010)16
Figura 1.8: Estrutura química e isômeros da iturina A18
Fonte: Bland. (1996); Moran et al. (2009)
Figura 1.9: Esquema da síntese dos lipopeptídeos da família iturina
Fonte: Duitman et al. (1999)
CAPÍTULO 2

Figura 2.3: Espectro de massas de extrato etanólico da fermentação em estado sólido do B.subtilis subps. subtilis NRRL NRS-1270.47
CAPÍTULO 3
<b>Figure 3.1:</b> Chromatogram of Iturin A (20 $\mu$ g mL <sup>-1</sup> ) on a ODS Hypersil® RP-18 column (150 ×4.6 mm, 3 $\mu$ m). Mobile phase methanol-water (70:30, v/v); flow rate: 1.0 mL min <sup>-1</sup> and $\lambda$ = 270 nm
<b>Figure 3.2:</b> Chromatogram of fractions (a) $P_2$ and (b) $Y_4$ on a ODS Hypersil® RP-18 column (150 ×4.6 mm, 3 µm). Mobile phase methanol-water (70:30, v/v); flow rate: 1.0 ml min <sup>-1</sup> and $\lambda$ : 270 nm
<b>Figure 3.3:</b> MALDI(+)-QTOF mass spectra for A) Iturin A Sigma standard; B) fraction Y <sub>4</sub> and C) fraction P <sub>2</sub>
Figure 3.4: H NMR spectra for A) Iturin A Sigma standard; B) fraction Y <sub>4</sub> and C) fraction P <sub>2</sub>
CAPÍTULO 4
Figure 4.1: Iturin A production per experiment according to the central composite rotatable design (CCRD) after 96 h of fermentation
<b>Figure 4.2:</b> Pareto chart showing the standardized effect of the linear and quadratic terms. $(X_1: \text{ air flow rate, } X_2: \text{ rice husk})$ on the iturin A production in comparison to a 5% level of significance
CAPÍTULO 5
Figure 5.1: Schematic of fermentation in packed bed bioreactors
<b>Figure 5.2:</b> Profiles of iturin A and $\gamma$ -PGA production for the different air volumetric flow rates: (- • -) concentration of iturin A (0.4 L/min); (- • - ) concentration of iturin A (0.8 L/min); ( • $\Delta$ · · · ) concentration of $\gamma$ -PGA (0.4 L/min); ( - • - ) concentration of $\gamma$ -PGA (0.8 L/min). <b>106</b>
<b>Figure 5.3:</b> Profile of oxygen consumption during solid state fermentation submitted to different air flow rates: () 0.4 L/min and ( 0 ) 0.8 L/min
<b>Figure 5.4:</b> Profile of the pressure drop variation during solid state fermentation at different air volumetric flow rates: (- • -) 0.4 L/min and ( • -) 0.8 L/min109
Figure 5.5: Experimental profile of temperature obtained in the production of iturin A for solid state fermentation at the flow rate of 0.8 L/min. Inlet air temperature (T1),

solid state fermentation at the flow rate of 0.8 L/min. Inlet air temperature (T1), temperature at 5 cm of the bed (T2), temperature at 10 cm of the bed (T3), temperature at the bioreactor wall (T4) and temperature in the head space of the bioreactor (T5)......111

**Figure 5.6:** Experimental profile of temperature obtained in the production of iturin A for solid state fermentation at the flow rate of 0.4 L/min. Inlet air temperature (T1), temperature at 5 cm of the bed (T2), temperature at 10 cm of the bed (T3), temperature at the bioreactor wall (T4) and temperature in the head space of the bioreactor (T5)......112 Figura A.1: Esquema utilizado na elaboração do meio da fermentação submersa. Fonte: Figura B.1: Esquema utilizado na fermentação submersa (Costa, 1996).....130 Figura B.2: Condutividade elétrica da solução de NaOH 1 N e curva de crescimento do Bacillus Iso 1 em fermentação submersa. (- • -) concentração celular em g/L; (- -) condutividade elétrica da solução NaOH (mS). .....131 Figura B.3: Curva de consumo de oxigênio e crescimento do Bacillus Iso 1 em fermentação submersa. (- -) Consumo de oxigênio mg O<sub>2</sub>/L; (- • -) concentração Figura B.4: Curva de consumo de oxigênio e crescimento do Bacillus Iso 1 em fermentação submersa. (- -) Consumo de oxigênio mg O<sub>2</sub>/L; (- • -) concentração celular em g/L.....132

### LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2
Tabela 2.1: Solução nutriente modificada de AKPA et al. 2001 em g/L42
Tabela 2.2: Meio 3S modificado de SHODA et al. 2006 em g/L.
Tabela 2.3: Atividade antagônica de diferentes cepas de Bacillus contra Aspergillus fumigatus fresenius NRRL 164, Aspergillus fumigatus fresenius NRRL 166 e Aspergillus flavus var. oryzae NRRL 484. A inibição é expressa em porcentagem de inibição radial (%).
CAPÍTULO 477
Table 4.1: Range of the values for the independent variables investigated in the central composite rotatable design (CCRD)
Table 4.2: Matrix of the central composite rotatable design (CCRD) (coded and real values) with responses in terms of iturin A production (after 96 h of fermentation)
CAPÍTULO 5
Table 5.1: Variation of bed height and moisture content of the solid medium
<b>Table 5.2:</b> Reynolds number ( $Re_k$ ) and permeability of the packed bed ( $k$ )

# **CAPÍTULO 1**

Apresentação do trabalho e revisão bibliográfica

### 1.1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A preocupação mundial pelo modelo de desenvolvimento econômico predativo no qual estão imersas todas as sociedades. Este conflito entre o ser humano e meio ambiente tornou-se mais visível devido as consequências que as mudanças climáticas estão deixando em nosso planeta, sendo que a biotecnologia não esta alheia a esta situação, devido ao deterioro dos ecossistemas ricos em micro-organismos e matérias-primas com potencial biotecnológico. O potencial econômico que o Brasil tem, por ser o país com maior biodiversidade do mundo, mas isso depende da valorização de sua biodiversidade e do aproveitamento responsável da mesma, com destaque ao setor da biotecnologia. Em demasia à demanda crescente por novos produtos e por processos de produção menos poluentes, pesquisadores têm optado na fermentação semi-sólida (FSS) como alternativa de aproveitamento da biodiversidade. Nos últimos 20 anos, diferentes estudos têm demonstrado as vantagens que a FSS tem sobre a fermentação submersa (FS) como: maiores rendimentos de produção e produtos mais estáveis, custos operacionais e de capital mais baixos devido à utilização de resíduos agroindustriais como substratos e o baixo consumo de água que reduz gastos operacionais e evita o tratamento de efluentes. Apesar das vantagens da FSS sobre a FS, a maioria dos estudos e propostas é em escala laboratorial, já que o entendimento dos fenômenos de transporte na FSS ainda está imaturo quando comparados à FS, devido à heterogeneidade dos substratos e fisiologia dos microorganismos, assim como à complexidade dos processos de separação e purificação (Gasparotto et al., 2012).

A fermentação semi-sólida representa uma área da biotecnologia com elevado potencial a ser explorados para a produção de produção de novas biomoléculas. Os lipopeptídeos cíclicos tem despertado o interesse da indústria farmacêutica, agrícola e química por suas propriedades surfactantes, antibacterianas e antifúngicas. A iturina A é um exemplo biomolécula, cuja produção por FSS conta com número significativo de publicações, entretanto sua produção em biorreatores por FSS necessita ser investigada.

A iturina A é um metabolito secundário produzido por cepas do gênero *Bacillus*, composto por um ácido graxo  $\beta$ -amino (C<sub>13</sub>-C<sub>17</sub>) ligado a um anel peptídico de 7

3

aminoácidos. A configuração *n*-, *iso-* ou *antesio* da cadeia alquílica dá origem à iturina  $A_1$ - $A_8$ , sendo o isômero predominante a iturina  $A_2$  que tem a configuração *n*- $C_{14}$ . Este lipopeptídeo é considerado um poderoso antifúngico por sua capacidade de permeabilizar a parede celular de fungos e leveduras (Thimon et al., 1995) e em alguns casos desintegra a parede celular de bactérias fitopatogênicas (Etchegaray et al., 2008). A iturina A é produzida industrialmente e comercializada pela Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) em quantidades de 1 e 5 mg com preços entre 120 e 450 dólares. Devido ao elevado valor deste lipopeptídeo torna-se inviável utilizar o padrão em testes ou estudos que requeiram grandes quantidades. Já que a maioria de trabalhos foca-se no descobrimento de novas cepas e na produção em nível de bancada (Thimon et al., 1995; Monteiro; Mariano; Souto-Mayor, 2005; Etchegaray et al., 2008), produção em FS (Besson et al., 1976; Ohno; Ano; Shoda, 1993; Jacques et al., 1999; Akpa et al., 2001; Rahma et al., 2007; Ano et al., 2009; Ohno et al., 2009) e purificação (Razafindralambo et al., 1993; Ohno et al., 1993; Bernal; Illanes; Ciampi, 2002; Kim et al., 2004).

Cabe ressaltar que, nos trabalhos de produção de iturina A em FSS, têm sido utilizadas diversas linhagens de Bacillus isoladas de diversos ambientes como: Bacillus subtilis NB22, Bacillus subtilis RB14, Bacillus subtilis RB14-CS, Bacillus subtilis S3 e Bacillus subtilis 3-10, cada uma com diferentes características de produção (Ohno et al., 1995; Mizumoto et al., 2006; Shih et al., 2008; Yao et al., 2012). Por isso, neste trabalho foram feitos estudos de seleção de cepas de Bacillus para produção de iturina A utilizando testes de antagonismo e de hemólise. Os procedimentos analíticos como espectrometria de massas, cromatografia de camada delgada e cromatografia liquida de alta eficiência foram usados para identificar a produção da iturina A e assim selecionar a cepa produtora deste lipopeptídeos. Algumas das metodologias de purificação de lipopeptídeos implementadas na FSS são adaptadas da FS como: extração com solventes, precipitação e extração em fase sólida (Ohno et al., 1993; Razafindralambo et al., 1993; Wang et al., 2008; Yao et al., 2012), mas em alguns casos, pela composição química do substrato, heterogeneidade e a produção de outros compostos além da iturina A, não se adequam ao tipo de processo impedindo a identificação e quantificação deste lipopeptídeo. Por isso, foi desenvolvida neste trabalho uma metodologia própria que permitisse extrair e purificar a iturina A produzida, sem a interferência do elevado teor proteico do substrato usado nesta tese (40%) e do biopolimero ácido  $\gamma$ -poliglutâmico ( $\gamma$ -PGA) produzido simultaneamente com a iturina.

Na produção de iturina A, têm sido utilizados diversos tipos substratos, como: farelos de trigo, de canola e okara, sendo que okara é o mais amplamente pesquisado. A grande maioria destes trabalhos foram feitos em diversos tipos de recipientes como biorreatores, entre os quais encontramos frascos erlenmeyer, câmaras de fermentação, garrafas e colunas de vidro sem controle de vazão volumétrica de ar e queda de pressão (Ohno et al., 1992; Ohno et al., 1995; Khan et al., 2012; Yao et al., 2012).

Nesse contexto e levando em consideração que não se tem informação sobre os efeitos da queda de pressão, consumo de oxigênio, permeabilidade do leito, vazão volumétrica de ar e incrementos de temperatura no leito na produção deste lipopeptideo. O biorreator de leito empacotado com injeção de ar, apresenta-se como uma alternativa interessante na tentativa de estudar o efeito destes parâmetros na produção de iturina A por fermentação semi-sólida.

#### **1.2 OBJETIVOS**

#### **1.2.1 OBJETIVOS GERAIS**

O presente trabalho teve como objetivo principal a produção de iturina A em biorreatores de leito empacotado, utilizando como suportes o farelo de soja e trigo e a casca de arroz como suporte inerte, por cultivo da bactéria *Bacillus Iso* 1.

### 1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Selecionar cepas e *Bacillus subtilis* capazes de produzir o lipopeptídeo iturina A;

b) Desenvolver metodologia de purificação que se adapte as necessidades e às necessidades e as características do processo;

c) Estudar o efeito da casca de arroz como agente para manter a porosidade (bulking agent) na vazão volumétrica de ar em biorreatores de leito empacotado;

 d) Avaliar o efeito dos gradientes de pressão, perfis de temperatura e umidade na fermentação em biorreatores de leito empacotado;

e) Relacionar o perfil de consumo de oxigênio na produção de iturina A;

### 1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.3.1 FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA

A grande maioria de metabolitos secundários são produzidos em fermentação submersa (FS) (Robinson et al., 2001), não entanto a fermentação semi-sólida (FSS) pode ser uma alternativa para produzir tais moléculas, devido a similaridade entre as condições de fermentação e os ambientes nos que se encontram os micro-organismos (Barrios-Gonzales; Fernández; Tomasini, 2003). A FSS é definida como a fermentação envolvendo sólidos na ausência (ou quase ausência) de água não ligada, no entanto, o substrato deve possuir a umidade suficiente para suportar o crescimento e permitir o metabolismo do micro-organismo (Pandey, 2003). A FSS foi praticamente esquecida nos países ocidentais após os anos 40, quando se iniciou a produção de antibióticos em escala industrial por FS devido às facilidades técnicas de controle de temperatura, pH, composição do meio, agitação e taxa de aeração (Barrios-Gonzales; Fernández; Tomasini, 2003; Holker e Lenz, 2005). A FSS chama atenção de pesquisadores por ser uma tecnologia de baixo custo, já que requer baixo consumo de energia, gera poucos efluentes e permite aproveitar resíduos e sub-produtos agroindustriais que poluem o meio ambiente, transformando-lhes em produtos de alto valor agregado como: enzimas, antibióticos, surfactantes, defensivos agrícolas, biocombustíveis, etc (Barrios-Gonzales; Fernández; Tomasini, 2003; Singhania et al., 2009). A FSS tem evoluído bastante com reflexo no crescente numero de trabalhos científicos, patentes e novas aplicações desta tecnologia como: biorremediação, biolixiviação e biopolpação, etc. (Pandey, 2003).

Neste tipo de processo o substrato deve ser de baixo custo, abundante e adequado para o micro-organismo e produção do metabólito alvo. Muitas vezes, pelas características físico-químicas do meio utilizado, este pode dificultar a reprodutibilidade do processo e purificação do produto final (Mitchell et al., 2006; Pandey, 2003).

Muito se discute sobre as vantagens da FSS comparadas com a FS tais como: alta produção de compostos em curtos períodos de tempo, menor custo do substrato, maior

7

estabilidade do produto, menor repressão catabólica, menor gasto energético, produção de metabólitos secundários e menor risco de contaminação pela baixa atividade de água do substrato, mas todas estas vantagens são, em sua grande maioria, em nível de laboratório (Holker; Hofer; Lenz, 2004; Singhania et al., 2009; Barrios-Gonzales, 2012).

### **1.3.2 BIORREATORES PARA FSS**

A FSS tem enorme potencial para ser utilizada em nível industrial, mas apresenta algumas desvantagens comparadas à FS que dificultam o processo de ampliação de escala. Dificuldades na obtenção e purificação dos produtos, controle de parâmetros como gradientes de temperatura, pH, umidade, tamanho de partícula, concentração de biomassa e substrato. Nos últimos anos, têm surgido biorreatores que permitem monitorar estes parâmetros, mas apesar disto há carência de informação sobre desenho e operação de biorreatores em grande escala (Mienda; Idi; Umar, 2011). Geralmente os tipos de biorreatores utilizados nos processos de FES são: leito fixo, tambor rotativo e leito fluidizado (Figura 1.1), cada um destes apresentam características particulares que fazem-lhes apropriados para determinados processos e micro-organismos.

A escolha do biorreator mais adequado para o processo de FSS vai depender dos seguintes critérios (Mitchell, Krieger e Berovic, 2006):

- O micro-organismo é sensível à agitação;
- Quão rápido cresce o micro-organismo e si é susceptível a incrementos da temperatura;
- Que tipo de produto o micro-organismo produz;
- Quais são os requerimentos de aeração do sistema;
- Qual é o grau de assepsia que o processo requer;
- Quais são os custos de operação;
- Quantidade de substrato a ser fermentado.

Devido a os anteriores critérios existe uma variedade de biorreatores que se ajustam para cada tipo de processo de FSS e estes são classificados segundo a agitação ou aeração em quatro grupos como mostra a Figura 1.1 (Mitchell, Krieger e Berovic, 2006).





#### 1.3.2.1 BIORREATOR DE BANDEJA

O biorreator de bandeja é o mais antigo e quem apresenta a tecnologia mais simples entre os biorreatores utilizados na FSS. Este tipo de biorreator é uma câmara com controle de temperatura e umidade na qual as bandejas são empilhadas uma por cima da outra com uma distancia de poucos centímetros, permitindo a circulação de ar úmido que remove o calor metabólico gerado e fornece oxigênio aos micro-organismos como mostra a Figura 1.2 (Durand, 2003). Por sua simplicidade pode ser fabricado com diversos tipos de materiais como: madeira, plástico e metal. É apropriado nos processos em que a agitação é prejudicial, como na produção de enzimas por fungos nas que o micélio não deve ser danificado e na produção de *Koji* nos países asiáticos. O processo de ampliação de escala é simples já que o único é incrementar o numero de bandejas (Durand, 2003).



Figura 1.2: Biorreator tipo bandeja. Fonte: Ali e Zulkali. (2011).

#### 1.3.2.2 BIORREATOR DE LEITO EMPACOTADO

É um dos biorreatores mais utilizados na FSS devido a sua simplicidade e versatilidade. Seu desenho em forma de cilíndrica permite que seja um equipo barato, o qual pode ser encamisado para melhor controle da temperatura. O ar é fornecido pelo fundo até o topo da coluna passando através do leito, removendo o calor metabólico produzido e fornecendo oxigênio aos micro-organismos durante o processo fermentativo. A este tipo de biorreator podem-se adaptar um sem numero de sensores como: manômetros, higrômetros, termopares, detectores  $CO_2$  e oxigênio que permitem ter melhor controle do processo, na Figura 1.3 pode-se observar suas diferentes configurações.


**Figura 1.3:** Biorreatores de leito empacotado: a) Desenho tradicional. b) Tubo perfurado no eixo central (coluna). Fonte: Mitchell, Krieger e Berovic, 2006.

Este tipo de biorreator trabalha com gramas ou poucos quilogramas, o que permite estudar a cinética de crescimento celular durante a fermentação através dos perfis de consumo de oxigênio e produção de CO<sub>2</sub>, perfis de temperatura, queda de pressão e otimizar o meio de fermentação (Brandão, 2003). A baixa eficiência na remoção de calor metabólico gerado na fermentação, faz que sua operação fique restrita a processos que utilizam poucos quilogramas de substrato (Mazutti, 2009). Por entanto, para estudar os parâmetros cinéticos durante a fermentação é necessário sacrificar uma coluna completa, devido que o desenho da mesma não permite tomar amostras (Durand et al., 1993; Iliuta *et al.*, 2005).

Fenômenos como gradientes de pressão, formação de caminhos preferenciais no leito empacotado e condensação no espaço de cabeça, podem ser estudados nesta classe de biorreatores com o fim de gerar estratégias mais eficientes de desenho e operação (Mitchell; Krieger e Berovic, 2006; Mazutti, 2009). Porem, biorreatores mais eficientes e versáteis permitiriam seu uso a nível industrial.

#### **1.3.2.3 BIORREATOR DE TAMBOR ROTATIVO**

O biorreator de tambor rotativo tem agitação leve que favorece o crescimento de micro-organismos tolerantes à agitação devido a pouco rompimento celular, além de permitir adição de água para manter o nível de umidade constante. Uns de seus principais problemas é a remoção de calor já que predomina a evaporação à convecção.

A diferença do biorreator de leito empacotado, estes biorreatores não geram quedas de pressão devido a sua rotação suave, A configuração pode variar dependendo do tipo de substrato e micro-organismo a ser usado, já que pode apresentar pás agitadoras como mostra a Figura 1.4.



**Figura 1.4:** Biorreatores de tambor rotativo: a) Tambor rotativo. b) Tambor agitado. Fonte: Mitchell, Krieger e Berovic (2006).

#### 1.3.2.4 BIORREATOR DE LEITO FLUIDIZADO E DE LEITO AGITADO

Este tipo de biorreator pode operar de forma continua por longos períodos e com alta produtividade. O princípio deste tipo de biorreator baseia-se em promover a agitação e aeração pela injeção de ar. Sua principal característica é a boa oxigenação do substrato, mas pode apresentar problemas de compactação e gradientes de temperatura e elevada força cisalhante que afetam o crescimento dos micro-organismos (Ruíz-Leza et al. 2007).



Figura 1.5: Biorreatores de leito fluidizado. a) Biorreator de leito fluidizado; b) Biorreator de leito fluidizado com fluidização central. Fonte: Mitchell, Krieger e Berovic, (2006).

A tendência é melhorar o desenho dos biorreatores tornando-lhes mais eficientes, melhoramento genético das cepas, caracterização de novos substratos e entendimento dos fenômenos de transferência de calor e massa na FSS.

# 1.3.3 PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DA FSS

Gasparotto et al. (2012) fizeram levantamento sobre a prospecção tecnológica da FSS, em nível mundial e relataram que o 90% de todas as patentes foram depositadas ou concedidas depois do ano 2000. Os países asiáticos lideram o desenvolvimento dos processos em FSS, sendo que 70% de todas as patentes são da China, 8% da União Européia e Estados Unidos, 2% Coréia do sul e 1% Taiwan (Figura 1.2).

Menos do 20% das patentes concedidas são da indústria, demonstrando que a engenharia implicada no desenho e desenvolvimento de projetos de ampliação de escala na fermentação semi-sólida ainda não esta consolidada, sendo pequeno o número de empresas que utilizam esta tecnologia.



**Figura 1.6:** Distribuição das patentes entre as três principais categorias. Fonte: Gasparotto et al. (2012).

Segundo Gasparoto et al. (2012), no Brasil estão registradas no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) 16 patentes, das quais 14 estão relacionadas ao desenvolvimento do processo e duas vinculadas ao desenho de biorreatores. Do total de patentes, 87,5% tem universidades ou pessoa física como depositante (Gasparotto et al., 2012). A fermentação em estado sólido representa uma alternativa para produção de lipopeptídeos e especialmente da iturina A em fermentadores tipo coluna, utilizando substratos ricos em proteína e de baixo custo.

Ohno, Ano e Shoda (1993), constataram que a produção de iturina A por fermentação em estado sólido é 6 a 8 vezes superior que por fermentação submersa e, além disto, a iturina produzida em FSS tem maior poder antifúngico devido a seu ácido graxo ser de cadeia longa.

# 1.3.4 LIPOPEPTÍDEOS

Linhagens do *Bacillus* tem a capacidade de produzir lipopeptídeos cíclicos com características antifúngicas, antibacterianas e surfactantes (Ongena e Jacques, 2008). Estas moléculas são classificadas em 4 famílias diferentes de lipopeptídeos entre os quais estão: iturinas, surfactinas, fengicinas e kurstakinas (Béchet et al., 2012). A estrutura destas moléculas é composta por um anel peptídico de 7 (iturinas, surfactinas e kurstakinas) ou 10  $\alpha$ -aminoácidos (fengicina) unidos a um ácido graxo  $\beta$ -amino (iturinas) e/ou  $\beta$ -hidróxi (surfactinas, fengicinas e kurstakinas) de cumprimento variável (Ongena et al., 2007; Béchet et al., 2012), cujas estruturas estão apresentadas na Figura 1.7.



**Figura 1.7:** Estrutura primária: (A) Surfactina; (B) Iturina; (C) Fengicina. Fonte: Kanlayavattanakul e Lourith (2010).

Todas as famílias de lipopeptídeos são produzidas em uma variedade de isoformas de comprimentos variáveis, ramificações das cadeias alquílicas e mudanças na composição dos aminoácidos, sendo que todas estas variações são responsáveis pelas diferenças nas suas atividades biológicas (Stein, 2005; Dunlap et al., 2011).

A família das iturinas se caracteriza por seu alto poder antifúngico e hemolítico, que é formada pela iturina A e E, bacillomicinas D, F, L e micosubtilina. Os aminoácidos do anel peptídico estão configurados pela sequência quiral LDDLLDL, na qual unicamente os aminoácidos D-Tir<sub>2</sub> e D-Asn<sub>3</sub> são constantes, enquanto os outros aminoácidos do anel peptídico podem ser substituídos. Por suas diferentes configurações estruturais, eles podem ser neutros ou monoaniônicos (Bland, 1996; Maget-Dana e Peypoux, 1994; Bonmatin; Laprévote; Peypoux, 2003).

O grupo das surfactinas é composto por aproximadamente 20 lipopeptídeos diferentes (Bonmatin et al., 2003; Jacques, 2011). A surfactina é um potente surfactante que é produzido como mistura de isoformas, as quais diferem em suas propriedades físico-

químicas pela variação do comprimento e ramificações de seu ácido graxo β-hidróxi ( $C_{13}$ - $C_{15}$ ) (Peypoux et al., 1994; Kowall et al., 1998), assim como a substituição de alguns aminoácidos em seu anel peptídico (Baumgart et al., 1991; Peypoux et al., 1991; Itokawa et al., 1994; Bonmatin et al., 1995; Kanatomo et al., 1995; Grangemard et al., 1997; Kowall et al., 1998). Estas variações dependem da linhagem de *Bacillus*, condições nutricionais e ambientais (Peypoux e Michel, 1992; Kowall et al., 1998).

A família das fengicinas está constituída pelas isoformas fengicina A, fengicina B e plipastatina, que têm alto poder antifúngico. Sua estrutura é constituída por um ácido graxo  $\beta$ -hidróxy ligado a uma porção peptídica de 10 aminoácidos, dos quais 8 estão organizados em forma cíclica (Deleu; Paquot; Nylander, 2008). A diferença entre estas isoformas é o aminoácido na posição 6 do anel, que pode ser alanina ou valina (Jacques, 2011). As principais diferenças entre a fengicina e plipastatina é a troca da glicina (Gln) pelo ácido glutâmico (Glu) na posição 8 e as formas quirais D e L da tirosina nas posições 9 e 3 para a fengicina e 3 e 9 para a plipastatina (Jacques, 2011).

A kurstakina é um heptalipopeptídeo de propriedades surfactantes que apresenta anel peptídico com a seguinte sequência de aminoácidos: D-Thr-Gli-D-Ala-Ser-His-D-Gln-Gln ligados ao ácido graxo  $\beta$ -hidroxi (C<sub>11</sub>-C<sub>13</sub>), que pode ter a configuração *n* ou *iso* (Slivinski, 2012).

#### 1.3.5 ITURINA A

A descoberta da iturina se deu em 1957, tendo sido observada sua atividade contra algumas bactérias e forte inibição do crescimento de alguns fungos e leveduras (Delcambe e Devignat, 1957; Maget-Dana e Peypoux, 1994). A iturina A, assim como todos os membros deste grupo, contêm uma mistura de até oito isômeros do ácido graxo  $\beta$ -amino (ácido iturínico) que pode variar de 13 a 17 átomos de carbono dependendo da configuração *n*-, *iso-* ou *anteiso* dando origem a iturina A<sub>1</sub>-A<sub>8</sub>, sendo que o isômero predominante é a iturina A<sub>2</sub>, que tem a configuração *n*-C<sub>14</sub>, conforme ilustrado na Figura 1.8 (Isogai et al., 1982; Bland, 1996; Bonmatin; laprévote; Peypoux, 2003).



**Figura 1.8:** Estrutura química e isômera da iturina A. Fonte: Bland. (1996); Moran et al. (2009).

A iturina A, por sua estrutura primaria, apresenta como característica seu caráter anfifílico, já que a parte polar é formada pelo peptídeo cíclico e a parte hidrofóbica pela cadeia alquílica do  $\beta$ -amino ácido graxo (Maget-Dana e Peypoux, 1994). O valor da concentração micelar crítica (CMC) da iturina A é 25 µM, valor muito próximo dos 35 µM que é a concentração mínima inibitória contra o crescimento de Saccharomyces cerevisiae (Aranda; Teruel; Ortiz, 2005; Besson et al., 1979). A eficácia da iturina A contra vários fungos fitopatógenos e leveduras é semelhante aos pesticidas químicos disponíveis (Phae e Shoda, 1990; Phae; Shoda; Kubota, 1990; Moyne et al., 2001; Yu et al., 2002; Hiradate et al., 2002; Romero et al., 2004). No entanto, a iturina A também possui propriedades antibacterianas contra a bactéria fitopatógena Xanthomonas campestris pv. campestris (Etchegaray et al., 2008). Este lipopeptídeo também possui propriedades surfactantes e hemolíticas, que, em conjunto com sua alta biodegradabilidade, baixa toxicidade e baixo efeito alergênico em seres humanos e animais o transformaria em um potencial biopesticida (Quentin et al., 1982; Phae et al., 1992; Lin et al., 2007). Grau et al. (2001), estudaram o comportamento das dispersões aquosas da iturina A em diferentes concentrações, e relataram que, a iturina A, por seu comportamento anfifílico, tem tendência a associar-se e formar pequenas vesículas, induzindo a formação de poros em membranas biológicas (Aranda; Teruel; Ortiz, 2005; Etchegaray et al., 2008). A surfactina pode atuar sinergicamente com a iturina A aumentando a absorção e estabilidade deste antifúngico na membrana citoplasmática do micro-organismo alvo (Razafindralambo et al., 1993). O sinergismo desta mistura permite incrementar a atividade hemolítica e antifúngica em até 40% (Thimon et al., 1992; Maget-Dana et al., 1992; Razafindralambo et al., 1993), mas seu sinergismo não foi unicamente na atividade antifúngica, mas como também na desintegração demonstrado por Etchegaray et al (2008), esta mistura desintegra a parede celular da bactéria fitopatógena *Xanthomonas campestris pv. campestris*.

Os lipopeptídeos produzidos pelos *Bacillus subtilis* são sintetizados por enzimas multifuncionais chamadas de peptídeosintetases não ribossomais (NRPS) (Ongena e Jacques, 2008). Estes complexos multienzimáticos são responsáveis pela biossíntese de várias centenas de compostos bioativos e estão organizados em módulos que são responsáveis pela incorporação de um aminoácido no final da cadeia do peptídeo (Schwarzer; Finking; Marahiel, 2003; Walsh, 2004). Cada módulo é subdividido em vários domínios catalíticos responsáveis por cada uma das reações bioquímicas como: ativação, adenilação, tioesterificação, condensação e modificação de um aminoácido específico (Schwarzer; Finking; Marahiel, 2003; Sieber e Marahiel, 2005; Tapi et al., 2010). Embora os complexos multienzimáticos responsáveis pela biossíntese de surfactina e fengicina tenham sidos identificados e caracterizados em detalhes, as enzimas responsáveis pela biossíntese dos lipopeptídeos da família iturina ainda são desconhecidos (Duitman et al., 1999). Duitman et al. (1999), estudando as características da micosubtilinasintetase, propuseram um modelo para a biossíntese dos lipopeptídeos da família da iturina que está ilustrado na Figura 1.9.



**Figura 1.9:** Esquema da síntese dos lipopeptídeos da família iturina. Fonte: Duitman et al. (1999).

# 1.3.6 PRODUÇÃO DE ITURINA A EM FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA

A produção da iturina A é amplamente estudada na FS, mas nos últimos 20 anos tem crescido o interesse na produção deste lipopeptídeo por FSS. Ohno et al. (1992) publicaram o primeiro artigo sobre a produção de iturina A por fermentação semi-sólida utilizando o *Bacillus subtilis* NB22 cultivado em farelo de trigo como substrato e compararam esta com a FS. A concentração máxima de iturina obtida foi 1,1 g/kgdu (kgdu = kilograma de substrato úmido) em 24 h, enquanto na FS foi 0,2 g/L em 120 h, mantidos a 25°C.

Ohno, Ano e Shoda (1995), investigaram o efeito da temperatura na produção de iturina A e surfactina pela cepa *Bacillus subtilis* RB14 usando o *okara* como substrato, o qual é um subproduto da soja na produção de tofu. A máxima concentração de iturina A foi 6g/kg-ds (kgds = kilograma de substrato seco) em 48 h de fermentação com 77% de umidade inicial a 25°C. A concentração da iturina A decresceu com o incremento da temperatura enquanto a da surfactina aumentou, atingindo a máxima concentração de 2 g/kgds a 37°C.

Ohno, Takashi e Shoda (1996) investigaram o efeito da temperatura e aumento da concentração do substrato (*okara*) na produção de iturina A usando a cepa *Bacillus subtilis* NB22. A maior concentração obtida foi 1,65g/kgdu a 25°C. A concentração da iturina A decresceu com o incremento da concentração de substrato devido ao incremento na temperatura que atingiu os 45°C.

Mizumoto; Hirai e Shoda (2006), usaram o mutante *Bacillus subtilis* RB14-CS na produção de iturina A utilizando como substrato okara e após 4 dias de fermentação obtiveram concentração de 14 g/kg-ds de iturina Muzimoto e Shoda (2007), otimizaram o meio de FSS, acrescentando ao meio original (okara) farelo de soja e glicose. Na condição ótima a concentração de farelo de soja e glicose foi de 1,83 e 0,998 g por 15 g de okara úmido, atingindo uma concentração de iturina 5591µg/kg-de okara úmido inicial a 25°C e 75% de umidade. O valor obtido foi 10 vezes maior que o obtido em seus primeiros estudos, além de diminuir os custos devido à substituição da polipeptona pelo farelo de soja (Ohno; Ano; Shoda, 1993).

Shih et al. (2008) otimizaram o meio de FSS composto por farinha rica em glúten, farelo de trigo, farelo de arroz, glicose, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> e óleo de amendoim, inoculo e umidade do substrato para a produção de iturina A pela cepa *Bacillus subtilis* S3. A concentração máxima foi de 20 g/kgds de iturina A a 25°C, 120 h usando garrafas plásticas como reatores. Ano et al. (2009) construíram um biorreator com controle de temperatura, agitação e aeração com capacidade para 2 kg para a produção de iturina A, utilizando a cepa *Bacillus subtilis* RB14-CS e o okara como substrato. Foram investigados os efeitos da agitação, vazão volumétrica de ar e peso do substrato, sendo que a máxima concentração de iturina A foi 3500 mg/kg de substrato úmido utilizando 2 kg de substrato, sem agitação, vazão de ar de 10 L/min, 25°C e 144 h de fermentação. Quando foi utilizada a agitação de 25 rpm a produção deste lipopeptídeo reduziu bastante, atingindo concentrações de 100-500 mg/kg-de substrato úmido, visto que a agitação inibiu a formação de biofilme que é uma estrutura muito importante na produção de iturina A (Rahma; Ano; Shoda, 2007). A falta de agitação favoreceu a geração de gradientes de temperatura que elevaram a temperatura acima de 45°C, mas foram controlados com a aeração e com o biorreator encamisado.

Yao et al. (2012), co-produziram o biopolimero ácido  $\gamma$ -poliglutâmico ( $\gamma$ -PGA) e iturina A utilizando a cepa *Bacillus subtilis* 3-10 e farelo de canola e trigo como substrato em câmeras de fermentação. A proporção de farelo de canola e trigo que apresentou melhor resultado de iturina A foi 7:3 (p/p) atingindo 5.3 g/kgds e  $\gamma$ -PGA 51.3 g/kgds, em 84 horas de fermentação a 37°C e 60% de umidade inicial, respectivamente.

Khan et al. (2012), investigaram o efeito da altura do leito em reatores de coluna na produção de iturina A utilizando o *Bacillus subtilis* RB14-CS e como substrato okara. As alturas investigadas foram 5, 10, 15, 20 cm em reatores de 5 cm de diâmetro e 30 cm de altura sem aeração. A maior concentração de iturina A foi obtida em 15 cm de altura, atingindo a concentração de 2720 mg/kg-de substrato úmido após 6 dias de fermentação.

Como já foi descrito, a produção de iturina A em fermentação semi-sólida tem sido pesquisada nos últimos 20 anos, sendo que a grande maioria destes trabalhos científicos foca na produção por novas cepas e mutantes de *Bacillus*, otimização do meio de cultura e aproveitamento de resíduos agroindustriais, especialmente o okara como substrato. A pesar do potencial da iturina A como antifúngico, defensivo agrícola e surfactante, só o trabalho

de Ano et al. (2009) foi feito pensando no aumento de escala para sua produção, utilizando biorreatores com controle de temperatura, aeração, umidade relativa, agitação e aumento da massa de substrato, já que a grande maioria dos estudos foram feitos utilizando Erlenmeyers ou garrafas de vidro, onde as variáveis são mais fáceis de controlar. No entanto, não há trabalhos de produção da iturina A em fermentadores de coluna, nos quais se avaliam os efeitos de parâmetros tão importantes para aumento de escala como: perfis temperatura do leito, consumo de oxigênio, gradientes de pressão, vazão volumétrica de ar e o efeito da produção do biopolímero ácido  $\gamma$ -poliglutâmico ( $\gamma$ -PGA) na produção deste lipopeptídeo.

## 1.3.7 PURIFICAÇÃO DA ITURINA A

As etapas de separação e purificação (*downstream*) de produtos biotecnológicos são muitas vezes difíceis, devido às características químicas do meio de fermentação, da biomolécula alvo e dos metabolitos produzidos além da molécula alvo. Estas etapas são responsáveis por 60% do custo total de produção, mas podem atingir valores mais elevados, quando se processam produtos de alto valor agregado. Geralmente a etapa de *downstream* requer equipamentos e insumos caros que fazem desta a melhor planificada (Almeida, 2003; Bjurstrom, 1985). As estratégias de separação de biosurfactantes (lipopeptídeos) podem variar dependendo do tipo de fermentação, propriedades físico-químicas da molecula alvo e se o produto é extracelular ou intracelular. Os métodos de purificação e recuperação dependem da natureza da carga, solubilidade e viabilidade economica do processo (Shaligram e Singhal, 2010).

A extração e purificação de lipopeptídeos é amplamente pesquisada na fermentação submersa, grande parte das metodologias de extração e purificação desenvolvidas neste tipo de fermentação são adaptadas à fermentação semi-sólida.

Ohno, Ano e Shoda (1993), extraíram a iturina A do substrato fermentado (okara) com metanol (1:3, p/v) a 92 rpm por 1 hora. Foram identificados 5 isômeros da iturina A através da cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC) utilizando

como fase móvel acetonitrila/acetato de amônia 10 mM (3:4, v/v) e vazão de 1 mL/min. Ohno, Ano e Shoda (1995) extraíram surfactina e iturina A do okara fermentado após 48 horas de fermentação. Os lipopeptídeos foram quantificados através de RP-HPLC usando como fase móvel acetonitrila/acetato de amônia 10 mM (3:4, v/v) e a surfactina com a fase móvel acetonitrila/ácido trifluoroacético 3.8 mM (4:1, v/v) e vazão 1,5 mL/min.

Pryor et al. (2006), isolaram e purificaram usando de cartuchos de resina  $C_{18}$  os lipopeptídeos produzidos pelo *Bacillus subtilis* TrigoCor 1448 em fermentação em estado solido. Os extratos metanólicos foram filtrados e evaporados para posteriormente serem solubilizados em metanol 50%. As amostras foram purificadas por passagem através de cartuchos com resina  $C_{18}$ , lavagens com metanol 50% e eluídas com metanol 100%. Foram identificados por RP-HPLC e espectrometria de massa (LR-ESI-MS) três isômeros da iturina A, quatro da fengicina A, três da fengicina B e dois da surfactina.

Wang et al. (2008) descreveram outro processo alternativo para a extração do lipopeptídeo fengicina e o biopolímero ácido  $\gamma$ -poliglutâmico ( $\gamma$ -PGA) produzidos simultaneamente pelo *Bacillus subtilis* B6-1 em fermentação semi-sólida, já que muitas cepas da espécie *Bacillus* produzem tanto lipopeptídeos como o  $\gamma$ -PGA, mas nunca se tinha investigado a produção simultânea destes compostos.

A extração aquosa de meio fermentado composto por resíduos da soja e batata doce concentrada por ultrafiltração e posteriormente o lipopeptídeo precipitado pela adição de HCl 2N até atingir pH 2. O precipitado foi solubilizado em metanol é difundido em cartuchos de adsorção com resina  $C_{18}$ . A eluição dos cartuchos foram feitas com soluções aquosa de metanol (0, 20, 40, 50, 70, 80 e 100%), as frações com maior atividade foram 70, 80 e 100% de metanol. O produto final com alta pureza foi obtido e analisado através de RP-HPLC, identificando-se 4 isômeros da fengicina  $C_{15}$ ,  $C_{16}$ ,  $C_{17}$ ,  $C_{19}$ .

Yao et al. (2012) isolaram e identificaram a iturina A e  $\gamma$ -PGA produzido pela nova cepa *Bacillus subtilis* 3-10 em fermentação em estado solido usando farelo de canola como substrato. A iturina A foi extraída com a mistura de solventes acetonitrila/ácido trifluoroacético 3.8 mM (4:1, v/v) e purificada por da RP-HPLC usando como fase móvel o sistema acetonitrila/acetato de amônia 10mM (3:4, v/v). Slivinski et al. (2012) usaram a precipitação e extração com solventes como métodos de extração da surfactina produzida em FES utilizando okara como substrato.

# 1.4 ESTRATÉGIAS ADOTADAS

Em um primeiro momento, foram estudadas a atividade antagônica e hemólise de diferentes cepas silvestres e mutantes do Bacillus subtilis, Os mutantes foram obtidos através de metodologias que induziam a mutação através da aplicação de luz UV e agentes mutagênicos, como acridina laranja e estreptomicina. Destes testes, uma cepa silvestre, Bacillus subtilis subs. subtilis NRRL-NRS 1270, apresentou boa atividade antagônica contra fungos fitopatógenos. No entanto, surgiu a necessidade de identificar a substância através de espectrometria de massas, mas esta substancia não foi identificada como iturina A. A segunda etapa foi desenvolvida em parceria com os laboratórios de Bioanalítica Paracelcus e Química Biológica do Instituto de Química da UNICAMP. Esta etapa de desenvolvimento da metodologia de isolamento e purificação demorou aproximadamente 3 anos, devido às dificuldades encontradas na adaptação das metodologias de extração de lipopeptídeos da literatura a nosso processo de fermentação semi-sólida. Muitas destas metodologias eram desenvolvidas para fermentação submersa e tiveram que ser adaptadas para fermentação semi-sólida. Os meios nos quais foram aplicadas muitas destas metodologias não continham teor proteico alto quanto os meios utilizados neste trabalho. Além disso, foi identificado o biopolímero  $\gamma$ -PGA produzido pelos diferentes *Bacillus*, que causou dificuldade na purificação da iturina A.

A terceira etapa foi o desenvolvimento do processo de fermentação em biorreatores de leito empacotado, para o qual foi feito um delineamento composto central rotacional (DCCR) para estudar o efeito do suporte inerte (casca de arroz) e vazão volumétrica de ar na produção de iturina A utilizando como substrato farelo desengordurado de soja e farelo de trigo. No DCCR não foi possível otimizar os parâmetros avaliados, mas obteve-se informação valiosa que permitiram avaliar o efeito da produção do biopolímero ácido  $\gamma$ -poliglutâmico ( $\gamma$ -PGA) nos perfis de temperatura, consumo de oxigênio, gradientes de pressão e umidade nos biorreatores tipo coluna na produção da iturina A.

# 1.5 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- AKPA, E.; JACQUES, P.; WATHELET, B.; PAQUOT, M.; FUCHS, R.; BUDZIKIEWICZ, H.; THONART, P. Influence of culture conditions on lipopeptide production by Bacillus subtilis. Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology. v. 91-93, p. 551-561, 2001.
- ALMEIDA, R. M. R. G. Estudo da purificação do ácido clavulânico utilizando processo contínuo de adsorção. 2003. 170 p. Tese (Doutor em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.
- ANO, T.; JIN, G.Y.; MIZUMOTO, S.; RAHMAN, M.S.; OKUNO, K.; SHODA, M. Solid state fermentation of lipopeptide antibiotic iturin A by using a novel solid state fermentation reactor system. Journal of Environmental Sciences Supplement. p. S102-S165, 2009.
- ARANDA, F. J.; TERUEL, J. A.; ORTIZ, A. Further aspects on the hemolytic activity of the antibiotic lipopeptide iturin A. Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes. v. 1713, p. 51-56, 2005.
- BARRIOS-GONZÁLEZ, J. Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. **Process Biochemistry**. v. 47, p. 175-185, 2012.
- BARRIOS-GONZALES, J.; FERNÁNDEZ, F. J.; TOMASINI, A. Microbial secondary metabolites production and strain improvement. Indian Journal of Biotechnology. v. 2, p. 322-333, 2003.
- BAUMGART, F.; KLUGE, B.; ULLRICH, C.; VATER, J.; ZIESSOW, D. Identification of amino acid substitutions in the lipopeptide surfactin using 2D NMR spectroscopy.
  Biochemical and Biophysical Research Communications. v. 177, p. 998-1005, 1991.
- BÉCHET, M.; CARADEC, T.; HUSSEIN, W.; ABDERRAHMANI, A.; CHOLLET, M.; LECLÉRE, V.; DUBOIS, T.; LERECLUS, D.; PUPIN, M.; JACQUES, P. Structure, biosynthesis, and properties of kurstakins, nonribosomal lipopeptides from *Bacillus* spp. Applied Microbiology and Biotechnology. v. 95, p. 593-600, 2012.

- BERNAL, G.; ILLANES, A.; CIAMPI, L. Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus sp.* with antibiotic activity against plant pathogenic agents. **Electronic Journal of Biotechnology**. v. 5, p. 12-20, 2002.
- BESSON, F.; PEYPOUX, F.; MICHEL, G.; DELCAMBE, L. Characterization of iturin A in antibiotics from various strains of *Bacillus subtilis*. Journal of Antibiotics. v. 29, p. 1043-1049, 1976.
- BESSON, F.; PEYPOUX, F.; MICHEL, G.; DELCAMBE, L. Antifungal activity upon Saccharomyces cerevisiae of iturin A, mycosubtilin, bacillomycin L and of their derivatives; inhibition of this antifungal activity by lipid antagonists. Journal of Antibiotics. v. 32, p. 828-833, 1979.
- BJURSTROM, E. Biotechnology: fermentation and downstream processing. Chemical Engineering. v.92, p. 126-158, 1985.
- BLAND, J.M. The first synthesis of a member of the iturin family, the antifungal cyclic lipopeptide, iturin-A2. Journal of Organic Chemistry. v. 61, p. 5663-5664, 1996.
- BONMATIN, J. M., LAPRÉVOTE, O.; PEYPOUX, F. Diversity among microbial cyclic lipopeptides: Iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening. v. 6, p. 541-556, 2003.
- BONMATIN, J. M.; LABBÉ, H.; GRANGEMARD, I.; PEYPOUX, F.; MAGET-DANA,
  R.; PTAK, M.; MICHEL, G. Production, isolation and characterization of Leu<sub>4</sub> and Ile<sub>4</sub>
  surfactins from *Bacillus subtilis*. Letters in Peptide Science. v. 2, p. 41-47, 1995.
- DELCAMBE, L. e DEVIGNAT, R. L'iturine, nouvel antibiotique d'origine congolaise. Académie royale des sciences coloniales, v. 6, p. 1-77, 1957.
- DELEU, M.; PAQUOT, M.; NYLANDER, T. Effect of fengycin, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, on model biomembranes. **Biophysical Journal**. v. 94, p. 2667-2679, 2008.
- DUITMAN, E. H.; HAMOEN, L. W.; REMBOLD, M.; VENEMA, G.; SEITZ, H.; SAENGER, W.; BERNHARD, F.; REINHARDT, R.; SCHMIDT, M.; ULLRICH, C.; STEIN, T.; LEENDERS, F.; VATER, J. The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino

transferase, and a fatty acid synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p.13294-13299, 1999.

- DUNLAP, C. A.; SCHISLER, D. A.; PRICE, N.P.; VAUGHN, S. F. Cyclic lipopeptide profile of three *Bacillus subtilis* strains; antagonists of *Fusarium* head blight. Journal of Microbiology. v. 49, p. 603-609, 2011.
- DURAND, A.; RENAUD, R.; ALMANZA, S.; MARATRAY, J.; DIEZ, M., DESGRANGES, C. Solid state fermentation reactors: From lab scale to pilot plant. Biotechnology Advances, v. 11, p. 591-597, 1993.
- DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. Biochemical Engineering Journal, v. 13, p. 113-125, 2003.
- ETCHEGARAY, A.; DE CASTRO BUENO, C.; DE MELO, I. S.; TSAI, S. M.; FIORE,
  M. F.; SILVA-STENICO, M. E.; DE MORAES, L. A.; TESCHKE, O. Effect of a highly concentrated lipopeptide extract of *Bacillus subtilis* on fungal and bacterial cells.
  Archives of Microbiology. v. 190, p. 611-622, 2008.
- GASPAROTTO, J. M.; KUHN, R. C.; FOLETTO, E. L.; JACQUES, R. J. S.; GUEDES, J.
  V. C.; JAHN, S. L.; MAZUTTI, M.A. Technological prospection on solidstate fermentation. Recent Patents on Engineering. v. 6, p. 207-216, 2012.
- GRANGEMARD, I.; PEYPOUX, F.; WALLACH, J.; DAS, B.C.; LABBÉ, H.; CAILLE, A.; GENEST, M.; MAGET-DANA, R.; PTAK, M.; BONMATIN, J. M. Lipopeptides with improved properties: Structure by NMR, purification by HPLC and structure-activity relationships of new isoleucyl-rich surfactins. Journal of Peptide Science. v. 3, p. 145-154, 1997.
- GRAU, A.; GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J. C.; PEYPOUX, F.; ORTIZ, A. Aggregational behavior of aqueous dispersions of the antifungal lipopeptide iturin A. Peptides. v.22, p. 1-5, 2001.
- HIRADATE, S.; YOSHIDA, S.; SUGIE, H.; YADA, H.; FUJII, Y. MULBERRY.Anthracnose antagonists (iturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2.Phytochemistry, v. 6, p. 693–698, 2002.

- HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J.; Biotechnological advantages of laboratoryscale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 64, p. 175-186, 2004.
- HÖLKER, U. E LENZ, J. Solid-state fermentation Are there any biotechnological advantages?. Current Opinion in Microbiology. v. 8, p. 301-306, 2005.
- ILIUTA, I.; ILIUTA, M. C.; LARACHI, F. Hydrodynamics Modeling of Bioclogging in Waste Gas Treating Trickle-Bed Bioreactors. Industrial and Engineering Chemistry Research. V. 44, p. 5044-5052, 2005.
- ISOGAI, A.; TAKAYAMA, S.; MURAKOSHI, S.; SUZUKI, A. Structures of β-amino acids in antibiotics iturin A. **Tetrahedron Letters**. v. 23, p. 3065-3068, 1982.
- ITOKAWA, H.; MIYASHITA, T.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; HIRANO, T.; HOMMA, M.; OKA, K. Structural and conformational studies of [Ile<sup>7</sup>] and [Leu<sup>7</sup>]surfactins from *Bacillus subtilis natto*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. v. 42, p. 604-607, 1994.
- JACQUES, P. Surfactin and other lipopeptides from *Bacillus* spp. In: SOBERÓN-CHÁVEZ, G. (Editor) Biosurfactants. v. 20, Springer-Verlag: Berlin, 2011, p. 57-91.
- JACQUES, P., HBID, C.; DESTAIN, J.; RAZAFINDRALAMBO, H.; PAQUOT, M.; DE PAUW, E.; THONART, P. Optimization of biosurfactant lipopeptide production from *Bacillus subtilis* S499 Plackett-Burman design. Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology. v. 77-79, p. 223-233, 1999.
- KANATOMO, S.; NAGAI, S.; OHKI, K.; YASUDA, Y. Study on surfactin, a cyclic depsipeptide. I. Isolation and structure of eight surfuctin analogs produced by *Bacillus natto* KMD 2311. Yakugaku Zasshi. v. 115, p. 756-764, 1995.
- KANLAYAVATTANAKUL, M.; LOURITH, N. Lipopeptides in cosmetics. International Journal of Cosmetic Science. v. 32, p. 1-8, 2010.
- KHAN, A; ZOHORA, U; RAHMAN, M; OKANAMI, M; ANO, T. Production of iturin A through glass column reactor (GCR) from soybean curd residue (okara) by *Bacillus subtilis* RB14-CS under solid state fermentation (SSF). Advances in Bioscience and Biotechnology. v. 3, p. 143-148, 2012.

- KIM, P. I.; BAI, H.; BAI, D.; CHAE, H.; CHUNG, S.; KIM, Y.; PARK, R.; CHI, Y. T.
  Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. Journal of Applied Microbiology. v. 97, p. 942-949, 2004.
- KOWALL, M.; VATER, J.; KLUGE, B.; STEIN, T.; FRANKE, P.; ZIESSOW, D.
   Separation and characterization of surfactin isoforms produced by *Bacillus subtilis* OKB 105. Journal of Colloid and Interface Science. v. 204, p. 1-8, 1998.
- LIN, H. Y.; RAO, Y. K.; WU, W. S.; TZENG, Y. M. Ferrous ion enhanced lipopeptide antibiotic iturin A production from *Bacillus amyloliquefaciens* B128. International Journal of Applied Science and Engineering. v. 5, p. 123-132, 2007.
- MAGET-DANA, R. E PEYPOUX, F. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: Biological and physicochemical properties. **Toxicology**. v. 87, p. 151-174, 1994.
- MAGET-DANA, R.; THIMON, L.; PEYPOUX, F.; PTAK, M. Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. **Biochimie**. v. 74, p. 1047-1051, 1992.
- MAZUTTI, M. A.; BENDER, J. P.; TREICHEL, H.; DI LUCCIO, M., Optimization of inulinase production by solid-state fermentation using sugarcane bagasse as substrate. Enzyme and Microbial Technology. v. 39, p. 56-59, 2006.
- MAZUTTI, M. Avaliação cinética e modelagem matemática daprodução de inulinase por fermentação em estado sólido em biorreator de leito fixo. 2009. 127 p. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.
- MIENDA, B. S.; IDI, A.; UMAR, A. Microbiological Features of Solid State Fermentation and its Applications - An overview. **Research in Biotechnology**. v. 2, p. 21-26, 2011.
- MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M., Solid-state fermentation bioreactors. 1. ed. Berlin: Springer-Verlag, 2006.
- MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing .Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. v. 68, p. 61-138, 2000.

- MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; NOPHARATANA, M.; KRIEGER, N. The bioreactor step of SSF: a complex interaction of phenomena. Springer: Heidelberg, p.13-32, 2006.
- MIZUMOTO, S.; HIRAI, M.; SHODA, M. Production of lipopeptide antibiotic iturin A using soybean curd residue cultivated with *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 72, p. 869-875, 2006.
- MIZUMOTO, S. ESHODA, M. Medium optimization of antifungal lipopeptide, iturin A, production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation by response surface methodology. Applied Microbiology and Biotechnology. v. 76, p. 101-108, 2007.
- MONTEIRO, L.; DE LIMA RAMOS MARIANO, R.; SOUTO-MAIOR, A. M. Antagonism of *Bacillus spp.* against *Xanthomonas campestris pv. campestris*.
  Brazilian Archives of Biology and Technology. v. 48, p. 23-29, 2005.
- MORAN, S.; RAI, D. K.; CLARCK, B. R.; MURPHY, C. D. Precursor-directed biosynthesis of fluorinated iturin A in *Bacillus* spp. **Organic and Molecular Chemistry**, v. 7, p. 644-646, 2009.
- MOYNE, A. L.; SHELBY, R.; CLEVELAND, T. E.; TUZUN, S. Bacillomycin D: An iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. Journal of Applied Microbiology. v. 90, p.622-629, 2001.
- OHNO, A.; ANO, T.; SHODA, M. Production of antifungal antibiotic, iturin in a solid state fermentation by *Bacillus subtilis* NB22 using wheat bran as a substrate. **Biotechnology** Letters, v. 14, p. 817-822, 1992.
- OHNO. A; ANO, T.; SHODA, M. Production of the antifungal peptide antibiotic, iturin by *Bacillus subtilis* NB22 in solid state fermentation. Journal of Fermentation and Bioengineering. v. 75, p. 23-27, 1993.
- OHNO, A; ANO, T; SHODA, M. Effect of temperature on production of lipopeptide antibiotics, iturin A and surfactin by a dual producer, *Bacillus subtilis* RB14, in solid-stage fermentation. Journal of Fermentation and Bioengineering v. 80, p. 517-519, 1995.

- OHNO, A.; TAKASHI, A.; SHODA, M. Use of soybean curd residue, *okara*, for the solid state substrate in the production of a lipopeptide antibiotic, Iturin A, by *Bacillus subtilis* NB22. **Process Biochemistry**, v. 31, p. 801-806, 1996.
- ONGENA, M.; JOURDAN, E.; ADAM, A.; PAQUOT, M.; BRANS, A.; JORIS, B.; ARPIGNY, J. L.; THONART, P. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. Environmental Microbiology. v. 9, p. 1084-1090, 2007.
- ONGENA, M. E JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in Microbiology**. v. 16, p. 115-125, 2008.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**. v. 13, p.81-84, 2003.
- PEYPOUX, F.; BONMATIN, J. M.; LABBE, H.; DAS, B.C.; PTAK, M.; MICHEL, G. Isolation and characterization of a new variant of surfactin, the [Val7]surfactin. European Journal of Biochemistry. v. 202, p. 101-106, 1991.
- PEYPOUX, F.; BONMATIN, J. M.; LABBE, H.; GRANGEMARD, I.; DAS, B.C.; PTAK, M.; WALLACH, J.; MICHEL, G. [Ala4]Surfactin, a novel isoform from *Bacillus subtilis* studied by mass and NMR spectroscopies. European Journal of Biochemistry. v. 224, p. 89-96, 1994.
- PEYPOUX, F.; MICHEL, G. Controlled biosynthesis of Val<sup>7</sup>- and Leu<sup>7</sup>-surfactins. Applied Microbiology and Biotechnology. v. 36, p. 515-517, 1992.
- PHAE, C. G. E SHODA, M. Expression of suppressive effect of *Bacillus subtilis* and its products on phytopathogens in inoculated coposts. Journal of Fermentations and Bioengineering. v.70, p. 409-414, 1990.
- PHAE, C. G.; SHODA, M.; KUBODA, H. Suppressive effect of *Bacillus subtilis* and its products on phytopathogenic microorganisms. Journal of Fermentations and Bioengineering. v. 69, p. 1–7, 1990.
- PHAE, C. G.; SHODA, M.; NOBUHIRO, K.; NAKANO, M.; USHIYAMA, K. Biological control of crown and root and bacterial wilt of tomato by *Bacillus subtilis* NB22. Annals of Phytopathology Society. v. 58, p. 329-339, 1992.

- PRYOR, S.W.; GIBSON, D.M.; KRASNOFF, S.B.; WALKER, L.P. Identification of antifungal compounds in a biological control product using a microplate inhibition bioassay. **Transactions of ASAE**. v. 49, p. 1643-1649, 2006.
- QUENTIN, M. J.; BESSON, F.; PEYPOUX, F.; MICHEL, G. Action of peptidolipidic antibiotics of the iturin group on erythrocytes. Effect of some lipids on hemolysis. Biochimica Biophysica Acta, v. 684, p. 207-211, 1982.
- RAHMAN, M.S; ANO, T; SHODA, M. Biofilm fermentation of iturin A by a recombinant strain of *Bacillus subtilis* 168. Journal of Biotechnology. V. 127, p. 503-507, 2007.
- RAZAFINDRALAMBO, H.; PAQUOT, M.; HBID, C.; JACQUES, P.; DESTAIN, J.; THONART, P. Purification of antifungal lipopeptides by reversed-phase highperformance liquid chromatography. Journal of Chromatography. v. 639, p. 81-85, 1993.
- RAZAFINDRALAMBO, H.; POPINEAU, Y.; DELEU, M.; HBID, C.; JACQUES,
  P.; THONART, P.; PAQUOT, M. Surface-active properties of surfactin/iturin A mixtures produced by *Bacillus subtilis*. Langmuir. v.13, p. 6026-6031, 1997.
- ROBINSON, T.; SINGH, D.; NIGAM, P. Solid-state fermentation: A promising microbial technology for secondary metabolite production. Applied Microbiology and Biotechnology. v. 55, p. 284-289, 2001.
- ROMERO, D.; PÉREZ-GARCÍA, A.; RIVERA, M. E.; CAZORLA, F. M.; DE VICENTE, A. Isolation and evaluation of antagonistic bacteria towards the cucurbit powdery mildew fungus *Podosphaera fusca*. Applied Microbiology and Biotechnology. v. 64, p. 263-269, 2004.
- RUIZ-LEZA, H. A.; RODRIGUEZ-JASSO, R. M.; RODRIGUEZ-HERRERA, R.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; AGUILAR, C. N. Diseño de biorreactores para fermentación en medio sólido. Revista Mexicana de Ingeniería Química, v. 6, p. 33-40, 2007.
- SCHWARZER, D.; Finking, R.; Marahiel, M. A. Nonribosomal peptides: From genes to products. Natural Product Reports. v. 20, p. 275-287, 2003.

- SHALIGRAM, N.S E SINGHAL, R.S. Surfactin: a review on biosynthesis, fermentation, purification and applications. Food Technology and Biotechnology. v. 48, p. 119-134, 2010.
- SHIH, I.L; KUO, C.,Y.; HSIEH, F-.C.; KAO, S-.S.; HSIEH, C. Use of surface methodology to optimize culture conditions for iturin A production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation. Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers. v. 39, p. 635-643, 2008.
- SIEBER, S.A. E MARAHIEL, M.A. Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: Approaches to new antibiotics Chemical Reviews. v.105, p. 715-738, 2005.
- SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**. v.44, p. 13-18, 2009.
- SLIVINSKI, C. T. Produção de surfactina por *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 em fermentação em estado sólido utilizando bagaço de cana e okara como substrato. 2012. 143p. Tese (Doutor em Bioquímica) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.
- SLIVINSKI, C. T.; MALLMANN, E.; DE ARAÚJO, J. M.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Production of surfactin by *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 in solid-state fermentation using a medium based on okara with sugarcane bagasse as a bulking agent. Process Biochemistry. v. 47, p. 1848-1855, 2012.
- STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: Structures, syntheses and specific functions. Molecular Microbiology. v. 56, p. 845-857, 2005.
- TAPI, A.; CHOLLET-IMBERT, M.; SCHERENS, B.; JACQUES, P. New approach for the detection of non-ribosomal peptide synthetase genes in *Bacillus* strains by polymerase chain reaction. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 85, p. 1521–1531, 2010.
- THIMON, L.; PEYPOUX, F.; MAGET-DANA, R.; ROUX, B.; MICHEL, G. Interactions of bioactive lipopeptides, iturin A and surfactin from *Bacillus subtilis*. Biotechnology and applied biochemistry. v. 16, p. 144-151, 1992.
- THIMON, L.; PEYPOUX, F.; WALLACH, J.; MICHEL, G.Effect of the lipopeptide antibiotic, iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cells. FEMS Microbiology Letters. v. 128, p. 101-106, 1995.

- WALSH, C.T. Polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: Modularity and versatility. **Science**. v. 303, p. 1805-1810, 2004.
- WANG, Q.J.; CHEN, S.W.; ZHANG, J.B.; SUN, M.; LIU, Z.D., YU, Z.N. Co-producing lipopeptides and poly-gamma-glutamic acid by solid-state fermentation of *Bacillus subtilis* using soybean and sweet potato residues and its biocontrol and fertilizer synergistic effects. **Bioresource Technology**. v.99, p. 3318-3323, 2008.
- YAO, D.; JI, Z.; WANG, C.; QI, G.; ZHANG, L.; MA, X.; CHEN, S. Co-producing iturin A and poly-γ-glutamic acid from rapeseed meal under solid state fermentation by the newly isolated *Bacillus subtilis* strain 3-10. World Journal of Microbiology and Biotechnology. v. 28, p. 985-991, 2012.
- YU, G. Y.; SINCLAIR, J. B.; HARTMAN, G. L.; BERTAGNOLLI, B. L. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. Soil Biology and Biochemistry. v. 34, p. 955–963, 2002.

# **CAPÍTULO 2**

Antagonismo de diferentes cepas do *Bacillus* contra *Aspergillus flavus var*. *oryzae* e *Aspergillus fumigatus* 

# Antagonismo de diferentes cepas do Bacillus contra Aspergillus flavus var. oryzae e Aspergillus fumigatus

Piedrahíta-Aguirre, C. A.; Monte Alegre, R.

Departamento de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, CEP: 13083-862, Campinas, São Paulo, Brasil

**Resumo:** Oito linhagens do gênero *Bacillus* foram submetidas à mutação com o agente mutagênico acridina laranja e irradiadas com luz ultravioleta (UV) com o intuito de obter um mutante bom produtor de iturina. Testes de atividade hemolítica e antagônica foram feitos in vitro. As cepas Bacillus sp. NRRL B-41294 e Bacillus sp. NRRL B-41094 apresentaram atividade hemolítica, enquanto os Bacillus subtilis Spizizenii CCT0089, Bacillus subtilis subsp. subtilis NRRL NRS-744, Bacillus subtilis subsp. subtilis NRRL NRS-1270, Bacillus sp. NRRL B-41337 e o mutante obtido com acridina laranja Bacillus subtilis subsp. subtilis NRRL NRS-744 (M) apresentaram atividade antagônica contra cepas do fungo Aspergillus. A cepa Bacillus subtilis subps. subtilis NRRL NRS-1270 inibiu fortemente os fungos fitopatógenos Aspergillus flavus var. oryzae e Aspergillus fumigatus. O extrato etanólico obtido da fermentação semi-sólida, cujo meio estava composto por farelo de soja desengordurado, farelo de trigo, farelo de arroz e casca de arroz foi analisado por cromatografia de camada delgada (CDD) e por espectrometria de massas MS, encontrando-se lipopeptídeos na faixa de m/z 981.43 - 1073.43. O resultado neste trabalho indica que a cepa Bacillus subtilis subps. subtilis NRRL NRS-1270 tem potencial no controle biológico de fungos fitopatógenos.

Palavras-chave: Aspergillus, antagonismo, Bacillus, mutação, antagonismo.

# 2.1 INTRODUÇÃO

O controle biológico de fitopatógenos tem despertado o interesse mundial, já que o uso indiscriminado de agrotóxicos tem sido seriamente questionado pelo risco à saúde humana, animal e danos ao meio ambiente (Bernal; Illanes; Ciampi, 2002; Ongena e Jacques, 2008). Nesse sentido, o uso de biopesticidas é considerado o caminho correto no controle de pragas (Ongena e Jacques, 2008). Bactérias do gênero *Bacillus* produzem lipopeptídeos cíclicos das famílias: iturina, surfactina e fengicina (Romero et al., 2007), cujas propriedades como: surfactantes, antifúngicos e antibacterianos são amplamente conhecidos, além disso estes apresentaram baixa toxicidade e alta biodegradabilidade (Kim et al., 2004; Maget-Dana e Peypoux, 1994; Stein, 2005; Yoshida et al., 2001; Yu et al., 2002; Wang et al., 2008) que os transformaria nos pesticidas do século XXI.

A família das iturinas é composta por: iturina A-E, bacillomicina D, F, L e micosubtilina (Bland, 1996), os quais são heptapeptídeos ligados a uma cadeia de ácido graxo  $\beta$ -amino (C<sub>14</sub>-C<sub>17</sub>) e são produzidos como uma mistura de oito isômeros (Bland, 1996). As iturinas possuem alto poder hemolítico e antifúngico já que permeabilizam a parede celular de fungos (Maget-Dana e Peypoux, 1994). A fengicina é um decapeptídeo cíclico também produzido pelo *Bacillus* e a qual possui propriedades antifúngicas (Romero et al., 2007). Há uma vasta informação sobre a seleção de micro-organismos antagônicos, assim como a caracterização dos metabólitos produzidos por eles (Bernal; Illanes; Ciampi, 2002). No entanto, as dificuldades econômicas nos países em desenvolvimento de se obter um micro-organismo geneticamente modificado que produza lipopeptídeos com propriedades antifúngicas em grandes quantidades representa um fator limitante, a utilização de agentes mutagênicos, como acridina laranja, luz UV e antibióticos geram modificações genéticas e não requerem inserção de ADN estranho no micro-organismo (Bernal; Illanes; Ciampi, 2002), pode ser uma ferramenta muito útil na obtenção destes mutantes.

O *Aspergillus fumigatus* é um fungo que se pode encontrar em qualquer tipo ambiente, quando se desenvolve em vegetais tem a capacidade de degradar a parede celular afetando gravemente o crescimento destes (de Vries e Visser, 2001). É o causante da

38

aspergilose invasiva em pacientes imunodeprimidos ocasionando taxas de mortalidade entre o 60 % e 90 % (Tekaia e Latgé, 2005).

O *Aspergillus flavus* é um fungo que cresce em uma ampla variedade de cereais de consumo humano e animal o que implica um risco para a saúde humana e animal, já que é amplamente reconhecido como produtor de aflatoxinas. Estes metabolitos secundários são um serio risco para a saúde humana, já que podem causar hepatite, câncer hepático e imunossupressão em seres humanos (Gong et al., 2014).

Por tanto, O objetivo deste trabalho foi selecionar cepas do *Bacillus* a partir de banco de cultura microbiana com maior atividade antifúngica contra os fungos *Aspergillus flavus* var. *oryzae* e *Aspergillus fumigatus* e, além disso, identificar o lipopeptídeo produzido na fermentação semi-sólida.

# 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

#### 2.2.1 MICRO-ORGANISMO E SUA MANUTENÇÃO

Foram utilizadas 8 cepas do *Bacillus*: *Bacillus subtilis* subsps *subtilis* NRRL B-14819, *Bacillus. subtilis* subps. *subtilis* NRRL NRS-1270, *Bacillus subtilis* subps. *subtilis* NRRL NRS-744, *Bacillus* sp. NRRL B-41094, *Bacillus* sp. NRRL B-41294, *Bacillus* sp. NRRL B-41337, *Bacillus* sp. NRRL B-41288, *Bacillus. subtilis* subsp. *Spizizenii* CCT 0089. Os fungos fitopatógenos utilizados foram: *Aspergillus fumigatus Fresenius* NRRL 164, *Aspergillus fumigatus Fresenius* NRRL 166 e *Aspergillus flavus* var. *oryzae* NRRL 484.

As cepas foram adquiridas das coleções Northern Regional Research Center (NRRL - USDA - Peoria, IL), Coleção de Culturas Tropical (CCT - Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "Andre Tosello"- Campinas, SP).

Cada linhagem do *Bacillus* foi ativado em 100 mL da infusão cérebro-coração a 30°C, 150 rpm por 48 h, posteriormente foram repicadas em ágar nutriente a 30°C por 24 h.

As linhagens dos fungos foram cultivados em ágar batata dextrose (PDA) por 7 dias a. Todas as culturas foram armazenadas a 4 °C.

## 2.2.2 PREPARO DO INÓCULO

As cepas do *Bacillus* foram inoculadas segundo a metodologia de Price et al. (2007) em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio líquido TGY (5 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 1 g de glicose e 1 g de  $K_2$ HPO<sub>4</sub> para 1 L). Os frascos foram incubados em shaker a 30°C e 120 rpm por 48h.

## 2.2.3 INDUÇÃO À MUTANOGENESE

Foram usadas as metodologias de Feignier, Besson, Michel, (1995) e Bernal, Illanes, Ciampi (2002) com algumas modificações. Quando se utilizou a metodologia de Feignier, Besson, Michel, (1995), 100  $\mu$ L do inóculo anteriormente descrito foram transferidos para placas de Petri contendo ágar infusão de cérebro e coração (BHI) e 200  $\mu$ g/mL de estreptomicina. Estas placas foram incubadas por 48 h a 37 °C. Após este período as colônias sobreviventes foram novamente inoculadas em ágar BHI contendo 500  $\mu$ g/mL de estreptomicina e mantidas sob as mesmas condições de incubação anterior.

Após deste período, as colônias sobreviventes foram cultivadas em meio TGY por 24 h a 30 °C e 120 rpm; posteriormente, 25  $\mu$ L foram transferidas em placas de Petri contendo ágar BHI sem estreptomicina, que foram exposta à luz UV por intervalos de 15 a 60 segundos.

As colônias sobreviventes ao tratamento com UV foram inoculadas em placas com ágar BHI isento de antibiótico e foram mantidas a 37°C por 48h e posteriormente repicadas em tubos de ensaio com ágar nutriente e mantidas a 4°C por 24h.

Segundo a metodologia de Bernal, Illanes, Ciampi (2002), utilizou-se uma suspensão de 50  $\mu$ L de cada linhagem de *Bacillus* que foram inoculadas e cultivadas em tubos com 2 mL de peptona. A cada tubo com 2 mL de peptona foram adicionados 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 e 40  $\mu$ L de solução 1 mg/mL do agente mutagênico acridina laranja e foram

40

incubados a 25 °C e 150 rpm por 24 h. Após este período, os micro-organismos foram inoculados em meio BHI a 30°C por 24 h e posteriormente transferidos para tubos de ensaio contendo ágar nutriente que foram conservados a 4 °C por 24h após crescimento das culturas.

# 2.2.4. SELEÇÃO DOS BACILLUS COM ATIVIDADE ANTAGÔNICA

Ao todo 24 cepas de *Bacillus*, entre silvestres e mutantes, foram ensaiadas quanto ao antagonismo pelo método de difusão em ágar, ou seja, as 8 cepas do *Bacillus* e seus respectivos mutantes obtidos no item 2.2.3, utilizando culturas de 24 horas para garantir a viabilidade das mesmas.

Os esporos de cada cepa dos fungos do item 2.2.1 foram transferidos para se respectivo tubo de ensaio contendo 1 mL de água que resultou em suspensão com 2,3 x  $10^7$  esporos/mL e, 50 µL da suspensão contendo os esporos foram inoculados em discos de papel estéril de 2 cm de diâmetro no centro das placas de Petri contendo ágar sabouraud. A atividade antagônica foi avaliada em um período de 7 dias a 30°C. O raio de inibição radial dos fungos *Aspergillus* foi calculada segundo Rakotoniriana et al. (2013) usando a seguinte equação:

Porcentagem de inibição radial (%) =  $\frac{(R_c - R_i) \times 100}{R_c}$ 

Onde Rc = Raio do crescimento fúngico na placa de Petri de controle, Ri = Raio do crescimento fúngico nas placas de Petri inoculadas.

## 2.2.5. ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS BACILLUS

Segundo método modificado de Monteiro, Mariano, Souto-Maior (2005), suspensões das bactérias foram preparadas com todos os *Bacillus* conforme o item 2.2.2 incluindo os mutantes e foram inoculadas em ágar nutriente a 37 °C por 24 h. Cada uma cepa das cepas foram transferidas em meio ágar sangue em placas de Petri, que foram

incubadas a 30°C e 37°C. As leituras dos diâmetros dos halos de hemólise foram feitas em 24, 48 e 72 horas, sendo o resultado expresso em mm. Esta metodologia é utilizada na identificação de cepas produtoras de biosurfactantes.

## 2.2.6 FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA

O meio de cultivo foi composto por misturas dos farelos de soja, trigo e arroz e como suporte inerte casca de arroz. A granulometria dos farelos e casca era de 0,55 mm. A análise granulométrica foi feita usando agitador de peneiras, sendo coletada as partículas retidas entre as peneiras MESH 48 e MESH 28. O meio foi enriquecido com a solução nutriente modificada de Akpa et al. (2001) como é apresentado na Tabela 2.1 e umidificado com 8,4 mL de meio 3S modificado (Mizumoto; Hirai; Shoda, 2006) ate atingir o 70% de umidade (Tabela 2.2).

CuSO <sub>4</sub>	0,001
FeCl <sub>3</sub>	0,005
NaMnO <sub>4</sub>	0,004
KI	0,002
$ZnSO_4$	0,014
$H_3BO_3$	0,01
MnSO <sub>4</sub>	0,0036

Tabela 2.1: Solução nutriente modificada de AKPA et al. (2001) em g/L.

Tabela 2.2: Meio 3S modificado de SHODA et al. (2006) em g/L.

Glicose	0,001
Peptona	0,005
$KH_2PO_4$	0,004
MgSO <sub>4</sub>	0,002

Na fermentação foram utilizados 30 gramas de meio (50% farelo de soja, 20% farelo de arroz, 20 % farelo de trigo e 10% casca de arroz) em embalagens plásticas (sacos plásticos) com umidade 50 % e esterilizadas por 15 minutos a 121°C. Após o resfriamento, os meios foram inoculados com 6 mL de inóculo conforme descrito no item 2.2.2 por meio de seringa hipodérmica em ambiente estéril. A fermentação foi conduzida em um período de 96 horas a 30°C. Após este período, os lipopeptídeos foram extraídos utilizando 15 gramas do meio fermentado e 30 mL de metanol grau (HPLC) sob agitação 200 rpm por 1 hora a 25°C posteriormente filtrados e armazenados. Os lipopeptídeos foram identificados por meio de a cromatografia em camada delgada (CCD) em placas de sílica gel 60 PF<sub>254</sub> (5-25  $\mu$ m), 20 x 20 cm da Merck (Darmstadt, Alemanha) utilizando-se o padrão da iturina a e como fase móvel as soluções: clorofórmio-metanol (4:6) e clorofórmio-metanol-agua (65:24:5). Os lipopeptídeos foram revelados com água (Razafindralambo et al., 1993).

#### 2.2.7 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Amostras aquosas da extração dos meios sólidos foram misturadas em volumes iguais com solução de 10 mg/mL de matriz ácido  $\alpha$ -ciano-4-hydroxicinamico, em H<sub>2</sub>O/acetonitrila e imediatamente aplicadas (1.6 µL) em placas MALDI e deixadas para secar. A calibração foi feita no espectrômetro de massas Waters Sinap HDMS (Manchester, UK) antes das análises utilizando adutos de polietilenoglicol (PEG) 600/1000/2000 entre m/z 700 e 3000 e espectrômetro de massas. Os espectros foram obtidos entre m/z 900 e 1120, à taxa de 1 Hz.

#### **2.3 RESULTADOS**

## 2.3.1 ATIVIDADE ANTAGÔNICA

Neste trabalho, foi utilizada a metodologia da atividade antagônica para comparar a produção de compostos antifúngicos entre os mutantes e as cepas silvestres de *Bacillus*. De

todas as bactérias e mutantes obtidos, quatro cepas silvestres e uma mutante apresentam efeito antagônico contra os fungos *Aspergillus*, sendo a mutante (NRRL NRS 744M) obtida com acridina laranja. Observaram-se mudanças morfológicas nos fungos devido à lise do micélio ocasionada pelos *Bacillus* (Figura 2.1), os resultados da porcentagem do raio de inibição foram calculados (Tabela 2.3). A cepa NRRL NRS-1270 apresentou forte atividade antagônica contras as três cepas de fungos testados, inibindo 90% do crescimento radial do *Aspergillus fumigatus fresenius*, 166, 63% do *Aspergillus fumigatus fresenius* NRRL 164 e 66% do *Aspergillus flavus* var. *oryzae* NRRL 484. As elevadas porcentagens de inibição radial do crescimento fúngico das três cepas testadas, mostram o potencial que *Bacillus subtilis* NRRL NRS-1270 tem no controle dos fungos produtores de aflatoxinas *Aspergillus fumigatus e Aspergillus flavus*. As cepas silvestres NRRL B-14819, B-41094, B-41294 e B-41288 não apresentaram nenhuma atividade antifúngica. Este resultado confirma que 50% das cepas silvestres e 93,75 % dos mutantes não apresentaram atividade antifúngica.

**Tabela 2.3:** Atividade antagônica de diferentes cepas de Bacillus contra Aspergillusfumigatus fresenius NRRL 164, Aspergillus fumigatus fresenius NRRL 166 e Aspergillusflavus var. oryzae NRRL 484. A inibição é expressa em porcentagem de inibição radial

(%).

	Antagonista				
Fungos	NRS-1270	NRS-744	NRS-744M	B-41337	CCT-0089
Aspergillus fumigatus Fresenius 164	63	0	23	0	20
Aspergillus fumigatus Fresenius 166	90	0	0	76	0
Aspergillus flavus var. Oryzae 484	66	55	0	0	44

M = cepa mutante



Figura 2.1: Atividade antifúngica contra o Aspergillus flavus var. oryzae NRRL-484 em meio ágar PDA a 30°C após 72 horas: (A) *B. subtilis* subsp. spizizenii CCT 0089;
(B) *B. subtilis* subps. subtilis NRRL NRS-744; (C) *B. subtilis* subps. subtilis NRRL NRS-1270. Contra o Aspergillus fumigatus NRRL-166: (D) Bacillus sp. NRRL B-41337; (E) *B. subtilis* subps. subtilis NRS-1270 e contra Aspergillus fumigatus NRRL-164: (F) *B. subtilis* subps. subtilis NRRL NRS-744M; (G) *B. subtilis* subps. subtilis NRRL NRS-1270; (H) *B. subtilis* subps. subtilis subps. subtilis subsp. spizizenii CCT 0089

# 2.3.2 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

O teste de atividade hemolítica tem sido amplamente utilizado para detecção de micro-organismos produtores de biosurfactantes, por ser de fácil manipulação e simples. Os resultados mostraram que uma linhagem silvestres (NRRL B-41294) e uma mutante (NRRL 41094M) obtida com acridina laranja foram as únicas que apresentaram capacidade

hemolítica, mostrando zonas de hemólise ao redor das colônias de 2 a 4 mm de espessura respectivamente (Figura 2.2). As outras cepas não apresentaram atividade hemolítica.



Figura 2.2: Atividade hemolítica após de 72 horas a 30°C (A) *Bacillus* sp. NRRL B-41294; (B) *Bacillus* sp. NRRL B-41094.

# 2.3.3 EXTRAÇÃO E ESPECTROMETRIA DE MASSA

Os extratos metanólicos da fermentação semi-sólida do *Bacillus subtilis* subps. *subtilis* NRRL NRS-1270 foram analisados em cromatografia de camada delgada (CCD) e não revelaram a presença da iturina A e surfactina, mas apresentaram algumas manchas reveladas com agua com  $R_f = 0,38$  usando como fase móvel clorofórmio-metanol-agua (65:24:5) e  $R_f = 0,45$  em clorofórmio-metanol (4:6).

Os lipopeptídeos isolados da fermentação em estado sólido foram analisados através da espectrometria de massas em espectro MALDI(+)-QTOF, a distribuição dos três compostos predominantes foram: m/z 1035.47 e m/z 1073.43m/z (Figura 2.3).


Figura 2.3: Espectro de massas de extrato etanólico da fermentação em estado sólido do *B. subtilis* subps. *subtilis* NRRL NRS-1270.

#### 2.4 DISCUSSÃO

Linhagens de *Bacillus subtilis* são conhecidas por produzirem uma série de peptídeos não ribossomais (NRPS) com amplas propriedades surfactantes, antifúngicas, hemolíticas e antibacterianas como: iturinas, surfactinas, fengicinas, micosubtilinas e bacillomicinas (Maget-Dana e Peypoux, 1994; Stein, 2005), que podem ser utilizados no controle de fungos patógenos. Publicações, entretanto sua produção em biorreatores por FSS necessita ser investigada.

A mutação com acridina laranja e por luz UV com o intuito de obter cepas mutantes com mais capacidade antifúngica alterou a capacidade de produção de lipopeptídeos antifúngicos, quando comparada com as cepas silvestres, já que luz UV afetou o sistema enzimático responsável pela biossíntese da parte peptídica dos lipopeptídeos (Feignier;

Besson; Michel, 1995) e com acridina laranja não foi possível obter uma modificação genética que favorecera a produção deste lipopeptideo.

Observou-se que o teste de atividade hemolítica, amplamente utilizado na detecção de gene responsável pela síntese de lipopeptídeos, apresentou divergências com o teste de atividade antifúngica, uma vez que neste trabalho 50% das cepas silvestres apresentaram atividade antifúngica e 12,5% apresentaram atividade hemolítica. Caso similar foi observado por Afsharmanesh et al. (2013) na produção de biosurfactantes, pois 82 % dos *Bacillus* mutantes produtores de biosurfactantes não apresentavam atividade hemolítica, demonstrando que este método permite excluir cepas com boa atividade antifúngica.

O *Bacillus subtilis* subps. *subtilis* NRS-1270 inibiu o crescimento do *Aspergillus flavus* var. *oryzae* e *Aspergillus fumigatus* com mais de 60% de redução do raio de crescimento destes fungos. A atividade antifúngica pode ter sido provocada pela produção de lipopeptídeos, que foram detectados no extrato metanólico da fermentação semi-sólida através do espectro de massas. Pesquisadores têm observado a capacidade antagônica dos *Bacillus* contra diversos fungos patógenos. Trabalhos têm reportado a redução na germinação de até 80 % do fungo *Podosphaera fusca* com o *Bacillus* spp (Romero et al., 2004). O *Bacillus amyloliquefaciens* K103, reduz o crescimento do fungo patogênico *Rhizoctonia solani* Kühn entre um 50% e 100% (Zhang et al., 2013). A cepa *Bacillus subtilis* SR/B-16 inibiu em 70% o fungo fitopatogeno *Curvularia gudauskasii* (Orberá et al., 2012). Essa capacidade de inibição dos *Bacillus* é provavelmente da decorrência da competição por nutrientes ou a produção de lipopeptídeos com capacidade antifúngica (Orberá et al., 2012).

#### 2.5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados, podemos concluir que a cepa *Bacillus. subtilis* subps. *subtilis* NRRL NRS-1270 produz lipopeptídeos com propriedades antifúngicas que

podem ser usados no controle de fungos patogênicos *A. fumigatus* e *A. flavus*, causantes da produção de aflatoxinas e Aspergillose em pacientes imunodeprimidos.

#### **2.6 AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem ao Laboratório Paracelsus (IQ/UNICAMP), Laboratório de Química Biológica (IQ/UNICAMP) pela disponibilidade dos equipamentos para a espectrometria de massas. Esta pesquisa foi financiada pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) – processo nº 2008/50736-5.

#### 2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFSHARMANESH, H.; AHMADZADEH, M., MAJDABADI, A.; MOTAMEDI, F.; BEHBOUDI, K.; JAVAN-NIKKHAH, M. Enhancement of biosurfactants and biofilm production after gamma irradiation-induced mutagenesis of *Bacillus subtilis* UTB1, a biocontrol agent of Aspergillus flavus. Archives of Phytopathology and Plant Protection, v. 46, p. 1874-1884, 2013.
- AKPA, E.; JACQUES, P.; WATHELET, B.; PAQUOT, M.; FUCHS, R.; BUDZIKIEWICZ, H.; THONART, P. Influence of culture conditions on lipopeptide production by Bacillus subtilis. Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology, v. 91-93, p. 551-561, 2001..
- BERNAL, G.; ILLANES, A.; CIAMPI, L. Isolation and partial purification of a metabolite from amutant strain of *Bacillus* sp. with antibiotic activity against plant pathogenic agents. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 12-20, 2002.
- BLAND, J. M. The first synthesis of a member of the iturin family, the antifungal cyclic lipopeptide, iturin-A<sub>2</sub>. Journal of Organic Chemistry, v. 61, p. 5663-5664, 1996.
- DE VRIES, R. P. AND VISSER, J. Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology**. v. 65, p. 497-522, 2001.

- ESHITA, S. M.; ROBERTO, N. H.; BEALE, J. M.; MAMIYA, B. M., WORKMAN, R. F. Bacillomycin L(c), a new antibiotic of the iturin group: Isolations, structures, and antifungal activities of the congeners. **Journal of Antibiotics**, v. 48, p. 240-1247, 1995.
- FEIGNIER C, BESSON F, MICHEL G. Studies on lipopeptide biosynthesis by *Bacillus subtilis*: Isolation and characterization of iturin-, surfactin+ mutants. FEMS Microbiology Letters, v. 127, p. 11-15, 1995.
- GONG, Q.; ZHANG, C.; LU, F.; ZHAO, H.; BIE, X.; LU, Z. Identification of bacillomycin
  D from Bacillus subtilis fmbj and its inhibition effects against *Aspergillus flavus*. Food
  Control, v. 36, p. 8-14, 2014.
- HUSAIN, S.; ALEXANDER, B. D.; MUNOZ, P.; AVERY, R. K.; HOUSTON, S.;
  PRUETT, T.; JACOBS, R., DOMINGUEZ, E. A., TOLLEMAR, J. G.;
  BAUMGARTEN, K.; YU, C. M.; WAGENER, M. M., LINDEN, P.; KUSNE, S.;
  SINGH, N. Opportunistic mycelial fungal infections in organ transplant recipients:
  Emerging importance of non-*Aspergillus* mycelial fungi. Clinical Infectious Diseases,
  v. 37, p. 221-229, 2003.
- KLICH, M. A.; LAX, A. R.; BLAND, J. M.; SCHARFENSTEIN, L. L. Influence of iturin A on mycelial weight and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in shake culture. **Mycopathologia**, v. 123, p. 35-38.
- KIM, P. I.; BAI, H.; BAI, D.; CHAE, H.; CHUNG, S.; KIM, Y.; PARK, R.; CHI, Y. T.
  Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. Journal of Applied Microbiology, v. 97, p. 942-949, 2004.
- MAGET-DANA, R AND PEYPOUX, F. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: Biological and physicochemical properties. **Toxicology**, v. 87, p. 151-174, 1994.
- MIZUMOTO, S.; HIRAI, M.; SHODA, M. Production of lipopeptide antibiotic iturin A using soybean curd residue cultivated with *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 72, p. 869-875, 2006.
- MONTEIRO, L, DE LIMA RAMOS MARIANO R, SOUTO-MAIOR AM. Antagonism of Bacillus spp. against Xanthomonas campestris pv. campestris. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 48, p. 23-29, 2005.

- MOYNE, A. L.; SHELBY, R.; CLEVELAND, T. E.; TUZUN, S. Bacillomycin D: An iturin with antifungal activity against Aspergillus flavus. Journal of Applied Microbiology, v. 90, p. 622-629, 2001.
- ONGENA, M AND JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in Microbiology**, v. 16, p. 115-125, 2008.
- PRICE, N. P. J.; ROONEY, A. P.; SWEZEY, J. L., PERRY, E.; COHAN, F. M. Mass spectrometric analysis of lipopeptides from *Bacillus* strains isolated from diverse geographical locations. FEMS Microbiology Letters, v. 271, p. 83-89, 2007.
- RAKOTONIRIANA,E. F.; RAFAMANTANANA, M.; RANDRIAMAMPIONONA, D.; RABEMANANTSOA, C.; URVEG-RATSIMAMANGA, S.; EL JAZIRI, M.; MUNAUT, F.; CORBISIER, A. M.; QUETIN-LECLERCQ, J.; DECLERCK, S. Study in vitro of the impact of endophytic bacteria isolated from *Centella asiatica* on the disease incidence caused by the hemibiotrophic fungus *Colletotrichum higginsianum*. Antonie van Leeuwenhoek, **International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 103, p. 121-133, 2013.
- RATON, T .O.; GIRO, Z. G.; DIAZ, M. S. AND PEREZ, S. R. 2011. In vitrogrowth inhibition of Curvularia gudauskasii by *Bacillus subtilis*. Annals of Microbiology, V. 62 P. 545-551, 2011.
- RAZAFINDRALAMBO, H.; PAQUOT, M.; HBID, C.; JACQUES, P., DESTAIN, J., THONART, P. Purification of antifungal lipopeptides by reversed-phase highperformance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 639, p. 81-85, 1993.
- ROMERO, D., PÉREZ-GARCÍA, A., RIVERA, M. E., CAZORLA, F. M., DE VICENTE, A. Isolation and evaluation of antagonistic bacteria towards the cucurbit powdery mildew fungus *Podosphaera fusca*. Applied Microbiology and Biotechnology. v. 64, p. 263, 2004.
- ROMERO, D.; DE VICENTE, A.; RAKOTOALY, R. H., DUFOUR, S. E.; VEENING, J.W.; ARREBOLA, E.; CAZORLA, F. M.; KUIPERS, O. P.; PAQUOT, M.; PÉREZ-GARCÍA, A. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in

antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. Molecular Plant-Microbe Interactions, v. 20, p. 430-440, 2007.

- STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: Structures, syntheses and specific functions. Molecular Microbiology, v. 56, p. 845-857, 2005.
- TEKAIA, F. E LATGÉ, J. P. *Aspergillus fumigatus*: Saprophyte or pathogen. Current Opinion in Microbiology, v. 8, p. 385-392, 2005.
- WANG, Q.; CHEN, S.; ZHANG, J.; SUN, M.; LIU, Z.; YU, Z. Co-producing lipopeptides and poly-γ-glutamic acid by solid-state fermentation of *Bacillus subtilis* using soybean and sweet potato residues and its biocontrol and fertilizer synergistic effects. Bioresource Technology. v. 99, p. 3318-3323, 2008.
- YOSHIDA, S.; HIRADATE, S.; TSUKAMOTO, T.; HATAKEDA, K.; SHIRATA, A. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. **Phytopathology**, v. 91, p. 181-187, 2001.
- YU, G. Y.; SINCLAIR, J. B.; HARTMAN, G. L.; BERTAGNOLLI, B. L. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. Soil Biology and Biochemistry, v. 34, p. 955-963, 2002.
- ZHANG, T.; SHI, Z. Q.; HU, L. B.; CHENG, L. G.; WANG, F. Antifungal compounds from *Bacillus subtilis* B-FS06 inhibiting the growth of *Aspergillus flavus*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. v. 24, p. 783-788, 2008.
- ZHANG, B.; DANG, C.; SHANG, Q.; HAN, Y.; LI. P. New insight into membrane-active action in plasma membrane of fungal hyphae by the lipopeptide antibiotic bacillomycin L. Biochimica et Biophysica acta, v. 1828, p. 2230-2237, 2013.

### **CAPÍTULO 3**

# Rapid purification and quantification of lipopeptide iturin A produced in solid state fermentation by a new strain, *Bacillus Iso* 1

Artigo submetido para publicação em: Chromatographia

## Rapid purification and quantification of lipopeptide iturin A produced in solid state fermentation by a new strain, *Bacillus Iso* 1

Piedrahíta-Aguirre, C. A.<sup>1</sup>; Rath, S.<sup>2</sup>; Gomes, A. F.<sup>3</sup>; Gozzo, F. C.<sup>3</sup>; Prando, A.<sup>4</sup>; Tasic, L.<sup>4</sup>; Monte Alegre, R.<sup>1</sup>

- Department of Food Engineering, College of Food Engineering, State University of Campinas, P.O. Box 6121, 13083-862, Campinas, São Paulo, Brazil
- (2) Institute of Chemistry, Department of Analytical Chemistry, State University of Campinas, P.O. Box 6154, 13084-971 Campinas, São Paulo, Brazil
- (3) Dalton Mass Spectrometry Group, Institute of Chemistry, State University of Campinas, P.O. Box 6154, 13084-862, Campinas, São Paulo, Brazil
- (4) Chemistry Institute, State University of Campinas, P.O. Box 6154, 13084-971, Campinas, São Paulo, Brazil.

**Abstract:** This work shows the isolation, purification and identification of lipopeptide iturin A produced by a new strain, *Bacillus Iso* 1, which was isolated from soybean roots. The solid state fermentation was carried out in an Erlenmeyer flask, using a soybean meal as rich protein medium to produce iturin A at 30°C for 96 h. The iturin A was then separated from the fermentation medium using two extraction solutions: (1) CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH (2:1, v/v) and (2) CH<sub>3</sub>OH. After solvent removal, the resulting powders were dissolved in methanol. Iturin A was purified using column chromatography packed with activated Silica gel 60 and alumina (10 x 300 mm). Two different solvent systems were evaluated in the purification process. The collected fractions were analyzed by reversed-phase high performance liquid chromatography coupled to a photodiode array detector and electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS). The analyses showed the presence of iturin clusters around m/z 1028, 1065 and 1094. These results demonstrated that the production of iturin A by the new strain *Bacillus Iso* reached 192 mg/kg wet substrate (400 mg/kg dry substrate). The distribution of iturin A isoforms was similar among standard iturin A solution and isolated fractions as shown in HPLC chromatograms, <sup>1</sup>H NMR

spectra and MALDI-QTOF spectra. The five isoforms of iturin A were eluted at the retention time of 6.5 to 16.4 min. In conclusion, the *Bacillus Iso* 1 is a new strain producer of iturin A and this inexpensive, fast and efficient new method of iturin A purification allowed rapid identification of this lipopeptide producing *Bacillus* strains in solid state fermentation process, which is especially interesting for laboratories with limited resources.

Keywords: Iturin, Bacillus subtilis, purification, glass column chromatography, mass spectrometry.

#### **3.1 INTRODUCTION**

Plant roots form an environment that offers different microhabitats for bacterial growth. For example, the bacteria of the genus Bacillus, Pseudomonas, Enterobacter and Agrobacterium are frequently isolated from such habitat (Cho et al., 2003). The genus *Bacillus* can produce a wide variety of commercial products, such as enzymes, antibiotics, amino acids and insecticides, which shows the biotechnological potential of this bacterial genus (Zhao et al., 2013). Biosurfactants, amphiphilic molecules produced by many bacterial strains, can have different chemical structures belonging to glycolipids, lipopeptides, lipoproteins and fatty acid derivatives (Banat; Makkar; Cameotra, 2000; Murkherjee et al., 2009). Among these molecules, iturin A is a part of a group of cyclic lipopeptides produced by Bacillus subtilis strains (Bland, 1996; Maget-Dana; Harnois; Ptak, 1989). Its chemical structure is almost always heptapeptidic with seven  $\alpha$ -aminoacids linked to a β-amino fatty acid whose alquil chain can be linear or branched (Maget-Dana and Peypoux, 1994). Moreover, *Bacillus subtilis* produces other compounds from the same category: mycosubtilin, other iturins (A-C), and bacillomycins (D, F, L). These molecules have a common structure, but they differ in their aminoacid composition, aminoacid position, as well as in the length of the fatty acid chain (Peypoux, 1978; Winkelmann et al., 1983; Peypoux; Besson; Michel, 1980; Eshita et al., 1995; Bonmatin; Laprévote; Peypoux, 2003). Iturin A is a powerful antifungal agent (Besson et al., 1978; Cho et al., 2003) and it is regularly produced as a mixture of eight isomers  $(A_1-A_8)$ , due to the variation in length of  $\beta$ -hydroxy fatty acids chain which varies from C<sub>13</sub> to C<sub>18</sub> and the chains that could be *n*- or iso- (Bland, 1996; Delcambe; Peypoux; Besson, 1977; Isogai et al., 1982; Iwase; Rahman; Ano, 2009).

There are many methods for biosurfactants quantification and detection, but some of those methods have deficiencies affecting accuracy. The oil spreading mechanism is influenced by the lipopeptides variety produced in the fermentation process and with the hemolytic test it is possible to obtain a false negative on biosurfactants without hemolytic effects (Afsharmanesh et al., 2003; Youssef et al., 2004; Mukherjee; Das; Sen, 2009).

The development of an efficient, rapid and accurate method for estimating lipopeptides concentration and yield is yet another vital factor in selecting bacterial strains having high production properties as well as for routine estimation of the lipopeptide produced by various strains in different media and culture conditions (Mukherjee; Das; Sen, 2009). It can also provide an index for the construction of engineered strains and the optimization of fermentation conditions (Yuan et al., 2011). The extraction and purification techniques most used in iturin A separation protocols so far are precipitation, solid-liquid extraction, thin layer chromatography (TLC), high performance liquid chromatography (HPLC), gel permeation chromatography (GPC), ion exchange chromatography (IEC) and ultrafiltration (UF) (Sivapathasekaran et al., 2010; Razafindralambo et al., 1993; Lin and Jiang, 1997; Isae et al., 2007). It was possible to extract and separate lipopeptides from a solid state fermentation processes using ultrafiltration, precipitation, solvent and solid phase extraction (SPE) (Wang et al., 2008). The methods of isolation and purification of lipopeptides in submersed fermentation have been profoundly investigated and well documented (Yuan et al., 2011; Razafindralambo et al., 1993; Benitez et al., 2010; Kim et al., 2010; Chen et al., 2008; Liu et al., 2007; Gong et al., 2006; Kim et al., 2004). Several of these methodologies could be adapted to solid state fermentation such as: solvent extraction, precipitation and SPE (Besson et al., 1978; Razafindralambo et al., 1993; Mizumoto; Hirai; Shoda, 2006; Kinsella et al., 2009; Besson et al., 1976). However, some of these techniques are laborious and time consuming, as for example acid precipitation although widely used as pretreatment for quantification of iturin. In this method the fermentation broth should stay at 4°C for one night after pH adjustment to 2.0 then the precipitates obtained by centrifugation are dissolved in methanol after washing with water till pH 7.0 (Yuan et al., 2011). It is necessary to know the nature and type of the substrates, fermentation reaction, as well as physical and chemical properties of the target molecules (Razafindralambo et al., 1993; Sen and Swaminathan, 2005) as the use of some of these techniques depends on the kind of substrate, final product and available resources. Only few studies have been reported on purification of iturin A in solid state fermentation and bulk soil (Ohno; Ano; Shoda, 1992, 1993, 1995, 1996; Ano et al., 2009; Asaka and Shoda, 1996; Kondoh; Hirai; Shoda, 2001; Szczech and Shoda, 2004, 2006; Mizumoto; Hirai; Shoda, 2007).

It was found that the methodologies previously named did not fit in our process due to high protein content of our samples (46%) which interferes in the HPLC analysis. Therefore, a new method of purification and quantification was developed to remove high interfering protein content. The *Bacillus Iso* 1 is a new strain that was isolated from soybean roots and there is currently no research on production and purification of iturin A for this strain.

The aim of this work was to develope a fast, economic and efficient purification methodology that allows to purify, quntify and identify the iturin A isomers produced in a substrate rich in protein in solid state fermentation by new strain *Bacillus Iso* 1.

#### **3.2 METHODOLOGY**

#### **3.2.1 EQUIPMENT**

The high performance liquid chromatography measurements were carried out using a binary gradient chromatographic system from Waters (USA), model 1525 coupled to a Waters photodiode array detector (PDA) model 2996 and a Rheodyne injector, model 7725 (sample loop of 20  $\mu$ L). Data acquisitions were performed by the Millenium<sup>32</sup> 4.0 software. MALDI(+)-QTOF-MS measurements were carried out on a Waters Synapt HDMS instrument (Manchester, UK), using reflectron W-mode and operating with a 200-Hz solid state (Nd:YAG) laser. Spectra were acquired between m/z 700 and 1500, at a rate of 1 Hz. Typical operating conditions were laser energy 250 a.u., sample plate 20 V, *Trap* collision energy 6 eV, *Transfer* collision energy 4 eV and detector 1700 V. Calibration was performed prior to all analyses using polyethylene glycol (PEG) 600/1000/2000 sodium adducts between m/z 700 and 3000.

NMR analyses were carried out in Varian INOVA-500 ( $B_0 = 11.7$  T) spectrometer equipped with a nanoprobe, operating at hydrogen frequency of 499.89 MHz at 298 K.

#### **3.2.2 REAGENTS**

Iturin A (purity  $\geq 90\%$ ) was purchased from SIGMA ALDRICH (St. Louis, MO, USA). Analytical grade methanol and chloroform were purchased from LABSYNTH (São Paulo, Brazil) and HPLC-grade methanol from J.T. BAKER (New York, USA). Throughout the study, water was obtained from a Milli-Q system from MILLIPORE (Bedford, MA). Before HPLC analyses, all the solutions were filtered through 0.22 µm membrane filters from MILLIPORE (Bedford, MA).

Column chromatography was performed in glass columns provided by UNIVIDROS (Riberão Preto, Brazil) packed with silica gel 60 (230-400 mesh) from VETEC (São Paulo, Brazil). Thin layer chromatography was carried out on Silica gel  $F_{254}$  plates MERCK (Damstadt, Germany).

The solid phase extraction was performed on cartridges  $C_{18/22}$  from APPLIED SEPARATION (Allentown, PA).

#### 3.2.3 ISOLATION MICROORGANISM AND CULTURE CONDITIONS

The iturin producing strain *Bacillus Iso* 1 used in this study was isolated from soy roots collected from a soybeans culture in Campinas-Brazil. Once isolated, the culture was maintained on brain heart infusion agar (BHIA) at 5°C. The bacterial inoculum was prepared using 30 g/L soybean meal and 1% agar in 250 mL flask at 37°C until biofilm formation was completed in 48 h.

#### 3.2.4. SOLID STATE FERMENTATION

Defatted Soybean meal (Bunge. Alimentos S.A., Brazil) with 46% protein was used as a solid substrate. For this purpose, 10 g of soybean meal was transferred to a 250 mL Erlenmeyer flask with a cotton plug. Moisture was adjusted to 50% with distilled water and autoclaved at 120 °C for 20 min. The bacterial biofilm was fragmented with sterile water and 4 mL of the formed suspension was inoculated and mixed with a stainless steel spatula. All Erlenmeyer flasks were incubated statically at 30°C for 96 h.

#### 3.2.5. ISOLATION OF ITURIN A

Once the fermentation was ended, two extraction solvents and solid phase extraction cartridges  $C_{18/22}$  were evaluated to separate the formed iturin A from the fermentation medium: chloroform-methanol (2:1, v/v) and methanol. Two grams of the fermented material previously obtained were added to 10 mL of solvent and the mixture was stirred in a rotary shaker (Marconi, Mod. MA 830, Piracicaba, Brazil) at 20 °C, 150 rpm for 30 minutes. The obtained extract was filtered through 0.22 µm membrane filters and concentrated to a dry state under a vacuum pressure. The residue was dissolved in 1 mL of methanol and characterized by thin layer chromatography using the conditions described by Razafindralambo et al. (1993).

The solid phase extraction was performed using the modified methodology of Kinsella et al. (2009). The cartridges were loaded with 1 mL of methanolic extract from the solvent extract and eluted with methanol, then evaporated dry, redissolved in 1 mL of methanol and refiltered (0.2 mm) for subsequent HPLC injection and analyses.

#### **3.2.6. PURIFICATION OF ITURIN A**

Purification of the extract was carried out using column chromatography. For this purpose a glass column (300 x 10 mm) was packed successively with 4 g of activated silica gel 60 and 1 g of alumina. An aliquot of 250  $\mu$ L of the extract was introduced on the top of the column and two conditions with different solvents and polarities were evaluated: (I) 20 mL of chloroform-methanol (4:1, v/v) fraction Y<sub>1</sub>, followed by 20 mL of chloroform-methanol (2:1, v/v) fraction Y<sub>2</sub>, then 20 mL of chloroform-methanol (1:1, v/v) fraction Y<sub>3</sub> and finally 10 mL of methanol fraction Y<sub>4</sub> and (II) 20 mL of chloroform-methanol-water (65:25:4, v/v/v) fraction P<sub>1</sub>, followed by 20 mL of chloroform-methanol-water (30:50:10,

v/v/v) fraction P<sub>2</sub>, and finally 10 mL of chloroform-methanol-water (20:60:15, v/v/v) fraction P<sub>3</sub>. The previous mobile phases were obtained modifying the mobile phases described by Besson and Michel, (1987). Fractions of 20 mL were collected after each solvent mixture, dried under nitrogen flow and the obtained residue was dissolved in 1 mL of methanol before analysis by HPLC-DAD.

Chromatographic separation was carried out using a ODS Hypersil® THERMO RP-18 column (150 ×4.6 mm, 3  $\mu$ m, Thermo Scientific, USA) and two mobile phases were evaluated: (I) containing methanol-water (70:30, v/v) modified as described by Phae; Shoda e Kubota, (1990)and (II) containing acetonitrile-10 mM ammonium acetate (3:4, v/v) (Ohno; Ano; Shoda, 1996). The flow rate was 1.0 mL min<sup>-1</sup> and detection was performed at 270 nm.

#### 3.2.7 MASS SPECTROMETRY

Aqueous samples were mixed in equal volumes with a 10 mg mL<sup>-1</sup> solution of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix in H<sub>2</sub>O/acetonitrile 1:1 (v/v) containing 0.1% trifluoroacetic acid (TFA). Mixtures were then directly spotted (1.6 µL) onto MALDI target plates and allowed to dry. Calibration was performed prior to all analyses using polyethylene glycol (PEG) 600/1000/2000 sodium adducts between *m*/*z* 700 and 3000. Spectra were acquired between *m*/*z* 700 and 1500, at a rate of 1 Hz.

#### 3.2.8 NMR

The samples were prepared by dissolving 2-5 mg extracts in 40  $\mu$ L of deuterated methanol (CD<sub>3</sub>OD) and transferred to nano NMR tube. A total of 128 transients were acquired into 65.5 K data points using a spectral width of 7998.40 Hz and an acquisition time of 4 s. The delay time was 1 s and the 90° pulse. All spectra were processed with VNMR software (Varian, Palo Alto, CA), with chemical shifts expressed in ppm and referenced to methanol (3.31 or 4.87 ppm for residual water signal).

#### **3.3 RESULTS**

#### 3.3.1 ISOLATION AND PURIFICATION

In order to evaluate the production of iturin A by *B. subtilis Iso* 1 in solid-state fermentation (SSF), it was necessary to develop an isolation and purification process. For the extraction of iturin A from the fermentation medium, two solvents were employed: chloroform-methanol (2:1, v/v) or methanol. The obtained extracts were analyzed by TLC. Iturin A showed a white spot with a retention factor of 0.53 using the TLC conditions described by Razafindralambo et al. (1993). It was verified, that only the mixture chloroform-methanol (2:1, v/v) was able to extract iturin A form the fermentation media. With methanol no substance with the characteristic retention factor of iturin could be identified on the TLC plates. Only the extracts indicating the presence of iturin underwent further purification.

After the extracts were obtained, it was necessary to purify them. The extracts containing iturin A (previously identified by TLC) were fractioned and pre-purified by column chromatography using a silica-alumina sorbent. Two different solvent systems were evaluated, I and II (described in 3.2.6).

For each solvent mixture, fractions were collected and after concentration under nitrogen flow the extracts were analyzed by HPLC-DAD.

The HPLC conditions for separation of iturin A were previously established, using an iturin A standard solution (20  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>). As stationary phase the C<sub>18</sub> column was employed. The separation was performed under isocratic elution using methanol-water 70:30 (v/v) as mobile phase. Iturin A identification was performed at 270 nm. A characteristic chromatogram is shown in Figure 3.1. Five isomers of iturin A were separated under these conditions at the following retention times (1) 6.5, (2) 8.3, (3) 8.7, (4) 14.7 and (5) 16.4 min. The last two isomers are present in a lower concentration as the others and, in consequence, the peaks were not well defined in the chromatograms.



**Figure 3.1:** Chromatogram of Iturin A (20  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) on a ODS Hypersil® RP-18 column (150 ×4.6 mm, 3  $\mu$ m). Mobile phase methanol-water (70:30, v/v); flow rate: 1.0 mL min<sup>-1</sup> and  $\lambda$ = 270 nm

The HPLC analysis of the extracts obtained in the purification process with the two solvent systems indicated the presence of iturin A only in fractions  $P_2$  and  $Y_4$  (Figure 3.2a and 3.2b). The iturin A concentration reached 400 mg/kg dry substrate (195 mg/kg wet substrate) in 96 h of fermentation.



Figure 3.2: Chromatogram of fractions (a)  $P_2$  and (b)  $Y_4$  on a ODS Hypersil® RP-18 column (150 ×4.6 mm, 3 µm). Mobile phase methanol-water (70:30, v/v); flow rate: 1.0 ml min<sup>-1</sup> and  $\lambda$ : 270 nm

#### 3.3.2 MASS SPECTROMETRY

MALDI(+)-QTOF mass spectra for the iturin A standard, as well as fractions P<sub>2</sub> and Y<sub>4</sub> were displayed in Figure 3.3. The presence of a wider variety of species in the iturin A standard and sample Y<sub>4</sub> was observed compared to fraction P<sub>2</sub>. The distribution seems to be roughly centered around the ion of m/z 1065, which corresponds to the iturin A cyclic peptide moiety (C<sub>37</sub>H<sub>51</sub>N<sub>12</sub>O<sub>14</sub>) containing a thirteen carbon alkyl chain (C<sub>13</sub>H<sub>21</sub>) for a net molecular formula of C<sub>50</sub>H<sub>72</sub>N<sub>12</sub>O<sub>14</sub>. The presence of homologous ions in which the alkyl chain ranges from C<sub>11</sub> (cluster around m/z 1028) up to C<sub>16</sub> (cluster around m/z 1100) was observed for the iturin A Sigma standard, as well as fraction Y<sub>4</sub>. The sample P<sub>2</sub>, on the other hand, contains a narrower set of species, and species in which the alkyl chain ranges from C<sub>13</sub> to C<sub>15</sub> (cluster around m/z 1094) were seen in greater abundance.



**Figure 3.3:** MALDI(+)-QTOF mass spectra for A) Iturin A Sigma standard; B) fraction Y<sub>4</sub> and C) fraction P<sub>2</sub>.

When <sup>1</sup>H NMR spectra of analyzed samples were compared, as illustrated in Figure 3.4, the fraction  $Y_4$  showed to be very similar in composition to that of the iturin A standard sample. Therefore, we can suggest that fraction  $Y_4$  is more equal to standard iturin A than fraction  $P_2$ , thus confirming the MS observations.



Figure 3.4: H NMR spectra for A) Iturin A Sigma standard; B) fraction  $Y_4$  and C) fraction  $P_2$ 

#### **3.4 DISCUSSION**

Many *Bacillus* strains produce iturin A as a mixture of eight isomers with various lengths of the acyl side-chain ( $C_{13}$ - $C_{17}$ ). The biological activity of iturin depends on the composition of the length of the lipid chain. The purity and identity of iturin A in the purified extract was carried out by RP-HPLC, H<sup>1</sup>-NMR and MALDI-ToF.

In order to evaluate the formation of iturin during the fermentation it is necessary to extract the iturin from the fermentation medium before quantification. For this purpose methanol has been used (Mizumoto; Hirai; Shoda, 2006; Ohno; Ano; Shoda, 1993). However, we observed that the high polar character of this solvent co-extracts many other substances, including proteins, aminoacids and peptides, which interfere in the further HPLC analyses; as our soybean meal contains 46% protein compared to okara which contains 28% (Mizumoto; Hirai; Shoda, 2006) and rapeseed meal 38.87% (Yao et al., 2012). Although it was already known that a chloroform-methanol solvent system can be used in iturin A extraction and purification, due to its ability to promote lipid-protein separation (Wang et al., 2004), it was still necessary to purify the sample obtained with chloroform-methanol because of the high protein content extracted.

It is worth emphasizing that the extract had to be cleaned before it could be analyzed by HPLC. Purification on a packed silica-alumina column showed to be suitable for this purpose. As can be seen in the chromatograms (Figure 3.2), no interferents co-elute with the isomers of iturin in fractions  $P_2$  and  $Y_4$ . Therefore, solvents composed of different proportions of chloroform-methanol (from 4:1 to 1:1 v/v) are suitable to remove byproducts and other substances form the solid state fermentation medium and enable obtaining pure iturin in the methanolic elution solvent. Also, the purification can be carried out using chloroform-methanol-water (65:25:4, v/v/v). However, due to the higher polarity of the iturin fractionusing chloroform-methanol-water (30:50:10, v/v/v), the last two isomers appeared in a lower concentration, indicating that these two isomers are recovered in a lesser extension.

In short, the five isoforms of iturin A were identified in the extracts of both solvent mixtures, but the isoforms were present in different concentrations, possibly because the

polarity of the organic solvent induces modifications to polypeptides and proteins (Besson et al., 1996). HPLC chromatographs obtained are similar to the chromatographs published by Ohno et al. (Ohno; Ano; Shoda, 1992) who extracted the iturin A with methanol from fermented okara and quantified this lipopeptide using as mobile phase in RP-HPLC: acetonitrile: 10mM amonium acetate (3:4, v/v). They did not have to remove the interferents because their substrate had a smaller protein content than our substrate and these authors only separated five isomers of iturin A through this method. Kim et al. (2010) extracted the iturin by precipitation, centrifugation, solvent extraction and purified this lipopeptide using Sephadex LH-20 column chromatography and RP-HPLC system. This method of purification is laborious, time consuming and expensive since the chromatographyc resin Sephadex LH-20 has a high cost and its use would be prohibitive in fermentative lipopeptide production screening by *Bacillus* strains. Yuan et al. (2011) used the system ethanol/ammonium sulfate to extract iturin A from fermentation broth and separated the homologues through RP-HPLC. However, their method allowed isolation and separation of only three iturin A isomers from the fermentation broth, using a iturin A standard from SIGMA-ALDRICH.

In the present study, the classical mobile phase composed by acetonitrile, ammonium acetate and 0.1% of trifluoroacetic acid (TFA) in water to separate lipopeptides (Yuan et al., 2011; Ohno; Ano; Shoda, 1992), was substituted by methanol 70% that allowed identification of 5 isomers of iturin A, thus reduced reagents costs and time for preparation of the mobile phase. However, the reduction of retention time was the most important advantage compared with other mobile phases where retention time for the first peak was 10 min (Phae and Shoda, 1991), 28 min (Kim et al., 2010), 8.61 min (Yuan et al., 2011), 13 min (Pryor et al., 2007).

The presence of iturin A in all samples was confirmed by MALDI-QTOF-MS measurements. Also observed in the spectra were homologues species (from  $C_{11}$  to  $C_{16}$ ) and species with higher degree of saturation in the alkyl chain. A wide distribution of species was observed for the iturin SIGMA-ALDRICH standard and sample Y<sub>4</sub>, whereas spectra for sample P<sub>2</sub> showed a narrower set of species. <sup>1</sup>H NMR data corresponded to MS results,

since the most similar spectra have been taken from standard and  $Y_4$  iturin A samples with very similar distribution and intensities of hydrogen's atoms picks.

#### **3.5 CONCLUSIONS**

The new *Bacillus Iso* 1 strain can produce iturin A in solid state fermentation. This lipopeptide was extracted applying chloroform-methanol (2:1, v/v) solution and presented five isoforms that were purified using a new method of purification introduced to compare two solvent systems. The distribution of iturin A isoforms was similar among standard iturin A solution and isolated fractions as shown in HPLC chromatograms, <sup>1</sup>H NMR spectra and MALDI-QTOF spectra. This inexpensive, fast and efficient new method of iturin A purification will allow to rapidly identify the *Bacillus* strains producers of iturin A isolated fractions as shown in HPLC chromatograms.

#### Acknowledgements

We acknowledge the financial support from the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP).

#### **3.6 REFERENCES**

- AFSHARMANESH, H.; AHMADZADEH, M.; MAJDABADI, A.; MOTAMEDI, F.; BEHBOUDI, K.; JAVAN-NIKKHAH, M. Enhancement of biosurfactants and biofilm production after gamma irradiation-induced mutagenesis of *Bacillus subtilis* UTB1, a biocontrol agent of *Aspergillus flavus*. Archives Of Phytopathology And Plant Protection, v. 46, p. 1874-1884, 2013.
- ANO, T.; JIN, G. Y.; MIZUMOTO, S.; RAHMAN, M. S.; OKUNO, K.; SHODA, M. Solid state fermentation of lipopeptide antibiotic iturin A by using a novel solid state fermentation reactor system. Journal of Environmental Sciences, v. 21, p. S162-S165, 2009.ASAKA, O. AND SHODA, M. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of

tomato with *Bacillus subtilis* RB14. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 4081-4085, 1996.

- BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbialsurfactants. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 53, p. 495-508, 2000.
- BENITEZ, L. B.; VELHO, R. V.; LISBOA, M. P., MEDINA L. F.; BRANDELLI, A. Isolation and characterization of antifungal peptides produced by Bacillus amyloliquefaciens LBM5006. Journal of Microbiology, v. 48, p. 791-794, 2010.
- BESSON, F., PEYPOUX, F.; MICHEL, G. AND DELCAMBE, L. Characterization of iturin A in antibiotics from various strains of *Bacillus subtilis*. Journal of Antibiotics, v. 29, p. 1043-1049, 1976.
- BESSON, F.; PEYPOUX, F.; MICHEL, G.; DELCAMBE, L. Identification of antibiotics of iturin group in various strains of *Bacillus subtilis*. Journal of Antibiotics, v. 31, p. 284-288, 1978. BESSON, F. AND MICHEL, G. Isolation and characterization of new iturins: iturin D and iturin E. Journal of Antibiotics, v. 40, p. 437-442, 1987.
- BESSON, F., RAIMBAULT, C., HOURDOU, M. L., BUCHET, R. Solvent-induced conformational modifications of iturin A: an infrared and circular dichroic study of a l,dlipopeptide of *Bacillus subtilis*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, v. 52, p. 793-803 1996.
- BLAND, J. M. The first synthesis of a member of the iturin family, the antifungal cyclic lipopeptide, iturin-A2. Journal of Organic Chemistry, v. 61, p. 5663-5664, 1996.
- BONMATIN, J. M.; LAPRÉVOTE, O.; PEYPOUX, F. Diversity among microbial cyclic lipopeptides: Iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening, v. 6; p. 541-556, 2003.
- 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.
- CHO, S. J.; LEE, S. K.; CHA, B. J.; KIM, Y. H.; SHIN, K. S. Detection and characterization of the *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound

iturin A from *Bacillus subtilis* strain KS03. **FEMS Microbiology Letters**, v. 223, p. 47-51, 2003.

- CHO, S. J.; LIM, W. J.; HONG, S. Y.; PARK, S. R.; YUN, H. D. Endophytic colonization of balloon flower by antifungal strain *Bacillus* sp. CY22. Bioscience, **Biotechnology** and Biochemistry, v. 67, p. 2132-2138, 2003.
- DELCAMBE, L.; PEYPOUX, F.; BESSON, F. Structure of iturin and iturin like substances. **Biochemical Society Transactions**, v. 5, p. 1122-1124, 1977.
- ESHITA, S. M.; ROBERTO, N. H.; BEALE, J. M.; MAMIYA, B. M.; WORKMAN, R. F. Bacillomycin L(c), a new antibiotic of the iturin group: Isolations, structures, and antifungal activities of the congeners. **Journal of Antibiotics**, v. 48, p. 1240-1247, 1995.
- GONG, M.; WANG, J. D.; ZHANG, J.; YANG, H.; LU, X. F.; PEI, Y.; CHENG, J. Q. Study of the antifungal ability of *Bacillus subtilis* strain PY-1 in vitro and identification of its antifungal substance (iturin A). Acta Biochimica et Biophysica Sinica, v. 38, p. 233-240, 2006.
- ISA, M. H. M.; CORAGLIA, D. E.; FRAZIER, R. A.; JAUREGI, P. Recovery and purification of surfactin from fermentation broth by a two-step ultrafiltration process. Journal of Membrane Science, v. 296, p. 51-57, 2007.
- ISOGAI, A.; TAKAYAMA, S.; MURAKOSHI, S.; SUZUKI, A. Structures of β-amino acids in antibiotics iturin A. Tetrahedron Letters, v. 23, p. 3065-3068, 1982. IWASE, N.; RAHMAN, M. S.; ANO, T. Production of iturin A homologues under different culture conditions. Journal of Environmental Sciences, v. 21, p. S28-S32, 2009.
- KIM, P. I.; BAI, H.; BAI, D.; CHAE, H.; CHUNG, S.; KIM, Y.; PARK, R.; CHI, Y. T. Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. Journal of Applied Microbiology, v. 97, p. 942-949, 2004.
- KIM, P. I.; RYU, J.; KIM, Y. H.; CHI, Y. T. Production of biosurfactant lipopeptides iturin A, fengycin, and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 20, p. 138-145, 2010.

- KINSELLA, K.; SCHULTHESS, C. P.; MORRIS, T. F.; STUART, J. D. Rapid quantification of *Bacillus subtilis* antibiotics in the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, p. 374-379, 2009.
- KONDOH, M.; HIRAI, M.; SHODA, M. Integrated biological and chemical control of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* using *Bacillus subtilis* RB14-C and flutolanil.
   Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 91, p. 173-177, 2001.
- LIN, S. C. AND JIANG, H. J. Recovery and purification of the lipopeptide biosurfactant of *Bacillus subtilis* by ultrafiltration. **Biotechnology Techniques**, v. 11, p. 413-416, 1997.
- LIU, C. H.; CHEN, X.; LIU, T. T.; LIAN, B.; GU, Y.; CAER, V.; XUE, Y. R.; WANG, B.
  T. Study of the antifungal activity of *Acinetobacter baumannii* LCH001 in vitro and identification of its antifungal components. Applied Microbiology and Biotechnology, p. 76, p. 459-466, 2007.
- MAGET-DANA, R.; HARNOIS, I.; PTAK, M. Interactions of the lipopeptide antifungal iturin A with lipids in mixed monolayers. Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes, v. 981, p. 309-314, 1989.
- MAGET-DANA, R. AND PEYPOUX, F. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: Biological and physicochemical properties. **Toxicology**, v. 87, p. 151-174, 1994.
- MIZUMOTO, S.; HIRAI, M.; SHODA, M. Production of lipopeptide antibiotic iturin A using soybean curd residue cultivated with *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 72, p. 869-875, 2006.
- MIZUMOTO, S.; HIRAI, M.; SHODA, M. Enhanced iturin A production by *Bacillus subtilis* and its effect on suppression of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 75, p. 1267-1274, 2007.
- MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SIVAPATHASEKARAN, C.; SEN, R. Antimicrobial biosurfactants from marine *Bacillus circulans*: Extracellular synthesis and purification. Letters in Applied Microbiology, v. 48, p. 281-288, 2009.
- MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Rapid quantification of a microbial surfactant by a simple turbidometric method. **Journal of Microbiological Methods**, v. 76, p. 38-42, 2009.

- OHNO, A.; ANO, T.; SHODA, M. Production of antifungal antibiotic, iturin in a solid state fermentation by *Bacillus subtilis* NB22 using wheat bran as a substrate. **Biotechnology** Letters, v. 14, p. 817-822, 1992.
- OHNO, A.; ANO, T., SHODA, M. Production of the antifungal peptide antibiotic, iturin by *Bacillus subtilis* NB22 in solid state fermentation. Journal of Fermentation and Bioengineering, v. 75, p. 23-27 1993.
- OHNO, A.; ANO, T.; SHODA M. Production of a lipopeptide antibiotic, surfactin, by recombinant *Bacillus subtilis* in solid state fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 47, p. 209-214, 1995.
- OHNO, A.; ANO, T.; SHODA, M. Use of soybean curd residue, okara, for the solid state substrate in the production of a lipopeptide antibiotic, iturin A, by *Bacillus subtilis* NB22. Process Biochemistry, v. 31, p. 801-806, 1996.
- PEYPOUX F. Structure of iturine A, a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*.Biochemistry, v. 17, p. 3992-3996, 1978.
- PEYPOUX, F.; BESSON, F.; MICHEL, G. Characterization of a new antibiotic of iturin group: bacillomycin D. Journal of Antibiotics, v. 33, p. 1146-1149, 1980.
- PHAE, G. C.; SHODA, M.; KUBOTA, H. Suppressive effect of *Bacillus subtilis* and it's products on phytopathogenic microorganisms. Journal of Fermentation and Bioengineering, v. 69, p. 1-7, 1990.
- PHAE, C. G. AND SHODA, M. Investigation of optimal conditions for foam separation of iturin, an antifungal peptide produced by *Bacillus subtilis*. Journal of Fermentation and Bioengineering, v. 71, p. 118-121, 1991.
- PRYOR, S. W., GIBSON, D. M., HAY, A. G., GOSSETT, J. M., WALKER, L. P. Optimization of spore and antifungal lipopeptide production during the solid-state fermentation of *Bacillus subtilis*. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 143, p. 63-79, 2007.
- RAZAFINDRALAMBO, H.; PAQUOT, M.; HBID, C.; JACQUES, P.; DESTAIN, J.; THONART, P. Purification of antifungal lipopeptides by reversed-phase highperformance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 639, p. 81-85, 1993.

- SEN, R. AND SWAMINATHAN, T. Characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for the small-scale recovery of surfactin. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2953-2958, 2005.
- SIVAPATHASEKARAN, C.; MUKHERJEE, S.; SEN, R.; BHATTACHARYA, B.; SAMANTA, R. Single step concomitant concentration, purification and characterization of two families of lipopeptides of marine origin. Bioprocess and Biosystems Engineering, v. 34, p. 339-346, 2010.
- SZCZECH, M. AND SHODA, M. Biocontrol of *Rhizoctonia* damping-off of tomato by *Bacillus subtilis* combined with Burkholderia cepacia. Journal of Phytopathology, p. 152, p. 549-556, 2004.
- SZCZECH, M. ANDSHODA, M. The effect of mode of application of *Bacillus subtilis* RB14-C on its efficacy as a biocontrol agent against *Rhizoctonia solani*. Journal of Phytopathology, v. 154, p. 370-377, 2006.
- WINKELMANN, G.; ALLGAIER, H.; LUPP, R.; JUNG, G. Iturin A(1) A new long chain iturin A possessing an unusual high content of C16-β-amino acids. Journal of Antibiotics, v. 36, p. 1451-1457, 1983.
- WANG, Q.; CHEN, S.; ZHANG, J.; SUN, M.; LIU, Z.; YU, Z. Co-producing lipopeptides and poly-[gamma]-glutamic acid by solid-state fermentation of Bacillus subtilis using soybean and sweet potato residues and its biocontrol and fertilizer synergistic effects. Bioresource Technology, v. 99, p. 3318-3323, 2008.
- WANG, W., VIGNANI, R., SCALI, M.; SENSI, E.; TIBERI, P.; CRESTI, M. Removal of lipid contaminants by organic solvents from oilseed protein extract prior to electrophoresis. Analytical Biochemistry, v. 329, p. 139-141, 2004.
- YAO, D.; JI, Z.; WANG, C.; QI, G., ZHANG, L., MA, X., CHEN, S. Co-producing iturin A and poly-γ-glutamic acid from rapeseed meal under solid state fermentation by the newly isolated *Bacillus subtilis* strain 3-10. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 28, p. 985-991, 2012.
- YOUSSEF, N. H.; DUNCAN, K. E.; NAGLE, D. P.; SAVAGE, K. N.; KNAPP, R. M.; MC INERNEY, M. J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by

diverse microorganisms. Journal of Microbiological Methods, v. 56, p. 339-347, 2004.

- YUAN, J.; RAZA, W.; HUANG, Q.; SHEN, Q. (2001) Quantification of the antifungal lipopeptide iturin A by high performance liquid chromatography coupled with aqueous two-phase extraction. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. v. 879, p. 2746-2750, 2011.
- ZHAO, X.; ZHOU, Z. J.; HAN, Y.; WANG, Z. Z.; FAN, J.; XIAO, H. Z. Isolation and identification of antifungal peptides from *Bacillus* BH072, a novel bacterium isolated from honey. Microbiological Research, v. 168, p. 598-606, 2013.

### **CAPÍTULO 4**

Production of lipopeptide Iturin A using novel strain *Bacillus iso* 1 in a Packed Bed Bioreactor

Artigo submetido para publicação em: Biocatalysis and Agricultural Biotechnology

### Production of lipopeptide Iturin A using novel strain *Bacillus iso* 1 in a Packed Bed Bioreactor

#### Piedrahíta-Aguirre, César Augusto.; Monte Alegre, Ranulfo

<sup>1</sup>Department of Food Engineering, Faculty of Food Engineering, University of Campinas, P.O. Box 6121, 13083-862, Campinas, Sao Paulo, Brazil.

**Abstract**: In the present study, the influence of volumetric airflow rate and rice husk as a bulking agent were evaluated in packed bed bioreactors. Solid state fermentations (SSF) were carried out using a new strain *Bacillus iso* 1 as ferment and wheat bran and soybean meal as substrates. These agro-industrial substrates are cheap sources of nutrients, such as nitrogen, carbon and minerals and can be used in the production of high value products, such as biosurfactants, enzymes, antifungics and biofuels, reducing production costs. It was found that the low concentration of rice husk and low volumetric airflow rate are important operational parameters for the production of iturin A in packed bed bioreactors. Low values avoid the generation of high pressure drops and as such favor low oxygenation, which is important for iturin A production. The highest iturin A production (6.88 g/kg of dry substrate) was achieved when SSF was carried out with a 22.9 % (w/w) of rice husk and a volumetric airflow rate of 0.46 L/min. These promising results show the potential of the new strain *Bacillus iso* 1 to produce high concentrations of lipopeptide iturin A using cheap agro-industrial substrates in packed bed bioreactors with forced aeration, in order to develop an industrial production processes.

Keywords: iturin A, Bacillus, solid-state fermentation, packed bed bioreactor, design of experiment

#### **4.1 INTRODUCTION**

Biosurfactants and amphiphilic molecules produced by many bacterial strains can have different chemical structures belonging to glycolipids, lipopeptides, lipoproteins and fatty-acid derivatives (Banat; Makkar; Cameotra, 2000; Mukherjee et al., 2009). As such, Iturin A belongs to a group of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* strains (Bland, 1996; Maget-Dana; Harnois; Ptak, 1989). The chemical structure is almost always heptapeptidic with seven  $\alpha$ -aminoacids linked to a  $\beta$ -amino fatty acid with an alkyl chain that can be linear or branched (Maget-Dana and Peypoux, 1994). Moreover, Bacillus subtilis produces other compounds from the same category: mycosubtilin, other iturins (A-C) and bacillomycins (D, F, L). These molecules have a common structure, but they differ in their aminoacid composition, aminoacid position, as well as in the length of the fatty acid chain (Peypoux, 1978; Peypoux; Besson; Michel, 1980; Winkelmann et al., 1983; Eshita et al., 1995; Bonmatin; Laprévote; Peypoux, 2003). Iturin A is a powerful antifungal agent (Besson et al., 2003; Cho et al., 2003) and regularly produced as a mixture of eight isomers  $(A_1-A_8)$ , due to the variation in both the length of  $\beta$ -hydroxy fatty acid chains, which varies from C<sub>13</sub> to C<sub>18</sub>, and the *n*- or *iso*- positioning (Bland, 1996; Delcambe; Peypoux; Besson, 1977; Isogai et al., 1982; Iwase; Rahman; Ano, 2009).

Commercially, these lipopeptide surfactins, including iturin A, are not sold as bulk chemicals (Slivinski et al., 2012) but in quantities as low as 1-5 mg, as for example by SIGMA-ALDRICH (St, Louis, MO, USA). The high cost and small production quantities of this lipopeptide hamper research on production and purification.

Most of secondary metabolites (SM) are produced in submerged fermentation processes (SmF) (Robinson; Singh; Nigam, 2001). However, solid state fermentation (SSF) may be an alternative to produce these molecules due to the high similarity in fermentation conditions and microorganism environments (Barrios-Gonzales; Fernández; Tomasini, 2003). The main advantages of SSF over SmF are: reduced cost of fermentation equipment, use of low cost raw materials, low energy consumption and production of higher yields of secondary metabolites and enzymes (Pandey; Soccol; Mitchell, 2000; Pandey, 2003; Barrios-Gonzales, 2012). Even so, the majority of studies on iturin A production are carried

out in submerged fermentation (Iwase; Rahman; Ano, 2009; Khan; Rahman; Ano, 2009; Rahman; Ano; Shoda, 2006; Akpa et al., 2001). Examples of research on solid state fermentation use chambers (Yao et al., 2012), glass flasks (Mizumoto; Hirai; Shoda, 2006), polypropilene bottle (Shih et al., 2008), glass petri dishes (Ohno; Ano; Shoda, 1993) or an agitated reactor (Ano et al., 2009) to contain the fermentation medium. However, there are not works on iturin A production in an aerated packed bed column bioreactor. For commercial implementation of solid state fermentation, the tray reactor is currently the most popular technology, and has long been known as 'Koji' fermentation in oriental countries. Nevertheless, this technology has limited capacity and poor aeration control (Lu; Maddox; Brooks, 1998). A aerated packed bed bioreactor design is a good alternative for production of iturin A at lower costs because it allows the control of the air rate that influences oxygen supply, temperature and moisture content (Lu; Maddox; Brooks, 1998).

The utilization of agro-industrial residues as substrates for production of iturin A is a good alternative, because these low-cost substrates allow for increased economic competitiveness while offering environmental benefits compared to convential substrates. Traditionally, use of agro-industrial residues by solid state fermentation of iturin A has been limited to okara, wheat bran, rapeseed meal/wheat bran and rice bran/gluten flour. However, the use of a mixture of soybean meal/wheat and bran/rice husk for production of iturin A with solid state fermentation has not yet been reported.-In our present work, the technical feasibility of using this substrate alternative is explored which can lead to additional reduction of cost price and increased environmental benefits since the availability of these residues has increased substantially in the past decade (Yao et al., 2012; Das and Mukherjee, 2007). Design of experiments (DOE) is a statistic tool that allows researchers to obtain reliable information about the process, minimizing empiric efforts while using a reduced number of experiments needed to acquire the necessary knowledge. Understanding the process and using common sense, this powerful technique can be used in the selection and/or optimization of the variables involved in the process (Rodrigues and Iemma, 2012). In this current study, the aim of this work was to investigate the effects of air flow rate and proportion of rice husk as a bulking agent on lipopeptide iturin A production in a packed bed reactor by a new, strain Bacillus Iso 1.

#### **4.2 MATERIAL AND METHODS**

#### 4.2.1 MICROORGANISM AND CULTURE CONDITIONS

The iturin producing strain *Bacillus iso 1* used in this study was isolated from soy roots collected from soybeans cultivated in Campinas-Brazil. Soy roots (2 g) were resuspended in 30 mL of a 1% NaCl solution and agited for 20 min. Subsequently, the resultant supernatant was diluted and one milliliter of each dilution was spread on defatted soybean meal and wheat meal agar. The soybean/wheat meal agar contained (w/v) 4% defatted soybean meal, 2% wheat meal and 1% agar-agar. The plates were incubated at 37°C for 48 h until biofilm growth. The biofilm was then transferred to brain heart infusion agar (BHIA) and maintained at 5°C. The bacterial inoculum was prepared using 30 g/L defatted soybean meal infusion and 1% agar in a 250 mL Erlenmeyer slant flask at 37°C for 48 hours, i.e. until the formation of a biofilm.

#### 4.2.2 SOLID STATE FERMENTATION IN PACKED BED BIOREACTOR

The bacterial biofilm was then suspended with 50 mL of sterile distilled water. For inoculation, 10% (v/w) of formed suspension was used to inoculate a mixture of substrates: defatted soybean meal, wheat meal and rice husk (88 grams in dry basis) in a polypropylene bag that was then packed into a jacketed column bioreactor (50 mm internal diameter and 300 mm high). The average diameter of particles was 0.55 mm. Before autoclaving at 120°C for 20 min, the moisture was adjusted to 70% dry basis (w/w) with distilled water, the composition of nutrient solution was (g/L): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.0; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.6; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; and a modified trace elements solution described by Akpa et al. (2001) that contained (g/L): CuSO<sub>4</sub> 0.001; FeCl<sub>3</sub> 0.005; NaMnO<sub>4</sub> 0.004, KI 0.002; ZnSO<sub>4</sub> 0.014; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.01; MnSO<sub>4</sub> 0.0036.The pressure drop in the medium was measured through a U-tube manometer with a water level resolution of 2 mm of water. The fermentation was carried out for 96 h at 30°C with continuous injection of humidified air.
The oxygen concentration was measured at the gas exit (off-gas) from the column using a conventional oximeter (Digimed, Mod. DM4, Sao Paulo, Brazil). On the basis of a preliminary investigation two factors were employed in a central composite rotatable design (CCRD) to determine synergy of variables, totaling 11 experimental runs, defining air flow rate and rice husk (bulking agent) as independent variables. Table 4.1 presents the level values investigated in the experimental design. The results were analyzed using Aexd.net, Alleviating Science.

**Table 4.1:** Range of the values for the independent variables investigated in the central composite rotatable design (CCRD).

Variables	Levels					
	-1.41	-1	0	1	1.41	
X <sub>1</sub> Air Flow rate (L/min)	0.4	0.46	0.6	0.74	0.8	
$X_2$ Rice husk % (w/w)	20	22.9	30	37.1	40	

#### 4.2.3 EXTRACTION AND PURIFICATION OF ITURIN A

Twenty grams of the fermented material were added to 200 mL of ethanol and the mixture was stirred in a rotary shaker (Marconi, Mod. MA 830, Piracicaba, Brazil) at 30°C, 150 rpm for 1 hour. The extract was centrifuged and filtered through a paper filter and dried in a rotary evaporator at low pressure. The solid residue was dissolved in 20 mL of methanol (methanolic extract) and purified using the next methodology. Briefly, 500  $\mu$ L was passed through the glass chromatography column (300 x 10 mm) packed with silica gel 60. The iturin A was purified by solvent system by 20 mL of a chloroform-methanol-water mixture (fraction P<sub>1</sub>) with volume ratios 65:25:4, followed by 20 mL of chloroform-methanol-water (fraction P<sub>2</sub>) with volume ratios 30:50:10, and finally 10 mL of chloroform-methanol-water (fraction P<sub>3</sub>) with volume ratios 20:60:15. After addition of each solvent mixture, a volume of 20 mL was collected, followed by evaporating the

solvent mixture under nitrogen flow and dissolving the obtained residue in 1 mL of methanol before analysis by HPLC-DAD. The chromatographic analysis was carried out using a ODS Hypersil<sup>®</sup> THERMO RP-18 column (150 ×4.6 mm, 3  $\mu$ m, Thermo Scientific, USA) and a mobile phase containing methanol-water (70:30, v/v), a modification of the mobile phase described by Gun Phae; Shoda; Kubola, (1990), under isocratic elution. The flow rate was 1.0 mL min<sup>-1</sup> and detection was performed at 270 nm.

# **4.2.4 REAGENTS**

Iturin A (purity  $\geq 90\%$ ) was purchased from SIGMA ALDRICH (St. Louis, MO, USA). Analytical grade methanol and chloroform were purchased from LABSYNTH (São Paulo, Brazil) and HPLC-grade methanol from J.T. BAKER (New York, USA). Throughout the study, water was obtained from a Milli-Q system from MILLIPORE (Bedford, MA). Before HPLC analyses, all the solutions were filtered through 0.22 µm membrane filters from MILLIPORE (Bedford, MA).

Column chromatography was performed in glass columns provided by UNIVIDROS (Riberão Preto, Brazil) packed with 4 g of activated silica gel 60 (230-400 mesh) from VETEC (São Paulo, Brazil) and 1 g of alumina MERCK (Darmstadt, Germany). Thin layer chromatography was carried out on Silica gel  $F_{254}$  plates MERCK (Darmstadt, Germany).

#### 4.2.5 ANALYSIS

High performance liquid chromatography measurements were carried out using a binary gradient chromatographic system from Waters (USA), model 1525 coupled to a Waters photodiode array detector (PDA) model 2996 and a Rheodyne injector, model 7725 (sample loop of 20  $\mu$ L), being the data acquisitions performed by the Millenium<sup>32</sup> 4.0 software. MALDI(+)-QTOF-MS measurements were carried out on a Waters Synapt HDMS instrument (Manchester, UK), using reflectron W-mode operated with a 200-Hz

solid state (Nd:YAG) laser. Spectra were acquired between m/z 700 and 1500, at a rate of 1 Hz. Typical operating conditions were applied with laser energy at 250 a.u., sample plate 20 V, *Trap* collision energy 6 eV, *Transfer* collision energy 4 eV and detector 1700 V. Calibration was performed prior to all analyses using polyethylene glycol (PEG) 600/1000/2000 sodium adducts between m/z 700 and 3000.

NMR analyses were carried out in a Varian INOVA-500 ( $B_0 = 11.7$  T) spectrometer equipped with a nanoprobe, operating at hydrogen frequency of 499.89 MHz at 298 K.

# **4.3 RESULTS AND DISCUSSION**

The temperature was set to 30°C in accordance with findings in our previous work (unpublished). The value ranges of the variables used in the experimental design are listed in Table 4.2. There was little variability of iturin A production in all experiments with exception of experiment 1 (6.8 g/kg-dry substrate) (Figure 4.1). The result of the statistical analysis is illustrated by a Pareto diagram (Figure 4.2) that shows, by comparison of t-values, that none of the variables or factors were statistically significant, which was also due to the slight data variability, indicating that, within the chosen value ranges, the factors did not significantly affect the response.

	Air flow rate	Rice husk	Iturin A concentration
Run	(L/min)	(% w/w)	(g/kgDS)
1	-1 (0.46)	-1 (22.9)	6.88
2	1 (0.74)	-1 (22.9)	4.20
3	-1 (0.46)	1 (37.1)	4.90
4	1 (0.74)	1 (37.1)	3.90
5	-1.41 (0.4)	0 (30)	3.75
6	1.41 (0.8)	0 (30)	3.62
7	0 (0.6)	-1.41 (20)	3.55
8	0 (0.6)	1.41 (40)	3.97
9	0 (0.6)	0 (30)	3.44
10	0 (0.6)	0 (30)	4.68
11	0 (0.6)	0 (30)	3.13

**Table 4.2:** Matrix of the central composite rotatable design (CCRD) (coded and real values) with responses in terms of iturin A production (after 96 h of fermentation).

kgDS= kilograms of dry substrate

Because the experimental results of the tested conditions showed comparable and uncorrelated iturin A concentrations, no response surface could be generated. More experiments were done under experiment 1 conditions in order to confirm the exceptional iturin A production, being the average concentration  $6.624 \pm 0.241$  g/kg-dry substrate.



**Figure 4.1:** Iturin A production per experiment according to the central composite rotatable design (CCRD) after 96 h of fermentation.



Figure 4.2: Pareto chart showing the standardized effect of the linear and quadratic terms. (X<sub>1</sub>: air flow rate, X<sub>2</sub>: rice husk) on the iturin A production in comparison to a 5% level of significance.

Although nowell-adjusted model could be elaborated from the the experimental data to mathematically explain the mechanism of the iturin A production, using the DOE technique did lead to a positive conclusion on the technical feasibility of the proposed process by sucessfull identification of operating conditions that resulted in high productivity by studying different conditions of operating parameters with a statistically controlled variation. These conditions were found for the combination of levels -1 (0.46 L/min) of air flow rate and -1 (22.9 % w/w) of rice husk. At the lower level conditions, less oxygen is available to the ferment due to both the lower air flow rate and the reduced porosity of the packed bed as a result of the lower ratio of rice husk compared to soybean meal and wheat bran. According to Phae and Shoda (1991), a lower aeration rate favors a higher production of iturin A and Khan et al. (2012) also found that a small but steady supply of oxygen improves the production of iturin, since *Bacillus* is a facultative aerobic microorganism. On the other hand, the bulking agent was important operationally to reduce the pressure drop and allow air flow distribution across the packed bed.

Several of these fermentation experiments in our packed bed bioreactor had better results than fermentations reported in literature using other fermentation techniques. Yao et al. (2012) produced iturin A in an L-scale bioreactor using wild *Bacillus subtilis* 3-10 in an optimized substrate of rapeseed meal, achieving a concentration of 5.3 g/kg-dry substrate. Khan et al. (2012) used okara as substrate and streptomycin resistant *Bacillus subtilis* RB 14-CS producing 2.7 g/kg-wet substrate in a glass column reactor without aeration. Mizumoto; Hirai; Shoda, (1993) reported iturin A production in SSF by *Bacillus subtilis* RB14-CS using okara as main substrate (5.6 g/kg-wet initial okara) in flasks under optimized condition and Ano et al. (2009) produced 3.5 g of iturin A/kg-wet substrate in a solid state fermentation reactor (SSFR) without agitation and at an air flow rate of 10-20 L/min under optimized conditions of substrate.

Slivinski et al. (2012) mixed okara and sugarcane bagasse in a proportion of 50:50 (w/w) for the surfactin production in packed bed bioreactors. While okara tends to form a compact mass that hinders air flow, the sugarcane bagasse avoided substrate compactation, thus promoting a uniform air flow and avoiding high pressure drops and high temperature profiles.

In this study, the pressure drop reached levels around 131 Pa/m to 3166 Pa/m and  $O_2$  uptake rates around 13 mg  $O_2$  /kg-initial dry weight substrate to 769 mg  $O_2$ /-initial dry weight substrate, due to initial porosity around 0.54 to 0.71 obtained by the mixture of substrate and rice husk and a substrate moisture level of 70% dry basis.

We also found that the moisture level remained stable at about  $70 \pm 2\%$  dry basis during all experiments, because the air flow had a relatively high humidity at near saturation and due to the hydrophobic properties of the rice husk (Martins, et al., 2006). This result contrasts with the work of Veenanadig; Gowthaman; Karanth, (2000) who obtained a maximum surfactant production with a surface tension reduction (33%) only at a higher airflow rate of 20 L/min. These authors also found that surfactant and emulsifier production were more efficient in packed column bioreactor, whilst being strongly dependent on the air flow rate.

In fact, the iturin A production found in this study was higher than any other published production even for optimized media. Above all, these results revealed that production of iturin A using the inexpensive substrate soybean meal/wheat bran/rice husk and aerated packed bed bioreactor are a promissing alternative to produce this high value lipopeptide.

# **4.4 CONCLUSIONS**

A production of 6.88 g/kg-dry substrate of iturin A was achieved with an unmodified *Bacillus Iso* 1 strain in a packed bed bioreactor under non-optimal process conditions, using rice husk, soybean and wheat meal as substrate. This result, superior to values found in comparative studies, shows the high potential of packed bed fermentation of iturin A compared to conventional fermentation methods for this product. The high iturin A concentration was achieved at an air flow rate of 0.46 L/min and a rice husk concentration of 22.9% (w/w) substrate. Design Of Experiments (DOE) was a useful tool for identifying this operating condition that resulted in production levels that were higher than reported by other authors and thus proving the expected industrial relevance even without consideration of the substrate cost price. Adding the economic and environmental

benefits of the use of the here proposed wheat bran/rice husk mixture, a strong case has been made for the use of these agro-industrial residues as an alternative to produce high value molecules.

# Acknowledgements

We acknowledge the financial support from the Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brazil.

# **4.5. REFERENCES**

- AKPA, E.; JACQUES, P.; WATHELET, B.; PAQUOT, M.; FUCHS, R.; BUDZIKIEWICZ, H.; THONART, P. Influence of culture conditions on lipopeptide production by Bacillus subtilis. Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology, v. 91-93, p. 551-561, 2001..
- ANO, T.; JIN, G. Y.; MIZUMOTO, S.; RAHMAN, M. S.; OKUNO, K.; SHODA, M. Solid state fermentation of lipopeptide antibiotic iturin A by using a novel solid state fermentation reactor system. Journal of Environmental Sciences. v. 21, p. S162-S165, 2009.
- BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbialsurfactants. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 53, p. 495-508, 2000.
- BARRIOS-GONZÁLEZ, J.; FERNÁNDEZ, F. J; TOMASINI, A. Microbial Secondary Metabolites Production and Strain Improvement. Indian Journal of Biotechnology, v. 2, p. 322-333, 2003.
- BARRIOS-GONZÁLEZ J. Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 175-185, 2012.
- BESSON, F.; PEYPOUX, F.; MICHEL, G.; DELCAMBE, L. Identification of antibiotics of iturin group in various strains of *Bacillus subtilis*. Journal of Antibiotics, v. 31, p. 284-288, 1978.

- BLAND, J. M. The first synthesis of a member of the iturin family, the antifungal cyclic lipopeptide, iturin-A2. Journal of Organic Chemistry, v. 61, p. 5663-5664, 1996..
- BONMATIN, J. M.; LAPRÉVOTE, O.; PEYPOUX, F. Diversity among microbial cyclic lipopeptides: Iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening, v. 6, p. 541-556, 2003.
- CHO, S. J.; LEE, S. K.; CHA, B. J.; KIM, Y. H.; SHIN, K. S. Detection and characterization of the *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound iturin A from *Bacillus subtilis* strain KS03. FEMS Microbiology Letters, v. 223, p. 47-51, 2003.
- DELCAMBE, L.; PEYPOUX, F.; BESSON, F. Structure of iturin and iturin like substances. **Biochemical Society Transactions**, v. 5, p. 1122-1124, 1977.
- ESHITA, S. M.; ROBERTO, N. H.; BEALE, J. M.; MAMIYA, B. M.; WORKMAN, R. F. Bacillomycin L(c), a new antibiotic of the iturin group: Isolations, structures, and antifungal activities of the congeners. **Journal of Antibiotics**, v. 48, p. 1240-1247, 1995.
- ISOGAI, A.; TAKAYAMA, S.; MURAKOSHI, S.; SUZUKI, A. Structures of β-amino acids in antibiotics iturin A. **Tetrahedron Letters**, v. 23, p. 3065-3068, 1982.
- IWASE, N.; RAHMAN, M. S.; ANO, T. Production of iturin A homologues under different culture conditions. Journal of Environmental Sciences, v. 21, p. S28-S32, 2009.
- KHAN, A. W.; RAHMAN, M. S.; ANO, T. Application of malt residue in submerged fermentation of *Bacillus subtilis*. Journal of Environmental Sciences, v. 21, p. S33-S35, 2009.
- KHAN, A.; ZOHORA, U.; , RAHMAN, M.; OKANAMI, M.; AND ANO, T. Production of iturin A through glass column reactor (GCR) from soybean curd residue (okara) by *Bacillus subtilis* RB14-CS under solid state fermentation (SSF). Advances in Bioscience and Biotechnology 2012:143-148.

- LU, M. Y.; MADDOX, I. S.; BROOKS, J. D. Application of a multi-layer packed-bed reactor to citric acid production in solid-state fermentation using *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 33, p. 117-123, 1998.
- MAGET-DANA, R.; HARNOIS, I.; PTAK, M. Interactions of the lipopeptide antifungal iturin A with lipids in mixed monolayers. **Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes**, v. 981, p. 309-314, 1989.
- MAGET-DANA, R. and PEYPOUX, F. Iturins, a special class of pore forming lipopeptides: Biological and physicochemical properties. **Toxicology**, v. 87, p. 151-174, 1994.
- MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Solid state biosurfactant production in a fixed-bed column bioreactor. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 61, p. 721-726, 2006.
- MIZUMOTO, S.; HIRAI, M.; SHODA, M. Production of lipopeptide antibiotic iturin A using soybean curd residue cultivated with *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 72, p. 869-875, 2006.
- MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SIVAPATHASEKARAN, C.; SEN, R. Antimicrobial biosurfactants from marine *Bacillus circulans*: Extracellular synthesis and purification. Letters in Applied Microbiology, v. 48, p. 281-288, 2009.
- OHNO A, ANO T, SHODA M. Production of the antifungal peptide antibiotic, iturin by *Bacillus subtilis* NB22 in solid state fermentation. Journal of Fermentation and Bioengineering 1993;75:23-27.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. Process Biochemistry, v. 35, p. 1153-1169, 2000.
- PANDEY, A. Solid state fermentation: Preface. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 79, 2003.
- PEYPOUX, F. Structure of iturine A, a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*.Biochemistry, v. 17, p. 3992-3996, 1978.
- PEYPOUX, F.; BESSON, F.; MICHEL, G. Characterization of a new antibiotic of iturin group: bacillomycin D. Journal of Antibiotics, v. 33, p. 1146-1149, 1980.

- PHAE, C. G.; SHODA, M.; KUBOTA, H. Suppressive effect of *Bacillus subtilis* and it's products on phytopathogenic microorganisms. Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 69, p. 1-7, 1990.
- PHAE, C. G. and SHODA, M. Investigation of optimal conditions for foam separation of iturin, an antifungal peptide produced by *Bacillus subtilis*. Journal of Fermentation and Bioengineering, v. 71, p. 118-121, 1991.
- RAHMAN, M. S.; ANO, T., SHODA, M. Second stage production of iturin A by induced germination of *Bacillus subtilis* RB14. Journal of Biotechnology, v. 125, p. 513-515, 2006.
- ROBINSON T, SINGH D, NIGAM P. Solid-state fermentation: A promising microbial technology for secondary metabolite production. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 55, p. 284-289, 2001.
- SHIH, I. L.; KUO, C. Y.; HSIEH, F. C.; KAO S. S.; HSIEH, C. Use of surface response methodology to optimize culture conditions for iturin A production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation. Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers, v. 39, p. 635-643, 2008.
- SLIVINSKI, C. T.; MALLMANN, E.; DE ARAÚJO, J. M.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Production of surfactin by *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 in solid-state fermentation using a medium based on okara with sugarcane bagasse as a bulking agent. **Process Biochemistry**, v. 4, p. 1848-1855, 2012.
- VEENANADIG, N. K.; GOWTHAMAN, M. K.; KARANTH, N. G. K. Scale up studies for the production of biosurfactant in packed column bioreactor. **Bioprocess** Engineering, v. 22, p. 95-99, 2000.
- WINKELMANN, G.; ALLGAIER, H.; LUPP, R.; JUNG, G. Iturin A(1) A new long chain iturin A possessing an unusual high content of C16-β-amino acids. Journal of Antibiotics, v. 36, p. 1451-1457, 1983.
- YAO, D.; JI, Z.; WANG, C.; QI, G.; ZHANG, L.; MA, X.; CHEN, S. Co-producing iturin A and poly-γ-glutamic acid from rapeseed meal under solid state fermentation by the newly isolated *Bacillus subtilis* strain 3-10. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 28, p. 985-991, 2012.

# **CAPÍTULO 5**

The influence of process parameters in production of lipopeptide iturin a using aerated packed bed bioreactors in solid state fermentation

Artigo submetido para publicação em: Biotechnology and Bioprocess Engineering

# The influence of process parameters in production of lipopeptide iturin a using aerated packed bed bioreactors in solid state fermentation

Piedrahíta-Aguirre, C. A.<sup>1</sup>; Bastos, R. G.<sup>2</sup>; Carvalho, A. L.<sup>3</sup>; Monte Alegre, R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Food Engineering, College of Food Engineering, State University of Campinas, P.O. Box 6121, 13083-862, Campinas, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup> Center of Agricultural Sciences - CCA, Federal University of São Carlos - UFSCar, P.O. Box 153, 13600-970, Araras, SP, Brazil

<sup>3</sup> Unit Operation Laboratory, Technology Department, State University of Feira de Santana, 44036-900, Feira de Santana, Bahia, Brazil

Abstract: The strain *Bacillus Iso* 1 co-produces the lipopeptide iturin A and biopolymer  $\gamma$ polyglutamic acid ( $\gamma$ -PGA) in solid state fermentation on a substrate consisting of soybean meal and wheat bran with rice husks as an inert support. The pressure drop, temperature profiles, oxygen consumption and substrate permeability are the major important concerns in solid-state fermentation processes in packed bed bioreactors. The effects of pressure drop, oxygen consumption, permeability and temperature profile has not been studied in aerated packed bed bioreactors in iturin A production before. Using the Reynolds number applied to porous media  $(Re_k)$  it was determined that the air flow was laminar, thus permeability was calculated using Darcy's law, which ranges from  $3.12 \times 10^{-6}$  to  $2.03 \times 10^{-6}$  $cm^2$  at 0.4 L/min and 4.67x10<sup>-6</sup> to 3.80x10<sup>-6</sup> cm<sup>2</sup> at 0.8 L/min. The maximum temperature gradient attained varied from 2.4 °C to 2.7 °C. The maximum pressure drop was 561 Pa/m at 0.8 L/min in the first 24 hours. The highest concentration of iturin A was obtained with air flow of 0.4 L/min within 96 hours of fermentation, reaching a concentration of 5.58 g/kg-dry substrate, and 3.58 g/kg-dry substrate of  $\gamma$ -PGA. The oxygen uptakes rates (OUR) were 23.34 mg O<sub>2</sub>/kg-dry substrate per min at 0.8 L/min of air flow and 22.56 mg O<sub>2</sub>/kgdry solid substrate per min at 0.4 L/min, which generated a metabolic heat rate of 6 W/kgdry solid medium, for both conditions. This is the highest concentration of iturin A produced to date in aerated packed bed bioreactor in solid state fermentation. The results

97

presented in this work are important for further process optimization and scale-up of iturin A production in aerated packed bed bioreactors, but it is necessary to take special attention to pressure drop.

*Keywords*: pressure drop, packed bed bioreactor, iturin A, solid state fermentation, Reynolds number.

# **5.1 INTRODUCTION**

In recent years solid state fermentation has emerged as an interesting alternative technology for the production of high-value molecules such as biosurfactants, biopesticides, antifungal agents, enzymes (Singhania et al., 2009) and polymers (Bajaj and Singhal, 2011; Oliveira et al., 2007). The heptapeptide iturin A is an effective antifungal agent (Besson et al., 1978; Cho et al., 2003) which is regularly produced as a mixture of eight isomers  $(A_1-A_8)$  due to variation in the chain length of the  $\beta$ -amino fatty acid ranging from C<sub>13</sub> to C<sub>18</sub> and has a *n* or iso configuration (Bland, 1996; Delcambe; Peypoux; Besson, 1977; Isogai et al., 1982; Iwase; Rahman; Ano, 2009). γ-PGA is water soluble, biodegradable, edible and non-toxic to human beings and to the environment (Bajaj and Singhal, 2011; Shih and Van, 2001). Thus, it may be useful as a fertilizer (Chen et al., 2005), bioflocculant, humectant, adsorbent and heavy metal sequestrant among other applications (Shih and Van, 2001). The efficiency of iturin A against various pathogenic fungi has attracted attention in, for example, the disciplines of biocontrol and plant pathology, since it is an alternative to chemical pesticides. It features some advantages compared to chemical products including low toxicity and allergenicity to humans and animals as well as minimal impacts on the environment (Yañez-Mendizábal et al., 2012). Despite these functional properties, studies on new alternatives for iturin A production by fermentation processes are rare and this antifungal agent has not received much attention from industry due to its high production costs (Lin et al., 2007).

Due to the high potential of solid state fermentation as demonstrated in our previous work, it is interesting to develop an alternative, solid state bioprocess for the production of this lipopeptide, which would be more economically viable if costs can be reduced by using agricultural residues as the solid medium. In recent years some agroindustrial residues have been used in the production of iturin A and  $\gamma$ -PGA, such as okara (Maget-Dana and Peypoux, 1994), wheat bran (Ano et al., 2009), canola meal (Ohno; Ano; Shoda, 1992), sweet potatoes and tofu residue (Yao et al., 2012). According to reports in literature, strains of *Bacillus subtilis* are able to co-produce lipopeptides and  $\gamma$ -polyglutamic acid ( $\gamma$ -PGA) by solid state fermentation (Ohno; Ano; Shoda, 1992 ; Yao et al., 2012). Wang et al. (2012)

found that porosity of the solid bed is a critical factor due to the high hygroscopicity and viscosity of  $\gamma$ -PGA. Ohno; Ano; Shoda, 1993, produced iturin in glass flasks and suggested that for the scale-up of solid state fermentation, temperature, moisture content of the solid medium and air flow must be optimized and controlled. Some preliminary works on the production of bacterial biosurfactants in packed bed fermenters have mentioned the effects of high air flow rates, pre-hydrolysis of the substrate and the addition of sugarcane bagasse as inert support in the bed (Ohno; Ano; Shoda, 1993; Veenanadig; Gowthaman; Karanth, 2000; Slivinski et al., 2012).

Forced aeration is commonly applied in solid state fermentation and is very important to provide oxygen, moisture and to remove metabolic heat and gases such as  $CO_2$  and  $NH_3$ . However, high air flows along with the ability of *Bacillus* strains to form biofilms (Stanley et al., 2003; Morikawa et al., 2006; Ortega-Morales et al., 2009) and produce biopolymers (Ohno; Ano; Shoda, 1992; Yao et al., 2012) may alter the porosity and permeability of the solid medium, generating high pressure gradients which would make the process unfeasible.

The aim of this work was to study the behavior of iturin A production in aerated packedbed bioreactor, through the pressure drop evaluation, the oxygen consumption, permeability profile and finally by the temperature profile.

# **Theoretical foundation**

Permeability is the ability of the fluid to flow through the porous matrix and can be used as a measure of resistance to air flow (Richard et al., 2004). If the flow is laminar, permeability can be calculated using Darcy's law (Ahn; Richard; Glanville, 2008), as shown in equation 5.1:

$$\nu = -\frac{\kappa}{\mu} \left(\frac{\Delta P}{L}\right) \tag{5.1}$$

Where *v* is the superficial velocity,  $\mu$  is the air viscosity, *K* is the permeability of the packed bed,  $\Delta P$  is the pressure drop across the bed height *L*.

Behavior of the fluid in the porous medium can be described by the Reynolds number influenced by the permeability of the substrate (Richard et al., 2004; Lyncht and Cherry, 1996; Nield and Bejan, 2006) as shown in equation 5.2. In this equation, the average air density ( $\rho$ ) and the average viscosity ( $\mu$ ) were calculated using the inlet and the outlet temperatures of the bioreactor.

$$N_{Re_{K}} = \frac{\rho v K^{0.5}}{\mu} < 1 \tag{5.2}$$

Microbial growth in solid state cultivation affects the permeability of the packed bed due to biodegradation of the natural media and changes in moisture content of the solid support, in addition to production of biofilm and metabolites that affect the porosity of the packed bed (Richard et al., 2004). According to Richard et al. (2004), resistance to air flow across the packed bed can be expressed by the pressure drop in determined conditions or described as permeability using the appropriate equations such as those of Darcy or Ergun. When working with  $N_{Re} < 1$  (laminar flow), the largest effects on pressure drop are the viscous forces represented by the Darcy equation (Auria et al., 1993).

# **5.2 METHODOLOGY**

#### 5.2.1 MICROORGANISM

The iturin producing strain *Bacillus Iso* 1 used in this study was isolated from soy roots collected from a soybeans culture in Campinas-Brazil. Once isolated, the culture was maintained on brain heart infusion agar (BHIA) at 5°C. The bacterial inoculum was prepared using 30 g/L soybean meal and agar 1% in 250 mL flask at 37°C until biofilm formation was completed in 48h.

# 5.2.2 SOLID STATE FERMENTATION MEDIUM

The solid state fermentation medium used in production of iturin A and  $\gamma$ -polyglutamic acid ( $\gamma$ -PGA) was composed of 100 g of a mixture of defatted soybean meal/wheat bran/rice husk (64/13/23 w/w/w). This mixture was enriched with a mineral salts solution containing 2 g L<sup>-1</sup> of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.6 g L<sup>-1</sup> of MgSO<sub>4</sub> .7H<sub>2</sub>O; 1.4 g L<sup>-1</sup> of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 3% (v/v) of a modified solution from Akpa et al. (2001) which contains: 0.001 g L<sup>-1</sup> of CuSO<sub>4</sub>; 0.005 g L<sup>-1</sup> of FeCl<sub>3</sub>; 0.004 g L<sup>-1</sup> of NaMnO<sub>4</sub>; 0.002 g L<sup>-1</sup> of KI; 0.0140 g L<sup>-1</sup> of ZnSO<sub>4</sub>; 0.01 g L<sup>-1</sup> of H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> and 0.0036 g L<sup>-1</sup> of MnSO<sub>4</sub>.

#### 5.2.3 SOLID STATE FERMENTATIONS

The experiments were conducted in jacketed column bioreactors (50 mm inner diameter and 300 mm in height) containing 100 g of the solid medium with an average particle diameter of 0.55 mm. The solid medium was supplemented with the mineral salts solution and water until obtaining a moisture content of 70% (w/w, wet basis) and autoclaved at 120°C for 20 min.

The experimental apparatus used is shown in Figure 5.1. Pressure drop across the packed bed was measured at the air inlet of the column using a U-tube manometer (DWYER, Mod. 1221-D, Michigan City, IN) which detects pressure variations of 2 mm of water. Fermentation was carried out for 96h at 30°C with continuous injection of saturated air. The volumetric flow rates used were 0.4 L/min and 0.8 L/min (volumetric air flow rates were selected in a previous work, unpublished data). Oxygen concentration was measured at the gas outlet (exhaust gas) from the column using a conventional oximeter (DIGIMED, Mod. DM4, São Paulo, Brazil). Moisture content was determined by oven drying (FANEM<sup>®</sup>, Mod. 315-SE, Brazil) at 105 °C.



Figure 5.1: Schematic of fermentation in packed bed bioreactors.

The fermentation temperature was measured at several levels of bed height: 0, 5 and 10 cm. Temperatures were also measured on the bioreactor wall and in the head space of the bioreactor. These temperatures were continuously monitored and stored by data logger (LYNX TECNOLOGIA ELETRÔNICA, modelo MCS 1000-V2, Brazil).

# 5.2.4 DETERMINATION OF $\gamma$ -POLYGLUTAMIC ACID ( $\gamma$ -PGA)

After fermentation,  $\gamma$ -polyglutamic acid was extracted according to the method reported by Chen et al. (2005), where 10 g of the fermented material was mixed with 100 mL of distilled water and agitated in a shaker (Marconi, Mod. MA 830, Piracicaba, Brazil) at 20°C and 150 rpm for 1 hour. The supernatant was filtered through filter paper. 10 mL of the filtrate were centrifuged for 20 minutes and the resulting supernatant was mixed with 40 mL of cold ethanol to precipitate the  $\gamma$ -PGA. The precipitate was collected after

centrifugation and then resuspended in distilled water for a second centrifugation in order to remove contaminants.

Quantification was performed according to the method of Silva (2001), which was adapted from Kanno and Takamatsu (1995). According to this method, a solution of trichloroacetic acid (TCA) is added to the culture medium to reduce the pH to 3 for precipitating proteins and bacterial cells while centrifuging at low temperature for 30 min. The supernatant is collected and the pH adjusted to 7, followed by the addition of five volumes of absolute ethanol. The resulting precipitate is collected by centrifugation for 30 min. The ethanol addition and centrifugation steps are performed twice. After the second centrifugation, the precipitate is solubilized in a pH 7 buffer solution and subjected to the complexation reaction with cetyltrimethylammonium bromide (CTAB).

#### 5.2.5 DETERMINATION OF ITURIN A

For the extraction of iturin A, 20 grams of the fermented material were added to 200 mL of ethanol and the mixture was agitated in a shaker (Marconi, Mod. MA 830, Piracicaba, Brazil) at 30°C and 150 rpm for 1 hour. The extract was centrifuged, filtered through filter paper and vacuum dried in a rotary evaporator. The solid residue was dissolved in 20 mL of methanol and characterized by thin layer chromatography (TLC) using the conditions described by Razafindralambo et al. (1993).

In this method, the purification of the methanolic extract of iturin A was performed by chromatography in a glass column (300 x 10 mm) which was packed with 4 g of activated silica gel 60 and 1 g of alumina (Merck, Darmstadt, Germany). A 500  $\mu$ L aliquot of the methanol extract was purified in 20 mL of chloroform-methanol-water (65:25:4, v/v/v) in fraction P<sub>1</sub>, followed by 20 mL of chloroform-methanol-water (30:50:10, v/v/v) in fraction P<sub>2</sub>, and finally 10 mL of chloroform-methanol-water (20:60:15, v/v/v) in the P<sub>3</sub> fraction. Fractions of 20 mL were collected from each solvent mixture; after evaporation of each fraction, the obtained residue was dissolved in 1 mL of methanol prior to analysis by HPLC-DAD. Chromatographic separation was performed using a Hypersil ODS<sup>®</sup> THERMO RP-18 column (150 x 4.6 mm, 3  $\mu$ m, Thermo Scientific, USA) and a mobile phase of methanol-water (70:30, v/v) under isocratic elution, which was a modification of the mobile phase reported by Phae and Shoda, (1991). The flow rate was 1.0 mL/min and detection was performed at 270 nm.

# **5.3 RESULTS AND DISCUSSION**

#### 5.3.1 PRODUCTION OF ITURIN A

The strain *Bacillus Iso* 1 co-produced the lipopeptide iturin A and biopolymer  $\gamma$ -PGA as shown in Figure 5.2. The maximum concentration of iturin after 96h at an air flow rate of 0.4 L/min was 5.58 g/kg-dry solid medium, and 3.8 g/kg of dry substrate at 0.8 L/min. The largest increase in the production of iturin A was between 24 - 48h. The lower air flow rates favored the production of this lipopeptide since its synthesis is not associated with cell growth (Phae and Shoda, 1991; Khan et al., 2012).



**Figure 5.2:** Profiles of iturin A and  $\gamma$ -PGA production for the different air volumetric flow rates: (- • -) concentration of iturin A (0.4 L/min); (-••-•) concentration of iturin A (0.8 L/min); ( •  $\Delta$ ···) concentration of  $\gamma$ -PGA (0.4 L/min); ( -••-) concentration of  $\gamma$ -PGA (0.8 L/min); ( -••-) concentration of  $\gamma$ -PGA (0.8 L/min); ( -••-) concentration

Compared with other studies encountered in literature, the production of iturin A was slightly higher than the 5.3 g/kg-dry substrate of iturin obtained by Yao et al. (2012) and lower than 2.7 g/kg-moist substrate obtained by Khan et al. (2012) and 3.5 g/kg-moist substrate produced by Ano et al. (2009) both using a mutant *Bacillus*. Even being low, the production of  $\gamma$ -PGA obtained in this work influenced the pressure drop, the oxygen consumption as well as the temperature profile.

The oxygen uptake rate (OUR) showed a peak at 24 hours of 23.34 mg O<sub>2</sub>/kg-dry substrate per min in 0.8 L/min and 22.56 mg O<sub>2</sub>/kg-dry solid substrate per min in 0.4 L/min (Figure 5.3), generating a low metabolic heat rate of 5.75 W/kg-dry solid medium, i.e.473 kJ of metabolic heat produced per mole of O<sub>2</sub> (Von Stockar and Marison, 1991; Birou; Marison; Von Stockar, 1987). After 24h, the consumption of oxygen decreased to levels below 5 mg O<sub>2</sub>/kg-dry solid medium.



**Figure 5.3:** Profile of oxygen consumption during solid state fermentation submitted to different air flow rates: (- - ) 0.4 L/min and (- 0.1 ) 0.8 L/min.

The only previous work in which the consumption of oxygen was calculated for bacteria of the genus *Bacillus* for the production of a lipopeptide by solid state fermentation was that of Slivinski et al. (2012). These authors reported oxygen consumption of 640 mg  $O_2$ /kg-dry solid medium in a medium including 50% (w/w) sugarcane bagasse as an inert bulking agent, since an efficient production of surfactin requires adequate aeration (Coutte et al., 2010; Guez et al., 2008). Acording to Gun Phae and Shoda (1991), a lower aeration rate favors a higher production of iturin A. Khan et al. (2012) also found that a small but steady supply of oxygen improves the production of iturin, since *Bacillus* is a facultative aerobic microorganism. The oxygen consumption decreased after 24h due to a reduction in cell growth and the characteristics of  $\gamma$ -PGA which was accumulated, making the fermented medium more viscous, limiting the oxygen mass transfer (Bajaj and Singhal, 2011; Richard and Margaritis, 2003).

The oxygen consumption rates were approximately the same for both air flow rates during fermentation process. However, the production of iturin A was remarkably different, probably due to low oxygenation of culture medium at 0,8 L/min in the first 24 h. The low oxygenation can be explained by the occupation of the free interparticular space by the  $\gamma$ -PGA, which obstructs the normal gas flow through the packed bed at high air flow rates, reflecting in the high pressure drop profile. Ohno et al. (1993) reported that the first 24 h aeration was crucial for the productivity of iturin A, even though the maximum rate of iturin A production is achieved during 48-72h. Kahn et al. (2012) reported that in the first 18h of fermentation. However, the production of iturin A does not depend on a high bacterial population (Phae and Shoda, 1991).

# 5.3.2 PRESSURE DROP IN THE COLUMN AND PERMEABILITY OF THE BED

Profiles of the pressure drop variation in the packed bed bioreactor can be observed in Figure 5.4 and the moisture content of the solid medium is shown in Table 5.1.

	Fermentation time (h)				
	0	24	48	72	96
Volumetric flow 0.4					
L/min					
Moisture (%, w/w)	70	70	73	72	72
Bed height (m)	0.150	0.143	0.140	0.130	0.130
Volumetric flow 0.8					
L/min					
Moisture (%, w/w)	70	71	73	71	71
Bed height (m)	0.150	0.143	0.140	0.135	0.135

**Table 5.1:** Variation of bed height and moisture content of the solid medium.



**Figure 5.4:** Profile of the pressure drop variation during solid state fermentation at different air volumetric flow rates: (- -) 0.4 L/min and (- -) 0.8 L/min.

It can be observed that during the fermentation process, due to the consumption and hydrolysis of starch and protein by *Bacillus Iso* 1, the heights of the beds are gradually reduced until reaching their lowest point at 72 h (Table 5.1). For the volumetric flow rate of 0.4 L/min, the factor that most influenced the pressure drop until reaching its maximum at 72 h was the reduction in bed height, but in the subsequent 24 hours a decrease in the pressure drop was observed due to the accumulation of  $\gamma$ -PGA, which favored the formation of preferential pathways between the substrate and the walls of the bioreactor. According to Wang et al. (2012), because  $\gamma$ -PGA forms viscous and hygroscopic solutions, it reduces the porosity of solid beds, hindering air flow and mass transfer. A similar observation was made by Gumbira-sa'id et al. (1993), who found that shrinkage of the bed favored the formation of channels, permitting reduced pressure drop in the bioreactor. However for the volumetric flow rate of 0.8 L/min, the highest pressure drop was found at 24 h, indicating that the pressure drop is likely to increase with the volumetric flow rate.

Permeability is a very important factor in the solid state fermentation system, since it influences the design and operating costs of the aeration equipment (Ahn; Richard; Glanville, 2008; Keener; Hansen; Elwell, 1997). Therefore, study of the permeability of the beds formed by the matrices used in solid-state fermentation leads to more efficient processes (Richard et al., 2004). The permeability values estimated via Equation 5.1 are shown in Table 5.2, similar in magnitude to some values found in literature for composting materials (Lyncht and Cherry, 1996). The viscosity ( $\mu$ ) and density of air ( $\rho$ ) in the system were 1.85·10<sup>-5</sup> Pa·s and, 1.07 kg/m<sup>3</sup> respectively. To verify if Darcy's equation is valid for the process, the Reynolds number (Re<sub>k</sub>) was calculated using Equation 5.2 which is widely used in porous media and whose values are shown in Table 5.2 (Lyncht and Cherry, 1996; Nield and Bejan). During the entire fermentation these values were less than 1, indicating that the process is governed by a laminar regime and consequently Darcy's equation could be applied to determine the permeability.

	Fermentation time (h)						
	0	24	48	72	96		
Volumetric flow							
0.4 L/min							
$k (\mathrm{cm}^2)$	3.12 x 10 <sup>-6</sup>	2.23 x 10 <sup>-6</sup>	2.18 x 10 <sup>-6</sup>	1.36 x 10 <sup>-6</sup>	2.03 x 10 <sup>-6</sup>		
Re <sub>k</sub>	3.60 x 10 <sup>-3</sup>	3.00 x 10 <sup>-3</sup>	3.00 x 10 <sup>-3</sup>	2.40 x 10 <sup>-3</sup>	2.90 x 10 <sup>-3</sup>		
Volumetric flow							
0.8 L/min							
$k (\mathrm{cm}^2)$	4.67 x 10 <sup>-6</sup>	2.18 x 10 <sup>-6</sup>	2.90 x 10 <sup>-6</sup>	2.80 x 10 <sup>-6</sup>	3.80 x 10 <sup>-6</sup>		
Re <sub>k</sub>	8.80 x 10 <sup>-3</sup>	6.01 x 10 <sup>-3</sup>	6.93 x 10 <sup>-3</sup>	6.81 x 10 <sup>-3</sup>	7.92 x 10 <sup>-3</sup>		

**Table 5.2:** Reynolds number  $(Re_k)$  and permeability of the packed bed (k).

Due to the characteristics of the solid support used in this study it was not possible to determine the average particle diameter and the porosity of the bed during the process. A similar behavior was observed by Auria et al. (1993) in the fermentation of sugarcane bagasse and wheat bran by *Aspergillus niger* (No.10) in packed bed bioreactors, since the particles do not retain their geometry and average diameter as inert supports.

# **5.3.3 TEMPERATURE GRADIENTS**

In our previous studies, on optimum fermentation temperature of 30°C was observed for iturin A production in packed bed bioreactors (data not published) and the production was hence evaluated at this temperature. Figures 5.5 and 5.6 show the axial temperature profiles for the two experiments. Despite not having control over temperature of the inlet air stream, this did not influence the generation of temperature gradients that affect cell growth and production of iturin A. It can be observed that the maximum gradients were achieved at 5 cm and 13 h of fermentation in both experiments, which were 2.4°C and 2.7°C for 0.8 L/min and 0.4 L/min, respectively.



**Figure 5.5:** Experimental profile of temperature obtained in the production of iturin A for solid state fermentation at the flow rate of 0.8 L/min. Inlet air temperature (T1), temperature at 5 cm of the bed (T2), temperature at 10 cm of the bed (T3), temperature at the bioreactor wall (T4) and temperature in the head space of the bioreactor (T5).





The metabolic heat generated in this study was lower than reported in literature for the production of surfactin (182 W/kg) (Slivinski et al., 2012), where the authors observed that 14-17 W/kg dry solid medium can raise the temperature in the packed bed to 20°C above the temperature of the air entering the bioreactor. Temperature gradients produced in this work are lower than those obtained by Ano et al. (2009) for the production of iturin A in rotating drum bioreactors with *Bacillus subtilis* RB14-CS and using okara as substrate. This fermentation generated temperature gradients of 20°C and 5°C, while using high volumetric air flow rates of 10 L/min and 20 L/min, respectively. As was observed in the temperature profiles, the low metabolic heat generated was removed by low air flow rate.

# **5.4 CONCLUSION**

*Bacillus* Iso 1 co-produces iturin A and  $\gamma$ -PGA in solid state fermentation using packed bed bioreactors. Despite having worked with low volumetric flow rates (0.4 L / min and 0.8 L / min), pressure gradients were generated that influenced the production of the lipopeptide. The increase of the pressure gradients is caused not only by increasing volumetric air flow rate but also by the production of biopolymer  $\gamma$ -PGA, which occupies the free interparticle space, hindering or preventing the normal flow of air through the bed .

The increased pressure gradient in the first 24h affected the proper circulation of oxygen through the bed, reducing oxygen consumption (OUR) by the ferment but also reducing metabolic heat generation and consequently avoiding the generation of large temperature gradients. The permeability was calculated using Darcy's equation and increased due to formation of air channels that allow air to flow between the packed bad and the wall of the bioreactor. This phenomenon also led to decrease of the pressure gradient.

This is the first study showing the effect of pressure gradients on the production of iturin A lipopeptide in packed bed bioreactors. The results show that to produce a high concentration of iturin A, a high air flow is not necessary but precise control of the pressure gradients is imperative for successful scaling of this packed-bed bioprocess.

# **5.5 REFERENCES**

- AHN, H. K.; RICHARD, T. L.; GLANVILLE, T. D. Laboratory determination of compost physical parameters for modeling of airflow characteristics. Waste Management, v. 28, p. 660-670, 2008.
- AKPA, E.; JACQUES, P.; WATHELET, B.; PAQUOT, M.; FUCHS, R.; BUDZIKIEWICZ, H.; THONART, P. Influence of culture conditions on lipopeptide production by *Bacillus subtilis*. Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology, v. 91-93, p. 551-561, 2001.

- ANO, T.; JIN, G. Y.; MIZUMOTO, S.; RAHMAN, M. S.; OKUNO, K.; SHODA, M. Solid state fermentation of lipopeptide antibiotic iturin A by using a novel solid state fermentation reactor system. **Journal of Environmental Sciences**, v. 21, p. S162-S165, 2009.
- AURIA, R.; MORALES, M.; VILLEGAS, E.; REVAH, S. Influence of mold growth on the pressure drop in aerated solid state fermentors. Biotechnology and Bioengineering, v. 41, p. 1007-1013, 1993.
- BAJAJ, I.; SINGHAL, R. Poly (glutamic acid) An emerging biopolymer of commercial interest. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 5551-5561, 2011.
- BESSON, F.; PEYPOUX, F.; MICHEL, G.; DELCAMBE, L. Identification of antibiotics of iturin group in various strains of *Bacillus subtilis*. Journal of Antibiotics, v. 31, p. 284-288, 1978.
- BLAND, J. M. The first synthesis of a member of the iturin family, the antifungal cyclic lipopeptide, iturin-A2. Journal of Organic Chemistry, v. 61, p. 5663-5664, 1996.
- CHEN, X.; CHEN, S.; SUN, M.; YU, Z. High yield of poly-γ-glutamic acid from *Bacillus subtilis* by solid-state fermentation using swine manure as the basis of a solid substrate.
  Bioresource Technology. v. 96, p. 1872-1879, 2005.
- CHO, S. J.; LEE, S. K.; CHA, B. J.; KIM, Y. H.; SHIN, K. S. Detection and characterization of the *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound iturin A from *Bacillus subtilis* strain KS03. FEMS Microbiology Letters, v. 223, p. 47-51, 2003.
- COUTTE, F. LECOUTURIER, D.; YAHIA, S. A.; LECLÈRE, V.; BÉCHET, M.; JACQUES, P.; DHULSTER, P. Production of surfactin and fengycin by *Bacillus subtilis* in a bubbleless membrane bioreactor. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 87, p. 499-507, 2010.
- CROMWICK, A. M.; BIRRER, G. A.; GROSS, R. A. Effects of pH and aeration on γpoly(glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* in controlled batch fermentor cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 50, p. 222-227, 1996.

- DELCAMBE, L.; PEYPOUX, F.; BESSON, F. Structure of iturin and iturin like substances. **Biochemical Society Transactions**, v. 5, p. 1122-1124, 1977.
- GUEZ, J. S.; MÜLLER, C. H.; DANZE, P. M.; BÜCHS, J.; JACQUES, P. Respiration activity monitoring system (RAMOS), an efficient tool to study the influence of the oxygen transfer rate on the synthesis of lipopeptide by *Bacillus subtilis* ATCC6633. Journal of Biotechnology 2008; 134:121-126.
- GUMBIRA-SA'ID, E.; GREENFIELD, P. F.; MITCHELL, D. A.; DOELLE, H. W. Operational parameters for packed beds in solid-state cultivation. **Biotechnology Advances**, v. 11, p. 599-610, 1993.
- ISOGAI, A.; TAKAYAMA, S.; MURAKOSHI, S.; SUZUKI, A. Structures of β-amino acids in antibiotics iturin A. **Tetrahedron Letters**, v. 23, p. 3065-3068, 1982.
- IWASE, N.; RAHMAN, M. S.; ANO, T. Production of iturin A homologues under different culture conditions. Journal of Environmental Sciences, v. 21, p. S28-S32, 2009.
- KHAN, A.; ZOHORA, U.; RAHMAN, M.; OKANAMI, M.; ANO, T. Production of iturin A through glass column reactor (GCR) from soybean curd residue (okara) by *Bacillus subtilis* RB14-CS under solid state fermentation (SSF). Advances in Bioscience and Biotechnology, v. 3, p. 143-148, 2012.
- KANNO, A. and TAKAMATSU, H. Determination of polyglutamic acid in "Natto" using cetyltrimethylammonium bromide (Studies on "Natto" part V). Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, v. 41, p. 878-886, 1995.
- KEENER, H. M.; HANSEN, R. C.; ELWELL, D. L. Airflow through compost: Design and cost implications. Applied Engineering in Agriculture, v. 13, p. 377-384, 1997.
- LIN, H. Y.; RAO, Y. K.; WU, W. S.; TZENG Y. M. Ferrous ion Enhanced Lipopeptide Antibiotic Iturin A Production from *Bacillus amyloliquefaciens* B128. International Journal of Applied Science and Engineering, v. 5, p. 123-132, 2007.
- LYNCHT, N. J, AND CHERRY, R. S. Design of passively aerated compost piles: vertical air velocities between the pipes. **Biotechnology Progress**, v. 12, p. 624-629, 1996.

- MAGET-DANA, R, AND PEYPOUX, F. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: Biological and physicochemical properties. **Toxicology**, v. 87, p. 151-174, 1994.
- MORIKAWA, M.; KAGIHIRO, S.; HARUKI, M.; TAKANO, K.; BRANDA, S.; KOLTER, R.; KANAYA, S. Biofilm formation by a *Bacillus subtilis* strain that produces γ-polyglutamate. **Microbiology**, v. 152, p. 2801-2807, 2006.
- NIELD, D. A, AND BEJAN, A. Convection in porous media. 3. ed. New York: Springer-Verlag, 2006.
- OHNO, A.; ANO, T.; SHODA, M. Production of antifungal antibiotic, iturin in a solid state fermentation by *Bacillus subtilis* NB22 using wheat bran as a substrate. **Biotechnology** Letters, v. 14, p. 817-822, 1992.
- OHNO, A.; ANO, T.; SHODA, M. Production of the antifungal peptide antibiotic, iturin by *Bacillus subtilis* NB22 in solid state fermentation. Journal of Fermentation and Bioengineering, v. 75, p. 23-27, 1993.
- OLIVEIRA, F. C.; DIAS, M. L.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Characterization of poly(3-hydroxybutyrate) produced by *Cupriavidus necator* in solid-state fermentation. Bioresource Technology, v. 98, p. 633-638, 2007.
- ORTEGA-MORALES, B. O.; ORTEGA-MORALES, F. N; LARA-REYNA, J.; DE LA ROSA-GARCÍA, S. C.; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, A.; MONTERO-M, J. Antagonism of *Bacillus* spp. isolated from marine biofilms against terrestrial phytopathogenic fungi. Marine Biotechnology, v. 11, p. 375-383, 2009.
- PHAE, C-G. and SHODA, M. Investigation of optimal conditions for foam separation of iturin, an antifungal peptide produced by *Bacillus subtilis*. Journal of Fermentation and Bioengineering, v. 71, p. 118-121, 1991.
- RAZAFINDRALAMBO, H.; PAQUOT, M.; HBID, C.; JACQUES, P.; DESTAIN, J.; THONART, P. Purification of antifungal lipopeptides by reversed-phase highperformance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 639, p. 81-85, 1993.

- RICHARD, A. AND MARGARITIS, A. Rheology, oxygen transfer, and molecular weight characteristics of poly(glutamic acid) fermentation by *Bacillus subtilis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 82, p. 299-305, 2003.
- RICHARD, T. L.; VEEKEN A. H.; DE WILDE, V.; HAMELERS, H. V. Air-filled porosity and permeability relationships during solid-state fermentation. Biotechnology Progress, v. 20, p. 1372-1381, 2004.
- SHIH, I. L.; VAN, Y. T. The production of poly-(γ-glutamic acid) from microorganisms and its various applications. **Bioresource Technology**, v. 79, p. 207-225, 2001.
- SILVA, S. B. Produção e otimização do processo de obtenção de ácido γ-poliglutâmico através do cultivo de *Bacillus subtilis* BL53. 2010. 250 p. Tese (Doutor em Engenharia Quimica) – Departamento de Engenharia Quimica, Universidade Federal do Rio Grande Do Sul Brazil: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 13-18, 2009.
- SLIVINSKI, C. T.; MALLMANN, E.; DE ARAÚJO, J. M.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Production of surfactin by *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 in solid-state fermentation using a medium based on okara with sugarcane bagasse as a bulking agent. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 1848-1855, 2012.
- STANLEY, N. R.; BRITTON, R. A.; GROSSMAN, A. D.; LAZAZZERA, B. A. Identification of catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus subtilis* by use of DNA microarrays. Journal of Bacteriology, v. 185, p. 1951-1957, 2003.
- VEENANADIG, N. K.; GOWTHAMAN, M. K.; KARANTH, N. G. K. Scale up studies for the production of biosurfactant in packed column bioreactor. **Bioprocess** Engineering, v. 22, p. 95-99, 2000.
- WANG, Q.; CHEN, S,.; ZHANG, J.; SUN, M.; LIU, Z.; YU, Z. Co-producing lipopeptides and poly-γ-glutamic acid by solid-state fermentation of *Bacillus subtilis* using soybean and sweet potato residues and its biocontrol and fertilizer synergistic effects. Bioresource Technology, v. 99, p. 3318-3323, 2008.

- YÁNEZ-MENDIZÁBAL, V.; ZERIOUH, H.; VIÑAS, I.; TORRES, R.; USALL, J.; DE VICENTE, A.; PÉREZ-GARCÍA, A.; TEIXIDÓ, N. Biological control of peach brown rot (Monilinia spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides. **European Journal of Plant Pathology**, v. 132, p. 609-619, 2012.
- YAO, D.; JI, Z.; WANG, C.; QI, G.; ZHANG, L.; MA, X.; CHEN, S. Co-producing iturin A and poly-γ-glutamic acid from rapeseed meal under solid state fermentation by the newly isolated *Bacillus subtilis* strain 3-10. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 28, p. 985-991, 2012.
# **CAPÍTULO 6**

Conclusões e sugestões para trabalhos futuros

#### 6.1 CONCLUSÕES GERAIS

A metodologia de purificação por cromatografia liquida em coluna de vidro desenvolvida permitiu isolar e identificar 5 isômeros da iturina A ( $C_{11}$ - $C_{16}$ ) produzidos pelo *Bacillus Iso* 1 em meios com alto teor proteico (40%), sendo a distribuição dos isômeros similar à apresentada pelo padrão comercial. Portanto, é uma metodologia que permite purificar este lipopeptideo sem uso de reagentes e resinas de alto custo.

Os incrementos na concentração da casca de arroz e a vazão volumétrica de ar não foram estatisticamente significativas no Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), mas operacionalmente foram importantes devido que a menor quantidade de casca de arroz e menor vazão volumétrica reduz a oxigenação favorecendo a produção da iturina A por parte do *Bacillus Iso* 1 nos biorreatores de leito empacotado. Sob estas condições, a concentração máxima de iturina A obtida foi 6,88 g/kg de substrato seco valor, superior a outros trabalhos encontrados na literatura nos quais se utilizaram *Bacillus* mutantes e meios otimizados.

O ácido  $\gamma$ -poliglutâmico ( $\gamma$ -PGA) produzido conjuntamente com a iturina A em biorreatores de leito empacotado a baixas vazões volumétricas de ar pelo *Bacillus Iso* 1, reduz a porosidade do meio dificultando o adequado suprimento de oxigênio no leito, alterando a permeabilidade e incrementando a queda de pressão nos biorreatores.

Foi demostrado que a produção da iturina A pelo *Bacillus Iso* 1 não requer fornecimento de oxigênio elevado, já que o consumo máximo de oxigênio (OUR) foi de 23,34 mg O<sub>2</sub>/kg-de substrato seco·min, gerando baixo calor metabólico estimado em 5.75 W/ kg-de substrato seco, o que incrementou a temperatura do leito em apenas 2,7 °C. Por tanto, o processo exigiria compressores de menor potencia, reduzindo os custos do processo.

Fica evidente também a importância da adequada oxigenação nas primeiras 24 h de fermentação na produção de iturina A. Apesar da produção deste lipopeptideo não requerer uma elevada oxigenação.

A produção de iturina A em biorreatores de leito empacotado com aeração forçada apresentou bons resultados e apresenta-se como uma boa alternativa para produção deste lipopeptideo, mas uma de suas limitantes no processo de *scale-up*.

### 6.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

• Estudar o efeito de outros resíduos agroindustriais como substratos de baixo custo na produção de iturina A em biorreatores de leito fixo;

• Aprofundar o estudo de identificação de outros lipopeptídeos produzidos pelo *Bacillus Iso* 1 na fermentação em estado sólido.

 Estudar a otimização do meio de fermentação e avaliar os efeitos dos incrementos da temperatura, pressão neste processo e a produção do ácido γ-poliglutâmico.

• Explorar outras metodologias de purificação de baixo custo e menos poluentes.

• Estudar o efeito antibacteriano e antifúngico da iturina A produzida pelo *Bacillus Iso* 1 contra bactérias e fungos fitopatógenos.

## **APÊNDICE A**

Preparação do meio de cultura para a fermentação submersa

Foi usada a metodologia de L'Hocine et al. (2006) que foi modificada neste trabalho e é descrita a seguir:



Figura A.1: Esquema utilizado na elaboração do meio da fermentação submersa.

Fonte: L'Hocine et al. (2006).

# **APÊNDICE B**

Curva de crescimento e consumo de oxigênio do *Bacillus iso* 1 em fermentação submersa

O objetivo deste experimento foi quantificar a produção de  $CO_2$  durante a fermentação submersa e relacionar esta produção com o perfil de crescimento celular do *Bacillus Iso* 1 na fermentação submersa e semi-sólida. A metodologia a seguir está baseada no trabalho de Costa (1996) com algumas modificações.

O ar comprimido usado para alimentar o fermentador foi borbulhado em 6 litros de KOH 33%, a fim de eliminar o gás carbônico do ar e possibilitar a quantificação do gás carbônico produzido durante o crescimento. Para evitar o arraste de KOH para o rotâmetro e o filtro, o ar livre de CO<sub>2</sub> passava por outro frasco contendo 5 litros de água destilada, sendo injetado na base de fermentador. A corrente de ar na saída do fermentador foi borbulhada em frasco contendo 6 litros de solução de hidróxido de sódio 1 N, ao qual estava acoplada à sonda de medição de condutividade elétrica. Tal montagem experimental está representada na Figura B1. A aeração utilizada foi de 1vvm e a agitação de 400 rpm, sendo a temperatura mantida constante a 30°C.

A metodologia empregada para medir a concentração celular foi a da massa celular seca. Alíquotas de 10 mL foram centrifugadas e o sedimento celular foi lavado duas vezes com água destilada, para posteriormente secagem a vácuo até peso constante.



Figura B.1: Esquema utilizado na fermentação submersa (Costa, 1996).

Foram feitas 3 fermentações submersas nas quais foram coletados dados de condutividade elétrica (mS), concentração celular (g/L) e consumo de oxigênio mgO<sub>2</sub>/L. Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras B2, B3 e B4.



Figura B.2: Condutividade elétrica da solução de NaOH 1 N e curva de crescimento do *Bacillus Iso* 1 em fermentação submersa. (- \* -) concentração celular em g/L; (- -) condutividade elétrica da solução NaOH (mS).

A partir da Figura B.2, podemos observar um incremento na condutividade elétrica da solução de NaOH 1N entre 4h e 8h que foi desfavorável, já que a condutividade elétrica deve ir decrescendo com base no acumulo de  $CO_2$  na solução de NaOH 1N. Este incremento foi devido à produção de NH<sub>3</sub> no meio em fermentação, interferindo na correta medição da condutividade elétrica e quantificação de  $CO_2$  produzido durante o processo fermentativo.

Com base nos resultados anteriormente descritos, é visível a desvantagem em se utilizar a solução de NaOH 1N, uma vez que a presença de NH<sub>3</sub> nos gases de exaustão incrementa a condutividade elétrica.

As Figuras B.3 e B.4 mostram o consume de oxigênio pelo *Bacillus Iso* 1 em fermentação submersa.



Figura B.3: Curva de consumo de oxigênio e crescimento do Bacillus Iso 1 em fermentação submersa. (- -) Consumo de oxigênio mg O<sub>2</sub>/L; (- -) concentração celular em g/L.



Figura B.4: Curva de consumo de oxigênio e crescimento do Bacillus Iso 1 em fermentação submersa. (<sup>-</sup> <sup>-</sup>) Consumo de oxigênio mg O<sub>2</sub>/L; (<sup>-</sup> <sup>o</sup> <sup>-</sup>) concentração celular em g/L.

Pelos resultados apresentados acima, Figuras B.3 e B.4, não foi possível obter uma leitura confiável do consumo de oxigênio (mg  $O_2/L$ ) na fermentação submersa, devido à interferência que gerou a produção de espuma e do biopolimero ácido  $\gamma$ -poliglutâmico na medição do oxigênio. O alto teor de nitrogênio total (20 mg/L) do meio fermentativo favoreceu a formação de espuma mesmo após 36h de fermentação apesar de se usar antiespumante. O ácido  $\gamma$ -poliglutâmico produzido aumentou a viscosidade do meio fermentativo e biofilme bacteriano e incrustou no medidor (eletrodo) de oxigênio do fermentador. Como comentado anteriormente, pelas características da fermentação não foi possível relacionar o consumo de oxigênio do *Bacillus Iso* 1 com o crescimento celular na fermentação submersa, com o fim de relacionar o consumo de oxigênio ao crescimento celular na fermentação semi-sólida.

### **REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA**

- COSTA, J. A. V. Estudo da produção de amiloglicosidase por Aspergillus niger NRRL 3122 em fermentação semi-sólida de farelo de arroz. 1996. 203p. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.
- L'HOCINE, L.; BOYE, J.I.; ARCAND, Y. Composition and functional properties of soy protein isolates prepared using alternative defatting and extraction procedures. **Journal of Food Science**. v. 71, p. C137-C145, 2006.