

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 03/12/2023.

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

**“ESTRATÉGIAS *UP-STREAM* PARA A OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE
RAMNOLÍPIDIOS A PARTIR DE FONTES ALTERNATIVAS DE CARBONO:
UM ENFOQUE NA LINHAGEM”**

ANA MARÍA SALAZAR-BRYAM

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

**“ESTRATEGIAS *UP-STREAM* PARA A OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE
RAMNOLÍPIDIOS A PARTIR DE FONTES ALTERNATIVAS DE CARBONO: UM
ENFOQUE NA LINHAGEM”**

ANA MARÍA SALAZAR-BRYAM

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Orientador: Prof. Dr. Jonas Contiero

**Rio Claro – SP
2021**

S161e	Salazar-Bryam, Ana Maria Estrategias up-stream para a otimização da produção de ramnolipídios a partir de fontes alternativas de carbono: um enfoque na linhagem / Ana Maria Salazar-Bryam. -- Rio Claro, 2021 142 p. : il., tabs., fotos Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro Orientador: Jonas Contiero 1. Biossurfactantes. 2. Otimização processos. 3. Análise de fluxo de carbono. 4. Metabolismo bacteriano. 5. Biotecnologia microbiana. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

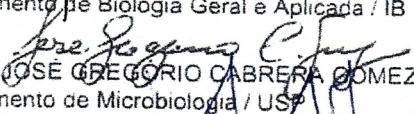
TÍTULO DA TESE: "ESTRATEGIAS UP-STREAM PARA A OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE RAMNOLÍPIDIOS A PARTIR DE FONTES ALTERNATIVAS DE CARBONO: UM ENFOQUE NA LINHAGEM"

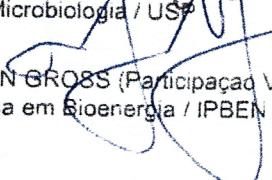
AUTORA: ANA MARIA SALAZAR BRYAM

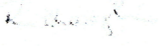
ORIENTADOR: JONAS CONTIERO

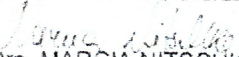
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), área: Microbiologia Aplicada pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. JONAS CONTIERO (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro


Prof. Dr. JOSÉ GREGÓRIO CABRERA GOMEZ (Participação Virtual)
Departamento de Microbiologia / USP


Prof. Dr. JEFERSON GROSS (Participação Virtual)
Instituto de Pesquisa em Bioenergia / IPBEN


Profa. Dra. ROBERTA BARROS LOVAGLIO (Participação Virtual)
Centro de Ciências da Natureza / UFSCar


Profa. Dra. MARCIA NITSCHKE (Participação Virtual)
Instituto de Química de São Carlos / USP

Rio Claro, 03 de dezembro de 2021

*Este trabalho é dedicado aos meus pais: obrigada mãe e pai pelo
apoio incondicional e exemplo de vida.
E ao meu anjo no céu: Magdalena, minha avó.*

AGRADECIMENTOS

Ao Brasil, o país que me acolheu: as pessoas, a cultura, as famílias das que agora faço parte. Por isso, preciso agradecer imensamente por ter chegado aqui, por ter conhecido quanto conheci e por ter aprendido quanto aprendi.

Quero agradecer ao meu orientador, Prof. Dr. Jonas Contiero, pela confiança depositada, desde o primeiro momento, para desenvolver este trabalho. Pelo suporte que tem me proporcionado e pelos ensinamentos brindados.

Ao meu orientador na Alemanha, Prof. Dr. Ing. Rudolf Hausman, pela confiança depositada e pelos conselhos, conversas, correções e pela ajuda brindada em cada momento. Agradeço também ao Prof. Dr. Ing. Marius Henkel e os Dr. Rer. Nat. Lars Lilge pelos ensinamentos e orientações durante o desenvolvimento do projeto de doutorado sanduíche.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Quero agradecer à agência de fomento CAPES pela concessão da bolsa de doutorado para o desenvolvimento deste projeto. Agradeço também ao programa CAPES PrInt pela concessão da bolsa para desenvolver parte do meu projeto de doutorado sanduíche na Alemanha.

Ao pessoal do Departamento de Bioquímica e Microbiologia, tanto estudantes quanto professores e funcionários, obrigada pela ajuda proporcionada em todo momento.

Ao pessoal do Departamento de Bioprocessos na Universidade de Hoheheim, pela acolhida e apoio em todos os momentos. Um agradecimento especial ao Philipp, Malehe, Chantal, Mareen, Manu e Peter, por fazerem também as jornadas de trabalho menos exaustivas.

Aos integrantes do LMI, obrigada pela acolhida, os momentos compartilhados e o aprendizado. Especialmente a Cinthia você foi e é um grande apoio em todos os momentos de *não* desespero. Espero que continuemos comemorando pequenas vitórias!

À minha família Rio Clareense, Bianca, Caro e Dani, Diego E, Talita, Blanca e os Rubenes, Gabi e Amilcar, Yadira, Paola. Especialmente ao Diego R, Aleja, Swanny, Karen e o Jorge pelo apoio incondicional em cada momento, pela cumplicidade e por me acompanhar no fim dessa jornada.

Às duas pessoas que sempre estão me ensinando, meu exemplo de vida e o meu orgulho: Meus pais. Obrigada por tudo o que me ajudam a construir todos os dias e por me apoiar em cada decisão. Obrigada por compartilhar às minhas conquistas, alegrias, preocupações dessa caminhada.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram na realização deste trabalho.

*“¡Qué gran libro se podría escribir con lo que se sabe!
- Otro mucho mayor se escribiría con lo que no se sabe”*

(VERNE, 1874)

RESUMO

Os ramnolipídeos são biosurfactantes que podem ser produzidos por microorganismos utilizando substratos alternativos, porém a sua produção ainda precisa ser otimizada pois os custos de produção são altos. O objetivo deste projeto foi abordar estratégias up-stream para melhorar a produção de ramnolipídios ao usar fontes de carbono hidrofílicas presentes em resíduos da agroindústria. Foi realizado um processo de otimização do meio de cultivo por meio de planejamento experimental, para encontrar as melhores condições a partir de um meio de cultivo existente, para produzir ramnolipídios a partir de glicerol utilizando a linhagem *P. aeruginosa* LBI 2A1, foi otimizada a produção e em escala de biorreator e foram obtidos 5,99 g/L de ramnolipídio, um rendimento $Y_p/s = 0,126$, ao utilizar uma proporção C/N de 18. A partir do meio otimizado, foi proposto um processo de evolução adaptativa visando uma melhora no consumo de glicerol para aumentar indiretamente a produção de ramnolipídio; em comparação com a cepa Parental, *P. aeruginosa* LBI 2A1-T16A, após 65 gerações, aumentou a sua capacidade de produção de ramnolipídio 1,7 vezes (10,21 g/L) utilizando 5% de glicerol (condição inicial do processo de evolução). O experimento de evolução adaptativa permitiu melhorar o consumo de glicerol, direcionando maior fluxo de carbono à síntese da porção hidrofílica (dTPD-L-ramnose), e o crescimento da linhagem estudada, aumentando de forma indireta a produção de ramnolipídios. Como última estratégia foi proposta *P. fluorescens* DSM 50090 pSynPro_8o como um possível candidato para produção heteróloga de ramnolipídios utilizando glicerol e açúcares presentes em hidrolisados de biomassa utilizada na agroindústria, respectivamente. Usando glicerol como fonte de carbono foi encontrado que o micro-organismo é um bom candidato para utilizar este substrato na produção de ramnolipídios, foram obtidos 1,65 g/L de ramnolipídio utilizando nitrato de sódio como fonte de nitrogênio e 10 g/L de glicerol. Finalmente, arabinose, glicose, manose e xilose foram avaliadas como possíveis fontes de carbono e *P. fluorescens* DSM 50090pSynPro_8o produziu 1,37 g/L utilizando glicose como fonte de carbono, e o micro-organismo foi capaz de consumir tanto hexoses quanto pentoses. Ao utilizar um meio simulando as proporções dos açúcares de cultivo energético *P. fluorescens* DSM 50090pSynPro_8o produziu 0,65 g/L de ramnolipídios. Foi possível estabelecer a aptidão da *Pseudomonas fluorescens* para expressão heteróloga de ramnolipídios utilizando fontes de carbono não convencionais que favorecem o desenvolvimento da bioeconomia.

Palavras-chave: Biosurfactantes, planejamento experimental, evolução adaptativa, análise de fluxo metabólico, produção heteróloga de ramnolipídios

ABSTRACT

Rhamnolipids are biosurfactants that can be produced by microorganisms using alternative substrates, however their production still needs to be optimized because production costs are high. The objective of this project was to address up-stream strategies to improve rhamnolipid production by using hydrophilic carbon sources present in agroindustry waste. A medium optimization process was performed using experimental planning to find the best conditions from an existing culture medium to produce rhamnolipids from glycerol using the *P. aeruginosa* strain LBI 2A1, production was optimized and at bioreactor scale and 5.99 g/L of rhamnolipid, a yield $Y_{p/s} = 0.126$, was obtained when using a C/N ratio of 18. From the optimized medium, an adaptive evolution process was proposed aiming at an improvement in glycerol consumption to indirectly increase rhamnolipid production; compared to the Parental strain, *P. aeruginosa* LBI 2A1-T16A, after 65 generations, increased its rhamnolipid production capacity 1.7-fold (10.21 g/L) using 5% glycerol (initial condition of the evolution process). The adaptive evolution experiment allowed to improve glycerol consumption, directing more carbon flux to the synthesis of the hydrophilic portion (dTPD-L-rhamnose), and the growth of the strain studied, indirectly increasing the production of rhamnolipids. As a last strategy, *P. fluorescens* DSM 50090 pSynPro_80 was proposed as a possible candidate for heterologous production of rhamnolipids using glycerol and sugars present in hydrolysates of biomass used in agroindustry, respectively. Using glycerol as a carbon source it was found that the microorganism is a good candidate for using this substrate for rhamnolipid production, 1.65 g/L of rhamnolipid was obtained using sodium nitrate as nitrogen source and 10 g/L of glycerol. Finally, arabinose, glucose, mannose and xylose were evaluated as possible carbon sources and *P. fluorescens* DSM 50090pSynPro_80 produced 1.37 g/L using glucose as a carbon source, and the microorganism was able to consume both hexoses and pentoses. When using a medium simulating the proportions of the energy culture sugars *P. fluorescens* DSM 50090pSynPro_80 produced 0.65 g/L of rhamnolipids. It was possible to establish the suitability of *Pseudomonas fluorescens* for heterologous expression of rhamnolipids using unconventional carbon sources that favor the development of the bioeconomy.

Key words: Biosurfactants, Design of experiments, Adaptive evolution, Flux metabolic analysis, heterologous production of rhamnolipids.

LISTA DE FIGURAS

2. REVISÃO DA LITERATURA

- FIGURA 2.1** ESTRUTURA GERAL DOS RAMNOLIPÍDIOS R1-4 DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*. MODIFICADO DE AMANI ET AL., 2013. 4
- FIGURA 2.2** REGULAÇÃO DA BIOSÍNTESE DE RAMNOLIPÍDIOS (SUH ET AL., 2019). 10
- FIGURA 2.3** VISÃO GERAL DAS VIAS METABÓLICAS ENVOLVIDAS NA BIOSÍNTESE DE RAMNOLIPÍDIOS TENDO COMO PRECURSORES FONTES HIDROFÍLICAS COMO GLICEROL E GLICOSE E HIDROFÓBICAS COMO ÓLEO VEGETAL (LOVAGLIO ET AL., 2015). 12

4. CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO DA PROPORÇÃO C/N, C/P E CONCENTRAÇÃO DE FERRO NA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* LBI 2^a1

- FIGURA 4.1** GRÁFICO DE SUPERFÍCIE RESPOSTA DA INTERAÇÃO ENTRE A) PROPORÇÃO C/N – CONCENTRAÇÃO DE FeCl_3 ; B) PROPORÇÃO C/N – PROPORÇÃO C/P; C) PROPORÇÃO C/P – CONCENTRAÇÃO DE FeCl_3 38
- FIGURA 4.2** CINÉTICA DO CULTIVO EM FRASCO DE *P. AERUGINOSA* LBI 2A1 UTILIZANDO A) CORRIDA 10 – C/N 16,72 C/P: 100; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0,24 (g/L) E B) VALIDAÇÃO DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL – C/N: 18, C/P: 100; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0,28 (g/L). 40
- FIGURA 4.3** CINÉTICA DO CULTIVO EM REATOR DE *P. AERUGINOSA* LBI 2A1 NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS PARA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS. (37 °C, PH 6,8 E CASCATA DE AGITAÇÃO DE 300 - 900 RPM EM FUNÇÃO DA PO_2). 42

5. CAPÍTULO 2: EVOLUÇÃO ADAPTATIVA COMO ESTRATÉGIA PARA O USO MAIS EFICIENTE DE GLICEROL NA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS

- FIGURA 5.1** CURVA DE CRESCIMENTO *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* LBI 2A1 EM MLC COM 5% DE GLICEROL, 37°C, 200 RPM, PH INICIAL 6,8. 51
- FIGURA 5.2** PROCESSO ESQUEMATIZADO DO EXPERIMENTO DE EVOLUÇÃO ADAPTATIVA DE *P. AERUGINOSA* LBI 2A1. VARIAÇÃO DA DENSIDADE CELULAR DE 0H ATÉ 48H DE CULTIVO PARA CADA TRANSFERÊNCIA. MEIO MLC À 37°C, 200 RPM, COM VARIAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL DE 5 – 12,75% ENTRE TRANSFERÊNCIAS 0 E 16, E ENTRE AS TRANSFERÊNCIAS 17 – 29 O GLICEROL FOI MANTIDO CONSTANTE EM 12.75%. 52
- FIGURA 5.3** VELOCIDADE MÁXIMA DE CRESCIMENTO DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* LBI 2A1 (H-1) EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE GERAÇÕES E TRANSFERÊNCIAS REALIZADAS. 37°C, 200 RPM, PH INICIAL 6,8. 53

FIGURA 5.4 CINÉTICA DO CRESCIMENTO DE <i>P. AERUGINOSA</i> LBI 2A1, CEPA PARENTAL E T16A A E T16B. CONCENTRAÇÃO INICIAL DE GLICEROL A) 5% G/L; B) 12,75% G/L. MEIO MLC À 37°C, 200 RPM, PH INICIAL 6,8.	54
FIGURA 5.5 A) PRODUÇÃO MÁXIMA DE RAMNOLIPÍDIOS (G/L) E B) CONSUMO MÁXIMO DE GLICEROL(%) POR <i>P. AERUGINOSA</i> LBI 2A1, CEPA PARENTAL E T16 A E B. 37°C, 200 RPM, PH INICIAL 6,8.	56
FIGURA 5.6 FERMENTAÇÕES EM BIORREATOR USANDO 5% DE GLICEROL, MEIO MLC À 37°C, CASCATA DE AGITAÇÃO EM FUNÇÃO DA PO ₂ , PH 6,8. A) PARENTAL B) T16 A.	57
FIGURA 5.7 FERMENTAÇÕES EM BIORREATOR USANDO 5% DE GLICEROL, MEIO MLC À 37°C, CASCATA DE AGITAÇÃO EM FUNÇÃO DA PO ₂ , PH 6,8. A) PARENTAL B) MUTANTE A.	59
FIGURA 5.8 VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO (μ) E PRODUTIVIDADE ESPECÍFICA DE RAMNOLIPÍDIO (Q_{RL}) A) PARENTAL E B) T16 A.	61
FIGURA 5.9 RESULTADOS DAS TAXAS DE CONSUMO DE OXIGÊNIO (OUR) E EXAUSTÃO DE DIÓXIDO DE CARBONO (CER). A) PARENTAL E B) T16 A.	61
FIGURA 5.10 DISTRIBUIÇÃO DE FLUXO EM <i>P. AERUGINOSA</i> LBI 2A1, DO PARENTAL (RETÂNGULOS EM LINHA SÓLIDA) E A T16 A (RETÂNGULOS EM LINHA PONTILHADA), USANDO GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO. RETÂNGULOS EM LINHA SÓLIDA. OS FLUXOS ESTÃO EXPRESSOS EM MMOL (G DE BIOMASSA LIVRE DE PHA) $^{-1} H^{-1}$.	62

6. CAPITULO 3: PRODUÇÃO HETEROLOGA DE RAMNOLIPÍDIOS POR PSEUDOMONAS FLUORESCENS UTILIZANDO GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO.

FIGURA 6.1 MAPA DO PLASMÍDEO pSYNPro_80 QUE CARREGA OS GENES RHLAB PARA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS.	66
FIGURA 6.2 CONFIRMAÇÃO DA TRANSFORMAÇÃO, <i>P. FLUORESCENS</i> EM ÁGAR SANGUE. A) <i>P. FLUORESCENS</i> DSM50090, LINHAGEM SELVAGEM; B) <i>P. FLUORESCENS</i> DSM50090 pSYNPro_80.	71
FIGURA 6.3 CINÉTICA DOS CULTIVOS DE <i>P. FLUORESCENS</i> UTILIZANDO A) 5; B) 10; C) 20 G/L DE GLICEROL. (30 °C, 200 RPM, PH INICIAL 6,8)	72
FIGURA 6.4 CINÉTICA DOS CULTIVOS DE <i>P. PUTIDA</i> A) 5; B) 10; C) 20 G/L DE GLICEROL. (30 °C, 200 RPM, PH INICIAL 6,8)	73
FIGURA 6.5 VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO DE A) <i>P. FLUORESCENS</i> ; B) <i>P. PUTIDA</i> UTILIZANDO GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO. (30 °C, 200 RPM, PH INICIAL 6,8)	74
FIGURA 6.6 INFLUENCIA DA PROPORÇÃO C/N NO CULTIVO DE <i>P. FLUORESCENS</i> UTILIZANDO (NH ₄) ₂ HPO ₄ COMO FONTE DE NITROGÊNIO. A) PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS; B) CRESCIMENTO CELULAR; C) CONSUMO DE GLICEROL. (30 °C, 200 RPM, PH INICIAL 6,8)	76
FIGURA 6.7 INFLUENCIA DA PROPORÇÃO C/N NO CULTIVO DE <i>P. FLUORESCENS</i> UTILIZANDO NH ₄ CL COMO FONTE DE NITROGÊNIO. A) PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS; B) CRESCIMENTO CELULAR; C) CONSUMO DE GLICEROL. (30 °C, 200 RPM, PH INICIAL 6,8)	77

FIGURA 6.8 INFLUENCIA DA PROPORÇÃO C/N NO CULTIVO DE <i>P. FLUORESCENS</i> UTILIZANDO UREIA COMO FONTE DE NITROGÊNIO. A) PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS; B) CRESCIMENTO CELULAR; C) CONSUMO DE GLICEROL. (30 °C, 200 RPM, PH INICIAL 6,8)	78
FIGURA 6.9 INFLUENCIA DA PROPORÇÃO C/N NO CULTIVO DE <i>P. FLUORESCENS</i> UTILIZANDO NaNO_3 COMO FONTE DE NITROGÊNIO. A) PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS; B) CRESCIMENTO CELULAR; C) CONSUMO DE GLICEROL. (30 °C, 200 RPM, PH INICIAL 6,8)	79
FIGURA 6.10 COMPARAÇÃO DOS RENDIMENTOS DE PRODUTO EM RELAÇÃO AO SUBSTRATO (G/G) COM AS FONTES DE NITROGÊNIO AVALIADAS NAS DIFERENTES PROPORÇÕES DE C/N UTILIZADAS. (30 °C, 200 RPM, PH INICIAL 6,8)	80
N/A: NÃO APLICA	85

7. CAPITULO 4: BIOCONVERSÃO DE AÇÚCARES PRESENTES EM HIDROLISADOS DE BIOMASSA PARA A PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS POR PSEUDOMONAS FLUORESCENS

FIGURA 7.1 CINÉTICA DO CULTIVO DE <i>P. FLUORESCENS</i> UTILIZANDO AS HEXOSES A) GLICOSE; B) MANOSE COMO FONTE DE CARBONO. (30 °C, 200 RPM, PH INICIAL 6,8)	89
FIGURA 7.2 CINÉTICA DO CULTIVO DE <i>P. FLUORESCENS</i> UTILIZANDO AS PENTOSES A) ARABINOSE; B) XILOSE COMO FONTE DE CARBONO. (30 °C, 200 RPM, PH INICIAL 6,8)	91
FIGURA 7.3 CINÉTICA DO CULTIVO DE <i>P. FLUORESCENS</i> REALIZADO UTILIZANDO OS QUATRO AÇÚCARES JUNTOS: ARABINOSE, GLICOSE, MANOSE E XILOSE (2,5 G/L, CADA UM). A) CRESCIMENTO, PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS E PRODUÇÃO DE ALGINATO; B) CONSUMO DA FONTE DE CARBONO. (30 °C, 200 RPM, PH INICIAL 6,8)	93
FIGURA 7.4 VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CONSUMO OS QUATRO AÇÚCARES JUNTOS: ARABINOSE, GLICOSE, MANOSE E XILOSE (2,5 G/L, CADA UM). (30 °C, 200 RPM, PH INICIAL 6,8)	94
FIGURA 7.5 CINÉTICA DOS CULTIVOS DE <i>P. FLUORESCENS</i> SIMULANDO A COMPOSIÇÃO DE AÇÚCARES DE HIDROLISADO DE RESÍDUO DA AGRICULTURA (BAGAÇO DE CANA) – MEIO RA (A,B); BIOMASSA DE CULTIVOS ENERGÉTICOS (MISCHANTHUS) – MEIO CE (C,D); BIOMASSA DE MADEIRA (ABETO) – MEIO CM (E,F). (30 °C, 200 RPM, PH INICIAL 6,8)	95
FIGURA 7.6 VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CONSUMO DA FONTE DE CARBONO. A) MEIO RA; B) MEIO CE; C) MEIO CM. (30 °C, 200 RPM, PH INICIAL 6,8)	97

LISTA DE TABELAS

4. CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO DA PROPORÇÃO C/N, C/P E CONCENTRAÇÃO DE FERRO NA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS POR PSEUDOMONAS AERUGINOSA LBI 2^a1

TABELA 4.1 VALORES DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES PARA O DELINEAMENTO DE COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL 1. 32

TABELA 4.2 MATRIZ DO DELINEAMENTO DO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (CCRD) 1 DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES. 33

TABELA 4.3 MATRIZ DO DELINEAMENTO DO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (CCRD) 1 DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES. COM AS RESPOSTAS EXPERIMENTAIS E PREDITAS 36

TABELA 4.4 EFEITO ESTIMADO, ERRO, VALOR DE T E GRAU DE SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA (P), PARA CADA FATOR NO MODELO CODIFICADO NA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS UTILIZANDO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL. 37

TABELA 4.4 COMPARAÇÃO DOS BIOPROCESSO PARA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS USANDO A LINHAGEM *P. AERUGINOSA* LBI 2A1 COM DIFERENTES PROPORÇÕES DE C/N. 41

5. CAPÍTULO 2: EVOLUÇÃO ADAPTATIVA COMO ESTRATÉGIA PARA O USO MAIS EFICIENTE DE GLICEROL NA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS

TABELA 5.1 RENDIMENTOS DE CONVERSÃO E VELOCIDADE MÁXIMA DE CRESCIMENTO DOS CULTIVOS EM FRASCOS DE 1L. 56

6. CAPÍTULO 3: PRODUÇÃO HETEROLOGA DE RAMNOLIPÍDIOS POR PSEUDOMONAS FLUORESCENS UTILIZANDO GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO.

TABELA 6.1. COMPARAÇÃO DAS FERMENTAÇÕES COM *P. FLUORESCENS* E *P. PUTIDA*, UTILIZANDO 5 – 10 – 20 G/L DE GLICEROL EM TERMOS DE RENDIMENTO PRODUTO/SUBSTRATO ($Y_{P/S}$). 75

7. CAPITULO 4: BIOCONVERSÃO DE AÇUCARES PRESENTES EM HIDROLISADOS DE BIOMASSA PARA A PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS POR PSEUDOMONAS FLUORESCENS

TABELA 7.1 CONCENTRAÇÃO DA FONTE DE CARBONO DOS MEIOS DE CULTIVO SIMULANDO A COMPOSIÇÃO DE BIOMASSA HIDROLISADA. BASEADO EM HOOD ET AL. (2012). 85

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 BIOSURFACTANTES	17
2.2 RAMNOLIPÍDIOS	19
2.3 DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS	20
2.4 METABOLISMO E BIOSÍNTESE DOS RAMNOLIPÍDIOS EM <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	22
2.5 PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS	29
2.6 ESTRATÉGIAS UP-STREAM PARA MELHORAMENTO DA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS	30
2.7 APLICAÇÕES DOS RAMNOLIPÍDIOS	39
3. OBJETIVOS	44
3.1 OBJETIVOS GERAIS	44
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
4. CAPÍTULO 1	45
4.1. INTRODUÇÃO	45
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	46
4.2.1 MICRO-ORGANISMO	46
4.2.2 MEIOS DE CULTURA	46
4.2.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO	47
4.2.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR)	47
4.2.5 PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS EM REATOR	48
4.2.6 MÉTODOS ANALÍTICOS	49
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.3.1 EFEITO DA PROPORÇÃO C/N, PROPORÇÃO C/P E CONCENTRAÇÃO DE FERRO NA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS	51
4.3.2 VALIDAÇÃO DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	55
4.3.2 PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIO EM BIORREATOR	56
4.4. CONCLUSÃO	58
EVOLUÇÃO ADAPTATIVA COMO ESTRATÉGIA PARA O USO MAIS EFICIENTE DE GLICEROL NA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS	59
5.1. INTRODUÇÃO	59
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	60
5.2.1 MICRO-ORGANISMO	60
5.2.2 MEIOS DE CULTURA	60
5.2.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO	61

5.2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS	62
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.3.1 PERFIL DE CRESCIMENTO DE <i>P. AERUGINOSA</i> LBI 2A1 DURANTE EXPERIMENTO DE EVOLUÇÃO ADAPTATIVA	65
5.3.2 FERMENTAÇÕES EM FRASCO PARA AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS	69
5.3.3 FERMENTAÇÕES EM REATOR	72
5.5. CONCLUSÃO	78
6. CAPITULO 3.....	79
PRODUÇÃO HETEROLOGA DE RAMNOLIPÍDIOS POR <i>PSEUDOMONAS FLUORESCENS</i> UTILIZANDO GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO.	79
6.1. INTRODUÇÃO	79
6.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	80
6.2.1 MICRO-ORGANISMOS	80
6.2.2 MEIOS DE CULTIVO.....	81
6.2.3 TRANSFORMAÇÃO DE <i>P. FLUORESCENS</i> PARA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS	82
6.2.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO	83
6.2.6 MÉTODOS ANALÍTICOS	84
6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	85
6.3.1 CONFIRMAÇÃO DA TRANSFORMAÇÃO	85
6.3.2 PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS POR <i>P. FLUORESCENS</i> E <i>P. PUTIDA</i> UTILIZANDO GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO.	87
6.3.3 INFLUENCIA DA FONTE DE NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS.	90
6.4. CONCLUSÕES	96
7. CAPITULO 4.....	97
BIOCONVERSÃO DE AÇÚCARES PRESENTES EM HIDROLISADOS DE BIOMASSA PARA A PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS POR <i>PSEUDOMONAS FLUORESCENS</i>	97
7.1. INTRODUÇÃO	97
7.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	99
7.2.1 MICRO-ORGANISMOS	99
7.2.2 MEIOS DE CULTURA.....	99
7.2.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO	100
7.2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS	101
7.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	103
7.3.2 PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS SIMULANDO A COMPOSIÇÃO DE AÇÚCARES DE TRÊS TIPOS DE BIOMASSA HIDROLISADA	109
7.4 CONCLUSÕES	113
8. CONCLUSÕES GERAIS	114

9. REFERÊNCIAS.....	115
---------------------	-----

1. INTRODUÇÃO

Existe uma grande diversidade de biossurfactantes que são classificados de acordo com a sua composição bioquímica. Dentre os mais estudados encontram-se os ramnolipídios produzidos principalmente por *Pseudomonas aeruginosa* (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2011), e pertencem ao grupo dos glicolipídios. São moléculas anfipáticas com propriedades tenso ativas que atuam como emulsionantes (HENKEL *et al.*, 2012) e devido a estas propriedades, têm diversas aplicações na agricultura, indústria farmacêutica, petrolífera, de alimentos e bebidas, de papel, de metal, de produtos de limpeza, de couro e têxtil (FIECHTER, 1992).

Além de produzirem os glicolipídios mais estudados, o metabolismo de *Pseudomonas aeruginosa* frente a produção destas moléculas e a fonte de carbono também tem sido estudado. As fontes de carbono hidrofóbicas, como óleos vegetais e n-alcanos, são as que têm apresentado melhores resultados na produção de ramnolipídios (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2011), e as fontes hidrofílicas como glicerol, glicose, manitol e etanol têm sido usadas na produção destes biossurfactantes, porém o rendimento na produção não atinge o obtido com fontes de carbono hidrofóbicas (NITSCHKE *et al.*, 2005).

Os três desafios principais na produção de ramnolipídios são aumentar a produtividade, diminuir a formação de espuma e otimizar o processamento *downstream*. Algumas estratégias para tornar os biossurfactantes comercialmente competitivos incluem o acesso a resíduos agroindustriais como matéria-prima de baixo custo, o desenvolvimento de cepas robustas do tipo selvagem ou engenheradas e a otimização da fermentação.

Este trabalho tem como objetivo principal abordar estratégias metabólicas para otimizar a produção de ramnolipídios a partir do melhoramento de uma linhagem de *P. aeruginosa* para utilizar glicerol como fonte de carbono de forma mais eficiente e avaliar o potencial de *P. fluorescens* como hospedeiro heterólogo para síntese de ramnolipídio utilizando como fonte de carbono o glicerol e açúcares presentes na biomassa lignocelulósica, como uma proposta viável para o aproveitamento de resíduos agroindustriais.

8. CONCLUSÕES GERAIS

O uso e aplicação de estratégias de otimização das condições de cultivo utilizando o delineamento experimental composto central rotacional, se mostrou efetivo para aumentar a resposta desejada. A proporção C/N foi a variável que influenciou no aumento na produção do biossurfactante. Este estudo contribui na busca de alternativas para melhorar a produção de ramnolipídios e como estratégia para diminuição de custos, visando ao aproveitamento de glicerol como fonte de carbono.

O experimento de evolução adaptativa permitiu melhorar o crescimento da linhagem *P. aeruginosa* LBI 2A1 ao utilizar glicerol como fonte de carbono. O aumento da velocidade máxima de crescimento no excesso de fonte de carbono permitiu que o micro-organismos consumisse mais rapidamente o glicerol e a fonte de nitrogênio, aumentando assim a produção de ramnolipídios.

Mesmo com matérias-primas baratas, meios e condições de cultivo otimizadas, e processos de recuperação eficientes, um processo de produção não pode ser tornado comercialmente viável e rentável até o rendimento do produto final pelos organismos produtores ser naturalmente elevado. Logo, uma abordagem metabólica em conjunto com o melhoramento do processo pode ser utilizada para tornar a produção comercial economicamente viável.

Considerando o desenvolvimento de processos de batelada alimentadas, que normalmente são necessários para bioprocessos de alta eficiência, o consumo total de todos os componentes menores a partir de substratos à base de hemicelulose bruta é altamente favorável. Mesmo que o rendimento máximo não possa ser influenciado significativamente, isto permite contornar um acúmulo destes componentes levando à inibição.

9. REFERÊNCIAS

- ABALOS, A.; PINAZO, A.; INFANTE, M. R.; CASALS, M.; GARCÍA, F.; MANRESA, A. **Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes.** *Langmuir*, Washington, v. 17, p. 1367-1371, 2001.
- ABDEL-MAWGOUD, M. A.; HAUSMANN, R.; LÉPINE, F.; MÜLLER, M. M.; DÉZIEL, E. **Rhamnolipids: Detection, Analysis, Biosynthesis, Genetic Regulation, and Bioengineering of Production.** *Biosurfactants*. Ed: Gloria Soberón-Chávez, *Microbiology Monographs*, Springer: Berlin, p. 13-44, 2011.
- ABDEL-MAWGOUD, M. A.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. **Rhamnolipids. Diversity of structures, microbial origins and roles.** *Applied Environmental Microbiology*. v. 86, p. 1323-1326, 2010.
- ABOUSEOUD, M., MAACHI, R., AMRANE, A., BOUDERGUA, S., & NABI, A. **Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*.** *Desalination*, 223(1-3), 143-151, 2008.
- AGUIRRE-RAMÍREZ, M.; MEDINA, G., GONZALEZ-VALDEZ, A.; GROSSO-BECERRA, V.; SOBERON-CHAVEZ, G. **The *Pseudomonas aeruginosa* rmlBDAC operon, encoding dTDP-L-rhamnose biosynthetic enzymes, is regulated by the quorum-sensing transcriptional regulator RhIR and the alternative sigma factor σ^S .** *Microbiology*, 158(4), 908-916, 2012.
- ALBUS, A. M.; PESCI, E.C.; RUNYEN-JANECKY, L.J.; WEST, S. E.; IGLEWSKI, B. H. **Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*.** *J Bacteriol* 179: 3928–3935, 1997.
- AMANI, H.; MÜLLER, M. M.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. **Production of Microbial Rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* MM1011 for Ex Situ Enhanced Oil Recovery.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*. V. 170, p. 1080 – 1093, 2013.
- AMARAL, P. F. F.; FERREIRA, T. F.; FONTES, G. C.; COELHO, M. A. Z. **Glycerol valorization: New biotechnological routes.** *Food and bioproducts processing*, v. 87, p. 179-186, 2009.

- APROBIO. **Cenário para o biodiesel em 2030.** Disponível em: <
<http://aprobio.com.br/wp-content/uploads/2016/10/Cen%C3%A1rio-para-o-biodiesel-em-2030.pdf>> Acesso em: 06/02/2017.
- ARA, I.; MULLIGAN, C. N. **Conversion of Cr(VI) in water and soil using rhamnolipid.** 61. St Canadian Geotechnical Conference, Edmonton, Sept. 20-24, 2008. <http://spectrum.library.concordia.ca/975553/1/MR34614.pdf>
- AZARIAS, G. D. S. **Análise proteômica da levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 cultivada em diferentes concentrações de sacarose.** Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista –UNESP. Araraquara, 2015.
- BAHIA, F. M.; DE ALMEIDA, G. C.; DE ANDRADE, L. P.; CAMPOS, C. G.; QUEIROZ, L. R.; DA SILVA, R. L. V., et al. **Rhamnolipids production from sucrose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*.** *Sci. Rep.* 8:2905. doi: 10.1038/s41598-018-21230-2, 2018.
- BATOR, I.; WITTGENS, A.; ROSENAU, F.; TISO, T.; BLANK, L. M. **Comparison of three xylose pathways in *Pseudomonas putida* KT2440 for the synthesis of valuable products.** *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 480, 2020.
- BAZIRE, A.; ALAIN D. The *Pseudomonas aeruginosa* rhIG and rhIAB genes are inversely regulated and RhIG is not required for rhamnolipid synthesis. *BMC microbiology* 14.1, 1-9, 2014.
- BECKERS, V.; POBLETE-CASTRO, I.; TOMASCH, J.; WITTMANN, C. **Integrated analysis of gene expression and metabolic fluxes in PHA-producing *Pseudomonas putida* grown on glycerol.** *Microbial cell factories*, v. 15, p. 73, 2016.
- BEHRENS, B.; BAUNE, M.; JUNGKEIT, J.; TISO, T.; BLANK, L.; HAYEN, H. High performance liquid chromatography-charged aerosol detection applying an inverse gradient for quantification of rhamnolipid biosurfactants. *Journal of Chromatography A*. 1455. 10.1016/j.chroma.2016.05.079., 2016.
- BERTANI I.; VENTURI V. **Regulation of the N-acyl homoserine lactone-dependent quorum-sensing system in rhizosphere *Pseudomonas putida* WCS358 and cross-talk with the stationary-phase RpoS sigma factor and the global regulator GacA.** *Appl Environ Microbiol* 70: 5493–5502, 2004.

- BERTRAND, J. L.; RAMSAY, B. A.; RAMSAY, J. A.; CHAVARIE, C. **Biosynthesis of poly- β -hydroxyalkanoates from pentoses by *Pseudomonas pseudoflava*.** *Applied and environmental microbiology*, 56(10), 3133-3138, 1990.
- BEUKER, J.; BARTH, T.; STEIER, A.; WITTGENS, A.; ROSENAU, F.; HENKEL, M.; et al. **High titer heterologous rhamnolipid production.** *AMB Express* 6:124. doi: 10.1186/s13568-016-0298-5., 2016a.
- BEUKER, J.; STEIER, A.; WITTGENS, A.; ROSENAU, F.; HENKEL, M.; HAUSMANN, R. Integrated foam fractionation for heterologous rhamnolipid production with recombinant *Pseudomonas putida* in a bioreactor. *Amb Express*, 6(1), 1-10, 2016b.
- BRANDL, H.; GROSS, R.A.; LENZ, R.W.; FULLER, R.C. *Pseudomonas oleovorans* as a source of new poly(3-hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. *Appl. Environ. Microbiology*, v. 54, p. 1977-1982, 1988.
- BRASIL. **Lei nº 13.263, de 23 de março de 2016.** Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2015-2018/2016/Lei/L13263.htm#art1> Acesso em: 06/02/2017
- BRINKMAN, F.S.L.; MACFARLANE, E.L.A.; WARRENER, P.; HANCOCK, R.E.W. **Evolutionary Relationships among Virulence-Associated Histidine Kinases.** *Infect. Immun.*, v. 69, p. 5207-5211, 2001.
- BYRD, M. S.; SADOVSKAYA, I.; VINOGRADOV, E.; LU, H.; SPRINKLE, A. B.; RICHARDSON, S. H.; ... & WOZNIAK, D. J. Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production. *Molecular microbiology*, 73(4), 622-638, 2009.
- CABRERA-VALLADARES, N., RICHARDSON, A. P., OLVERA, C., TREVIÑO, L. G., DÉZIEL, E., LÉPINE, F., et al. **Monorhamnolipids and 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acids (HAAs) production using *Escherichia coli* as a heterologous host.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73, 187–194. doi: 10.1007/s00253-006-0468-5, 2006.
- CAIAZZA, N.C.; SHANKS, R.M.Q.; O'TOOLE, G.A. **Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*.** *Journal of Bacteriology*, v. 187, p. 7351 – 5361, 2005.

- CAMPOS-GARCIA, J.; CARO, A.D.; NÁJERA, R.; MILLER-MAIER, R.M.; AL-TAHHAN, R.A.; SOBERÓN-CHÁVEZ, G. **The *Pseudomonas aeruginosa* rhIG gene encodes NADPHdependent β -ketoacyl reductase which is specifically involved in rhamnolipid synthesis.** *J. Bacteriol.*, v. 180, p. 4442–4451, 1998.
- CAO, L., WANG, Q., ZHANG, J., LI, C., YAN, X., LOU, X., et al. Construction of a stable genetically engineered rhamnolipid-producing microorganism for remediation of pyrene-contaminated soil. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 2783–2790. doi: 10.1007/s11274-012-1088-0, 2012.
- CHA, M., LEE, N., KIM, M., KIM, M., AND LEE, S. **Heterologous production of *Pseudomonas aeruginosa* EMS1 biosurfactant in *Pseudomonas putida*.** *Bioresour. Technol.* 99, 2192–2199. doi: 10.1016/j.biortech.2007.05.035, 2008.
- CHONG, H., & LI, Q. Microbial production of rhamnolipids: opportunities, challenges and strategies. *Microbial cell factories*, 16(1), 1-12, 2017.
- CHYZANOWSKI Ł, ŁAWNICZAK Ł, CZACZYK K. **Why do microorganisms produce rhamnolipids?** *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 28, p. 401-419, 2012.
- COLAK, A. K., & KAHRAMAN, H. The use of raw cheese whey and olive oil mill wastewater for rhamnolipid production by recombinant *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental and Experimental Biology*, 11(3), 125-130, 2013.
- CONTI, E., FLAIBANI, A., O'REGAN, M., & SUTHERLAND, I. W. **Alginate from *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*: production and properties.** *Microbiology*, 140(5), 1125-1132, 1994.
- COYNE JR, M. J., RUSSELL, K. S., COYLE, C. L., & GOLDBERG, J. B. **The *Pseudomonas aeruginosa* algC gene encodes phosphoglucomutase, required for the synthesis of a complete lipopolysaccharide core.** *Journal of Bacteriology*, 176(12), 3500-3507, 1994.
- D' ORTH, J.; THIELE, I.; PALSSON, B. **What is flux balance analysis?** *Nature Biotechnology*, v. 28, p. 245 -248, 2010.

- Da SILVA, V. L.; LOVAGLIO, R. B.; TOZZI, H. H.; TAKAKI, M.; CONTIERO, J. **Rhamnolipids: A New Application in Seeds Development.** *Journal of Medical and Biological Science Research*, v. 1, p. 100-106, 2015a.
- Da SILVA, V. L.; LOVAGLIO, R. B.; VON ZUBEN, C. J.; CONTIERO, J. **Rhamnolipids: solution against *Aedes aegypti*?** *Frontiers in Microbiology*, v. 6, p. 1-5, 2015b.
- DE GONZALO, G., COLPA, D. I., HABIB, M. H., & FRAAIJE, M. W. **Bacterial enzymes involved in lignin degradation.** *Journal of biotechnology*, 236, 110-119, 2016.
- DE LIMA, C. J. B., F. P. FRANCA, E. F. C. SERVULO, A. A. RESENDE, AND V. L. CARDOSO. **Enhancement of rhamnolipid production in residual soybean oil by an isolated strain of *Pseudomonas aeruginosa*.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 137:463–470, 2007.
- DE PAULA, F. C., DE PAULA, C. B., GOMEZ, J. G. C., STEINBÜCHEL, A., & CONTIERO, J. Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production from biodiesel by-product and propionic acid by mutant strains of *Pandora sp.* *Biotechnology progress*, 33(4), 1077-1084, 2017.
- DEVELTER, D. W.; LAURYSEN, L. M. **Properties and industrial applications of sophorolipids.** *European journal of lipid science and technology*, v.112, p. 628-638, 2010.
- DEZIEL, E., LEPINE, F., MILOT, S., HE, J., MINDRINOS, M.N., TOMPKINS, R.G., RAHME, L.G. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 1339–1344, 2004.
- DÉZIEL, E.; LEPINI, F.; MILOT, S.; VILLEMUR, R. ***rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids.** *Microbiol.*, v. 149, p. 2005 – 2013, 2003.
- DHANARAJAN, G., & SEN, R. . **Cost analysis of biosurfactant production from a scientist's perspective.** *Biosurfactants*, 159, 153, 2014.

- DRAGOSITS, M., & MATTANOVICH, D. **Adaptive laboratory evolution—principles and applications for biotechnology.** *Microbial cell factories*, v. 12, p. 64, 2013.
- DUBEY, K., & A. JUWARKAR. Distillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 17 (1):61–69, 2001.
- DULCEY, C. E., LOPEZ DE LOS SANTOS, Y., LÉTOURNEAU, M., DÉZIEL, E., & DOUCET, N. . Semi-rational evolution of the 3-(3-hydroxyalkanoxyloxy) alkanoate (HAA) synthase RhIA to improve rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia glumae*. *The FEBS journal*, 286(20), 4036-4059, 2019.
- DVOŘÁK, P., KOVÁČ, J., & DE LORENZO, V. . **Biotransformation of d-xylose to d-xylonate coupled to medium-chain-length polyhydroxyalkanoate production in cellobiose-grown *Pseudomonas putida* EM42.** *Microbial biotechnology*, 13(4), 1273-1283, 2020.
- EL-HOUSSEINY, GHADIR S. et al. **Isolation, screening and improvement of rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa*.** *Indian Journal of Biotechnology*, v. 16, p. 611-619, 2017.
- ELENA, S. F.; LENSKI, R. E. **Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation.** *Nature Reviews Genetics*, v. 4, p. 457-469, 2003.
- ELMORE, J. R., DEXTER, G. N., SALVACHÚA, D., O'BRIEN, M., KLINGEMAN, D. M., GORDAY, K., ... & GUSS, A. M. . Engineered *Pseudomonas putida* simultaneously catabolizes five major components of corn stover lignocellulose: Glucose, xylose, arabinose, p-coumaric acid, and acetic acid. *Metabolic Engineering*, 62, 62-71, 2020.
- ERAQUI, W. A.; YASSIN, A. S.; ALI, A. E.; AMIN, M. A. **Utilization of crude glycerol as a substrate for the production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*.** *Biotech. Res. Int.*, 2016.
- ESCAPA, I. F., DEL CERRO, C., GARCIA, J. L.; PRIETO, M. A. **The role of Glp Repressor in *Pseudomonas putida* KT2440 growth and PHA production from glycerol.** *Environ. Microbiol.*, v.15, p. 93–110, 2012.

- FERNANDES, B. S., VIEIRA, J. P. F., CONTESINI, F. J., MANTELATTO, P. E., ZAIAT, M., & PRADELLA, J. G. D. C. . **High value added lipids produced by microorganisms: a potential use of sugarcane vinasse.** *Critical reviews in biotechnology*, 37(8), 1048-1061, 2017.
- FIECHTER, A. **Biosurfactants: moving towards industrial application.** *Trends in Biotechnol.*, v.10, p. 208-217, 1992.
- FUNSTON SJ, TSAOUSI K, RUDDEN M, SMYTH TJ, STEVENSON PS, MARCHANT R, BANAT IM **Characterising rhamnolipid production in *Burkholderia thailandensis* E264, a non-pathogenic producer.** *Appl Microbiol Biotechnol* 100:7945–7956. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7564-y>, 2016.
- GÁMEZ, O. R., RODRÍGUEZ, A. A., CADRE, J. V., & GÓMEZ, J. G. C. . Screening and characterization of biosurfactant-producing bacteria isolated from contaminated soils with oily wastes. *J Environ Treat Tech*, 5, 5-11, 2017.
- GARCÍA-REYES, S., SOBERÓN-CHÁVEZ, G., & COCOTL-YANEZ, M. . The third quorum-sensing system of *Pseudomonas aeruginosa*: *Pseudomonas* quinolone signal and the enigmatic PqsE protein. *Journal of medical microbiology*, 69(1), 25-34, 2020.
- GEORGE S, JAYACHANDRAN K. Analysis of rhamnolipid biosurfactants produced through submerged fermentation using orange fruit peelings as sole carbon source. *Appl Biochem Biotechnol*.158:694–705, 2009..
- GHOSH, T., NGO, T. D., KUMAR, A., AYRANCI, C., & TANG, T. . **Cleaning carbohydrate impurities from lignin using *Pseudomonas fluorescens*.** *Green Chemistry*, 21(7), 1648-1659, 2019.
- GIANI C, WULLBRANDT D, ROTHERT R, MEIWES J *Pseudomonas aeruginosa* and its use in a process for the biotechnological preparation of l-rhamnose. German Patent, US005658793A, 1997.
- GILBERT, H. J., JENKINS, G., SULLIVAN, D. A., & HALL, J. . **Evidence for multiple carboxymethylcellulase genes in *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa*.** *Molecular and General Genetics*, 210, 551–556, 1987.
- GIRAUD, M. F., & NAISMITH, J. H. . **The rhamnose pathway.** *Current opinion in structural biology*, 10(6), 687-696, 2000.

- GUNTHER NW, NUNEZ A, FETT W, SOLAIMAN DKY. **Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a nonpathogenic bacterium.** *Appl Environ Microbiol.*;71:2288–93, 2005.
- GUO, Q. Q., ZHANG, W. B., ZHANG, C., SONG, Y. L., LIAO, Y. L., MA, J. C., ... & WANG, H. H. . **Characterization of 3-oxacyl-acyl carrier protein reductase homolog genes in *pseudomonas aeruginosa* PAO1.** *Frontiers in microbiology*, 10, 1028, 2019.
- HABA, E., ESPUNY, M. J., BUSQUETS, M., & MANRESA, A. . **Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils.** *Journal of applied microbiology*, 88(3), 379-387, 2000.
- HAN, L., LIU, P., PENG, Y., LIN, J., WANG, Q., AND MA, Y. . **Engineering the biosynthesis of novel rhamnolipids in *Escherichia coli* for enhanced oil recovery.** *J. Appl. Microbiol.* 117, 139–150. doi: 10.1111/jam.12515, 2014.
- HAN, L., LIU, P., PENG, Y., LIN, J., WANG, Q., AND MA, Y. . **Engineering the biosynthesis of novel rhamnolipids in *Escherichia coli* for enhanced oil recovery.** *J. Appl. Microbiol.* 117, 139–150. doi: 10.1111/jam.12515, 2014.
- HEALY, M. G., DEVINE, C. M.; MURPHY, R. **Microbial production of biosurfactants.** *Resources, conservation and recycling*, v. 18, p. 41-57, 1996.
- HENKEL, M.; MÜLLER, M. M.; KÜGLER, J. H.; LOVAGLIO, R. B.; CONTIERO, J.; HAUSMANN, R. **Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for next-generation rhamnolipid production.** *Process Biochemistry*, v. 47, p. 1207-1219, 2012.
- HERVÁS, A. B., CANOSA, I., & SANTERO, E. . **Transcriptome analysis of *Pseudomonas putida* in response to nitrogen availability.** *Journal of bacteriology*, 190(1), 416-420, 2008.
- HEYD, M., KOHNERT, A., TAN, T. H., NUSSER, M., KIRSCHHÖFER, F., BRENNER-WEISS, G., FRANZREB, M. & BERENSMEIER, S. . **Development and trends of biosurfactant analysis and purification using rhamnolipids as an example.** *Analytical and bioanalytical chemistry*, 391(5), 1579-1590, 2008.

- HOANG T.T; SCHWEIZER H.P. **Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI): a target for the antimicrobial triclosan and its role in acylated homoserina lactone synthesis.** *J. Bacteriol.*, v. 181, p. 5489-5497, 1999.
- HOOD, E. E., TEOH, K., DEVAIAH, S. P., & REQUESENS, D. V. . **Biomass crops for biofuels and bio-based products.** *Encyclopedia of sustainability science and technology*. Springer, New York, NY, 1268-1297, 2012.
- HORI, K.; ICHINOHE, R.; UNNO, H.; MARSUDI, S. **Simultaneous syntheses of polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* IFO3924 at various temperatures and from various fatty acids.** *Biochem Eng J.*, v. 53, p. 196–202, 2011.
- HORLAMUS, F., WITTEGENS, A., NOLL, P., MICHLER, J., MÜLLER, I., WEGGENMANN, F., et al. . One-step bioconversion of hemicellulose polymers to rhamnolipids with *Cellvibrio japonicus*: a proof-of-concept for a potential host strain in future bioeconomy. *Glob. Change Biol. Bioenergy* 11:1. doi: 10.1111/gcbb.12542, 2018.
- HRŮZOVÁ, K., PATEL, A., MASÁK, J., MAŤÁTKOVÁ, O., ROVA, U., CHRISTAKOPOULOS, P., & MATSAKAS, L. . **A novel approach for the production of green biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* using renewable forest biomass.** *Science of The Total Environment*, 711, 135099, 2020.
- HU, S., LUO, X., WAN, C.; LI, Y. **Characterization of crude glycerol from biodiesel plants.** *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 60, p. 5915-5921, 2012.
- HUIJBERTS, G.N.M.; EGGINK, G.; DE WAARD, P.; HUISMAN, G.W.; WITHOLT, B. *Pseudomonas putida* KT2442 cultivated on glucose accumulates poly (3-hydroxyalkanoates) consisting of saturate and unsaturated monomers. *Appl. Environ. Microbiology*, v. 58, p. 536-544, 1992.
- IQBAL, S.; KHALID, Z.; MALIK, K. Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by a gamma ray-induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. *Letters in Applied Microbiology*, v. 21, p. 176-179, 1995.
- IRORERE, V. U., TRIPATHI, L., MARCHANT, R., MCCLEAN, S., & BANAT, I. M. . **Microbial rhamnolipid production: a critical re-evaluation of published**

data and suggested future publication criteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(10), 3941, 2017.

ISMAIL, W., EL NAYAL, A. M., RAMADAN, A. R., & ABOTALIB, N. . Sulfur source-mediated transcriptional regulation of the *rhlABC* genes involved in biosurfactants production by *Pseudomonas* sp. strain AK6U. *Frontiers in microbiology*, 5, 423, 2014.

JEFFRIES, T. W. . Utilization of xylose by bacteria, yeasts, and fungi. *Pentoses and lignin*, 1-32, 1983.

JENSEN, V., LÖNS, D., ZAOUI, C., BREDENBRUCH, F., MEISSNER, A., DIETERICH, G., ... & HÄUSSLER, S. . RhlR expression in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the *Pseudomonas* quinolone signal via PhoB-dependent and-independent pathways. *Journal of bacteriology*, 188(24), 8601-860, 2006.

JOY, S., KHARE, S. K., & SHARMA, S. . Synergistic extraction using sweep-floc coagulation and acidification of rhamnolipid produced from industrial lignocellulosic hydrolysate in a bioreactor using sequential (fill-and-draw) approach. *Process Biochemistry*, 90, 233-240, 2020.

JOY, S., RAHMAN, P. K., KHARE, S. K., SONI, S. R., & SHARMA, S. . Statistical and sequential (fill-and-draw) approach to enhance rhamnolipid production using industrial lignocellulosic hydrolysate C6 stream from *Achromobacter* sp.(PS1). *Bioresource technology*, 288, 121494, 2019.

JUDE, F., KOHLER, T., BRANNY, P., PERRON, K., MAYER, M.P., COMTE, R., VAN DELDEN, C.,. **Posttranscriptional control of quorum-sensing-dependent virulence genes by DksA in *Pseudomonas aeruginosa*.** *J. Bacteriol.* 185, 3558–3566, 2003.

JUHAS M, WIEHLMANN L, HUBER B, et al. **Global regulation of quorum sensing and virulence by VqsR in *Pseudomonas aeruginosa*.** *Microbiology* 150: 831–841, 2004.

KAMALI, A., AHMADZADE, M., & BEHBODI, K. . **Investigation on biofilm formation stages in some strains of *pseudomonas fluorescens* and the influence of some nutritional factors on biofilm formation of selected strain.** *Iranian Journal of Plant Pathology*, 47(4), 463-470, 2011.

KASKATEPE B, YILDIZ S, GUMUSTAS M, OZKAN SA. Rhamnolipid Production by *Pseudomonas putida* IBS036 and *Pseudomonas pachastrellae* LOS20 with using pulps. *Curr Pharm Anal.*;13:138–44, 2017.

KASKATEPE, B., YILDIZ, S., GUMUSTAS, M., & A OZKAN, S. . **Rhamnolipid production by *Pseudomonas putida* IBS036 and *Pseudomonas pachastrellae* LOS20 with using pulps.** *Current Pharmaceutical Analysis*, 13(2), 138-144, 2017.

KAWECKI, T. J., LENSKE, R. E., EBERT, D., HOLLIS, B., OLIVIERI, I.; WHITLOCK, M. C. **Experimental evolution.** *Trends in ecology & evolution*, v. 27, p. 547-560, 2012.

KHANNA, S.; GOYAL, A.; MOHOLKAR, S. **Microbial conversion of glycerol: present status and future prospects.** *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 32, n° 3, p. 235-262, 2012.

KOCH, A. K.; KÄPPELI, O.; FIETCHER, A.; REISER, J. **Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutant.** *J. Bacteriol.*, v. 173, p. 4212-4219, 1991.

KROMER, J. O., NIELSEN, L., & BLANK, L. M. **Metabolic flux analysis: methods and protocols** (Vol. 1191). *Humana Press*, 2014.

KRUTIKA I., ASHWIN S., LU-KWANG J. **A new approach for downstream purification of rhamnolipid biosurfactants.** *Food and Bioproducts Processing*, Volume 114, Pages 122-13, 2019.

KULKARNI, N., & GADRE, R. V. . **Production and properties of an alkaline, thermophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* NS2W.** *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28(6), 344-348, 2002.

KUMAR, C. G; MAMIDYALA, S.K.; DAS, B.; SRIDHAR B.; DEVI, G.S.; KARUNA, M.S. **Synthesis of Biosurfactant-Based Silver Nanoparticles with Purified Rhamnolipids Isolated from *Pseudomonas aeruginosa* BS-161R.** *J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 20, p. 1061– 68, 2010.

KUMAR, C. G.; MAMIDYALA, S. K.; SUJITHA, P.; MULUKA, H.; AKKENAPALLY, S. **Evaluation of Critical Nutritional Parameters and Their Significance in the**

Production of Rhamnolipid Biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* BS-161R. *Biotechnol. Prog.*, v. 28, n. 6, p. 1507 – 15016, 2012.

KUMAR, R., SINGH, S., & SINGH, O. V. . **Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives.** *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 35(5), 377-391, 2008.

LA ROSA, R., BEHRENDTS, V., WILLIAMS, H. D., BUNDY, J. G., & ROJO, F. . **Influence of the Crc regulator on the hierarchical use of carbon sources from a complete medium in *Pseudomonas*.** *Environmental microbiology*, 18(3), 807-818, 2016.

LACROIX, R. A., PALSSON, B. O.; FEIST, A. M. **A Model for Designing Adaptive Laboratory Evolution Experiments.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 83, p. e03115-16, 2017.

LANG, S. **Surfactants produced by microorganisms.** *Surfactant science series*, 279-316, 2003.

LECOUTERE, E., VERLEYEN, P., HAENEN, S., VANDERSTEEGEN, K., NOBEN, J. P., ROBBEN, J., ... & LAVIGNE, R. . **A theoretical and experimental proteome map of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.** *MicrobiologyOpen*, 1(2), 169-181, 2012.

LEDGHAM F, VENTRE I, SOSCIA C, FOGLINO M, STURGIS JN & LAZDUNSKI A **Interactions of the quorum sensing regulator QscR: interaction with itself and the other regulators of *Pseudomonas aeruginosa* LasR and RhlR.** *Mol Microbiol* 48: 199–210, 2003.

LEE, J., WU, J., DENG, Y., WANG, J., WANG, C., WANG, J., ... & ZHANG, L. H. . **A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response.** *Nature chemical biology*, 9(5), 339-343, 2013.

LEE, J., ZHANG, L.. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell* 6, 26–41, 2015.

LEITERMANN, F., SYLDATK, C., & HAUSMANN, R. . Fast quantitative determination of microbial rhamnolipids from cultivation broths by ATR-FTIR Spectroscopy. *Journal of Biological Engineering*, 2(1), 1-8, 2008.

- LI, A. H., XU, M. Y., SUN, W., & SUN, G. P. . Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* GIM 32 using different substrates including molasses distillery wastewater. *Applied biochemistry and biotechnology*, 163(5), 600-611, 2011.
- LIANG, H., DENG, X., JI, Q., SUN, F., SHEN, T., HE, C. The *Pseudomonas aeruginosa* global regulator VqsR directly inhibits QscR to control quorum-sensing and virulence gene expression. *J. Bacteriol.* 194, 3098–3108, 2012.
- LIN, J., CHENG, J., WANG, Y., & SHEN, X. . **The *Pseudomonas* quinolone signal (PQS): not just for quorum sensing anymore.** *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 230, 2018.
- LINDHOUT, T., LAU, P.C., BREWER, D., LAM, J.S. Truncation in the core oligosaccharide of lipopolysaccharide affects flagella-mediated motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 via modulation of cell surface attachment. *Microbiology* 155, 3449–3460, 2009.
- LINGER, J. G., VARDON, D. R., GUARNIERI, M. T., KARP, E. M., HUNSINGER, G. B., FRANDEN, M. A., ... & BECKHAM, G. T. . **Lignin valorization through integrated biological funneling and chemical catalysis.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(33), 12013-12018, 2014.
- LIU, Y., GOKHALE, C. S., RAINEY, P. B., & ZHANG, X. X. . **Unravelling the complexity and redundancy of carbon catabolic repression in *Pseudomonas fluorescens* SBW25.** *Molecular microbiology*, 105(4), 589-605, 2017.
- LOESCHCKE, A., & THIES, S. . ***Pseudomonas putida*—a versatile host for the production of natural products.** *Applied microbiology and biotechnology*, 99(15), 6197-6214, 2015.
- LÓPEZ, M. J., NICHOLS, N. N., DIEN, B. S., MORENO, J., & BOTHAST, R. J. . **Isolation of microorganisms for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysates.** *Applied microbiology and biotechnology*, 64(1), 125-131, 2004.
- LOURITH, N. & KANLAYAVATTANAKUL, M. **Natural surfactants used in cosmetics: glycolipids.** *International Journal of Cosmetic Science*, v. 31, p. 255–261, 2009.

- LOVAGLIO, R. B. **Produção de rhamnolipídios por mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* LBI**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista –UNESP. Rio Claro, 2011
- LOVAGLIO, R. B.; SANTOS, F. J.; JAFELICCI Jr, M.; CONTIERO, J. **Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: pH rules**. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 85, p. 301–305, 2011.
- LOVAGLIO, R. B.; SILVA, V. L.; FERREIRA, H.; HAUSMANN, R.; CONTIERO, J. **Rhamnolipids know-how: Looking for strategies for its industrial dissemination**. *Biotechnology advances.*, v. 33; p. 1715-1726, 2015.
- LOVAGLIO, R.; SILVA, V.; CAPELINI, T.; EBERLIN, M.; HAUSMANN, R.; HENKEL, M.; CONTIERO, J. **Rhamnolipids Production by a *Pseudomonas aeruginosa* LBI Mutant: Solutions and Homologs Characterization**. *Tenside Surf. Det.*, v. 51, p. 397-405, 2014.
- LUO, Z., YUAN, X. Z., ZHONG, H., ZENG, G. M., LIU, Z. F., MA, X. L., & ZHU, Y. Y. . Optimizing rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 grown on waste frying oil using response surface method and batch-fed fermentation. *Journal of Central South University*, 20(4), 1015-1021, 2013.
- MA, L., WANG, J., WANG, S., ANDERSON, E. M., LAM, J. S., PARSEK, M. R., & WOZNIAK, D. J. . **Synthesis of multiple *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix exopolysaccharides is post-transcriptionally regulated**. *Environmental microbiology*, 14(8), 1995-2005, 2012.
- MAIER, R.M. & SOBERÓN-CHÁVEZ, G. ***Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications**. *Appl Microbiol Biotechnol.* v. 54, p. 625-33, 2000.
- MAKKAR, R. S., CAMEOTRA, S. S.; BANAT, I. M. **Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production**. *AMB express*, v. 1, p. 5, 2011.
- MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. **An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications**. *Appl Microbiol Biotechnol.*, v. 58, p. 428 – 434, 2002.

MANAARGADOO-CATIN, M., ALI-CHERIF, A., POUGNAS, J. L., & PERRIN, C. . **Hemolysis by surfactants—A review.** *Advances in Colloid and Interface Science*, 228, 1-16, 2016.

MARCHANT R, BANAT IM **Protocols for measuring biosurfactant production in microbial cultures.** In: *Springer Protocols Handbooks*. Springer, pp 1–10, 2014.

MARCHANT R, FUNSTON S, UZOIGWE C, RAHMAN P, BANAT IM **Production of biosurfactants from nonpathogenic bacteria.** In *Biosurfactants: Production and Utilization—Processes, Technologies, and Economics*, CRC press, pp73–82, 2014.

MARCHANT, R.; BANAT I. M. **Biosurfactants: A sustainable replacement for chemical surfactants?** *Biotechnology letters*, v. 34, p. 1597-1605, 2012.

MCGINLEY, M.; MOTT, J. **Bioethanol Production Monitoring using Ion Exclusion HPLC with Rezex™ ROA Column.** Phenomenex Application Note TN-1043. Publisher Name: Phenomenex, Inc. Publisher Location: Torrance (2008). https://www.brexbuehler.ch/fileadmin/redacteur/pdf/services/app-support/tech-chem_and_packaging/TN1043_bioethanol_monitoring_using_Rezex_ROA_LC.pdf (accessed 22.05.17)

MEHER, L. C.; SAGAR, D. V.; NAIK, S. N. **Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review.** *Renew Sustain Energy Rev*, v. 10, p. 248–268, 2006.

MEIJNEN, J. P., DE WINDE, J. H., & RUIJSSENAARS, H. J. . **Engineering *Pseudomonas putida* S12 for efficient utilization of D-xylose and L-arabinose.** *Applied and environmental microbiology*, 74(16), 5031-5037, 2008.

MIAO, S., CALLOW, N., DASHTBOZORG, S. S., SALAGER, J. L., & JU, L. K. . **Ethylation of Di-rhamnolipids: a green route to produce novel sugar fatty acid nonionic surfactants.** *Journal of Surfactants and Detergents*, 17(6), 1069-1080, 2014.

MOUTINHO, L. F., MOURA, F. R., SILVESTRE, R. C., & ROMÃO-DUMARESQ, A. S. . **Microbial biosurfactants: A broad analysis of properties, applications, biosynthesis, and techno-economical assessment of rhamnolipid production.** *Biotechnology Progress*, 37(2), e3093, 2021.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. **Towards commercial production of microbial surfactants.** *Trends Biotechnol.*, v. 24, p. 509-515, 2006.

MÜLLER, M. M., & HAUSMANN, R. . Regulatory and metabolic network of rhamnolipid biosynthesis: traditional and advanced engineering towards biotechnological production. *Applied microbiology and biotechnology*, 91(2), 251-264, 2011.

MÜLLER, M.M.; HÖRMANN, B.; KUGEL, M.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. **Evaluation of rhamnolipids production capacity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in comparison to the rhamnolipids over-producer strains DSM 7108 and DSM 2874.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 89, 585-592, 2011.

MÜLLER, M.M.; KÜGLER, J.H.; HENKEL, M.; GERLITZKI, M.; HÖRMANN, B.; PÖHNLEIN, M.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. **Rhamnolipids – next generation surfactants?** *J. Biotechnol.*, v. 162, p. 366–380, 2012.

MULLIGAN, C. N. ; GIBBS, B. F. **Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*.** *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v. 55, p. 3016-3019, 1989.

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

MULLIGAN, C. N. **Recent advances in the environmental applications of biosurfactants.** *Curr. Op. Coll. Interf. Sci.*, v. 14, p. 372 – 378, 2009.

MULLIGAN, C.N., MAHMOURIDES, G., GIBBS, B.F. **The influence of phosphate metabolism on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*.** *J. Biotechnol.* 12, 199–210, 1989.

NAIK, S. N., GOUD, V. V., ROUT, P. K., & DALAI, A. K. . **Production of first and second generation biofuels. A comprehensive review.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 578–597, 2010.

NALINI, S., & PARTHASARATHI, R. . Optimization of rhamnolipid biosurfactant production from *Serratia rubidaea* SNAU02 under solid-state fermentation and its biocontrol efficacy against *Fusarium* wilt of eggplant. *Annals of Agrarian Science*, 16(2), 108-115, 2018.

- NASPOLINI BF, DE OLIVEIRA MACHADO AC, CRAVO JUNIOR WB, FREIRE DMG, CAMMAROTA MC. **Bioconversion of sugarcane vinasse into high added value products and energy.** *BioMed Res Int.* <https://doi.org/10.1155/2017/8986165>, 2017.
- NAWAWI, W. M. F. W., JAMAL, P., & ALAM, M. Z. . **Utilization of sludge palm oil as a novel substrate for biosurfactant production.** *Bioresource Technology*, 101(23), 9241-9247, 2010.
- NETO, D. C., MEIRA, J. A., DE ARAÚJO, J. M., MITCHELL, D. A., & KRIEGER, N. . **Optimization of the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 in solid-state culture.** *Applied microbiology and biotechnology*, 81(3), 441-448, 2008.
- NITSCHKE M, COSTA S G, HADDAD R, GONCALVES L A, EBERLIN M N, CONTIERO J. **Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI.** *Biotechnology Progress*, 21(5): 1562–1566, 2005.
- NITSCHKE, M., COSTA, S. G., & CONTIERO, J. . **Structure and applications of a rhamnolipid surfactant produced in soybean oil waste.** *Applied biochemistry and biotechnology*, 160(7), 2066-2074, 2010.
- NITSCHKE, M., FERRAZ, C., & PASTORE, G. M. . **Seleção de microrganismos para a produção de biosurfatantes em resíduos agroindustriais.** *Brazilian Journal of Microbiology*, 35(1-2), 81-85, 2004.
- NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A.; CONTIERO, J. **Rhamnolipid Surfactants: An Update on the General Aspects of These Remarkable Biomolecules.** *Biotechnology Progress*, v. 21, p. 1595 – 1600, 2005.
- NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A.; CONTIERO, J. **Rhamnolipids and PHAs: Recent reports on *Pseudomonas*-derived molecules of increasing industrial interest.** *Proc. Biochem.*, v. 46, p. 621-630, 2011.
- OBERHARDT, M. A., PUCHAŁKA, J., FRYER, K. E., MARTINS DOS SANTOS, V. A. P.; PAPIN, J. A. **Genome-scale metabolic network analysis of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.** *J. Bacteriol.*, v. 190, p. 2790–2803, 2008.

- OCHSNER, U. A., FIECHTER, A., AND REISER, J. . Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlAB genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. *J. Biol. Chem.* 269, 19787–19795., 1994
- OCHSNER, U.A., REISER, J.T. **Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 6424–6428, 1995.
- OCHSNER, U.A.; REISER, J.; FIECHTER, A., WITHOLT, B. **Production of *Pseudomonas aeruginosa* Rhamnolipid Biosurfactants in Heterologous Hosts.** *Appl Environ Microbiol.*, v. 61, p. 3503-3506, 1995.
- OLIVEIRA, F. J. S.; VAZQUEZ, L.; de CAMPOS, N. P.; FRANCA, F. P. **Production of rhamnolipids by a *Pseudomonas alcaligenes* strain.** *Process Biochemistry*, v. 44, p. 383–9, 2008.
- OLVERA, C., GOLDBERG, J. B., SÁNCHEZ, R., & SOBERÓN-CHÁVEZ, G. . **The *Pseudomonas aeruginosa* algC gene product participates in rhamnolipid biosynthesis.** *FEMS microbiology letters*, 179(1), 85-90, 1999.
- PACHECO, G. J., REIS, R. S., FERNANDES, A. C. L. B., DA ROCHA, S. L. G., PEREIRA, M. D., PERALES, J.; FREIRE, D. M. G. **Rhamnolipid production: effect of oxidative stress on virulence factors and proteome of *Pseudomonas aeruginosa* PA1.** *Applied microbiology and biotechnology*, v. 95, p. 1519-1529, 2012.
- PALANISAMY, P. & RAICHUR, A.M. **Synthesis of spherical NiO nanoparticles through a novel biosurfactant mediated emulsion technique.** *Mater Sci Eng. C Biomim. Supramol. Syst.*, v. 29, p. 199-204, 2009.
- PAMP, S. J.; TOLKER-NIELSEN, T. **Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*.** *Journal of Bacteriology*, v. 189, P. 2531–2539, 2007.
- PATOWARY, R., PATOWARY, K., KALITA, M. C., & DEKA, S. . **Utilization of paneer whey waste for cost-effective production of rhamnolipid biosurfactant.** *Applied biochemistry and biotechnology*, 180(3), 383-399, 2016.

- PERFUMO, A.; BANAT, I. M.; CANGANELLA, F.; MARCHANT, R. **Rhamnolipid production by a novel thermophilic hydrocarbon3degrading *Pseudomonas aeruginosa* APO231.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.72, p.132-138, 2006.
- PILJAC, A.; STIPCEVIC, T.; PILJAC-ZEGARAC, J.; PILJAC, G. **Successful treatment of chronic decubitus ulcer with o,1% dirhamnolipid ointment.** *J. Cutan. Med. Surg.*, v. 12, p. 142-146, 2008.
- PILJAC, G & PILJAC, V. **Pharmaceutical preparation based on Rhamnolipid.** *US Patent. Patent #: 5,455,232.*, 1995.
- PIRÔLLO, M.P.S; MARIANO, A.P.; LOVAGLIO, R.B.; COSTA, S.G.V.A.O.; WALTER, V.; HAUSMANN, R.; CONTIERO, J. **Biosurfactant synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* LBI isolated from a hydrocarbon-contaminated site.** *Journal of Applied Microbiology*, v. 105, n. 5, p. 1484 – 1490, 2008.
- PORNSUNTHORNTAWEE, O.; WONGPANIT, P.; RUJIRAVANIR, R. **Rhamnolipid Biosurfactants: Production and their potential in environmental biotechnology.** *CHAPTER 16: BIOSURFACTANTS.* ED: RAMKRISNA SEN, LANDES BIO SCIENCE & SPRINGER SCIENCE: BANGKOK, TAILÂNDIA, p. 211-221, 2010.
- PORTNOY, V.A., BEZDAN, D., ZENGLER, K. **Adaptive laboratory evolutionharnessing the power of biology for metabolic engineering.** *Curr. Opin. Biotechnol.*, v. 22, p. 590–594, 2011.
- PRABU, R., KUILA, A., RAVISHANKAR, R., RAO, P. V., CHOUDARY, N. V., & VELANKAR, H. R. . **Microbial rhamnolipid production in wheat straw hydrolysate supplemented with basic salts.** *RSC Advances*, 5(64), 51642-51649, 2015.
- PROVOST, A.; BASTIN, G. **Dynamic metabolic modeling under the balanced growth condition,** *J. Proc. Contr.*, v. 14, p. 717–728, 2004.
- QIUZHUO, Z.; WEIMIN, C.; JUAN, W.; **Stimulatory effects of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* BSZ-07 on rice straw decomposing.** *J. Environ. Sci.*, v. 20, p. 975 – 980, 2008.

- RAHIM, R., BURROWS, L. L., MONTEIRO, M. A., PERRY, M. B., & LAM, J. S. (). **Involvement of the rml locus in core oligosaccharide and O polysaccharide assembly in Pseudomonas aeruginosa.** *Microbiology*, 146(11), 2803-2814, 2000.
- RAHIM, R.; OCHSNER, U.A.; OLVERA, C.; GRANINGER, M.; MESSNER, P.; LAM, J.S.; SOBERÓN-CHÁVEZ, G. **Cloning and functional characterization of the Pseudomonas aeruginosa rhIC gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for dirhamnolipid biosynthesis.** *Mol. Microbiol.*, v. 40, p. 708–718, 2001.
- RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T.; McCLEAN, S. **Rhamnolipid biosurfactants production by strains of Pseudomonas aeruginosa using low cost raw materials.** *Biotechnonology Progress*, v. 18, p.1277-1281, 2002.
- RAHMANPOUR, R., & BUGG, T. D. . Characterisation of Dyp-type peroxidases from Pseudomonas fluorescens Pf-5: oxidation of Mn (II) and polymeric lignin by Dyp1B. *Archives of biochemistry and biophysics*, 574, 93-98, 2015.
- RANJBAR, S., & HEJAZI, P. . Modeling and validating Pseudomonas aeruginosa kinetic parameters based on simultaneous effect of bed temperature and moisture content using lignocellulosic substrate in packed-bed bioreactor. *Food and Bioproducts Processing*, 117, 51-63, 2019.
- RASAMIRAVAKA, T.; LABTANI, Q.; DUEZ, P. JAZIRI, M. **The Formation of Biofilms by Pseudomonas aeruginosa: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms.** *BioMed Research International.*, v. 2015, p. 1 -15, 2015.
- RASHEDI, H., ASSADI, M. M., BONAKDARPOUR, B., & JAMSHIDI, E. . **Environmental importance of rhamnolipid production from molasses as a carbon source.** *International Journal of Environmental Science & Technology*, 2(1), 59-62, 2005a.
- RASHEDI, H., JAMSHIDI, E., BONAKDARPOUR, B., & MAZAHERI, A. M. **Isolation and production of biosurfactant from Pseudomonas aeruginosa isolated from Iranian southern wells oil,** 2005b.
- RAZA, Z. A., KHALID, Z. M., & BANAT, I. M. . **Characterization of rhamnolipids produced by a Pseudomonas aeruginosa mutant strain grown on waste**

oils. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 44(13), 1367-1373, 2009.

REIMMANN, C., BEYELER, M., LATIFI, A., WINTELER, H., FOGLINO, M., LAZDUNSKI, A., HAAS, D. **The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N-butylhomoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase.** *Mol. Microbiol.* 24, 309–319, 1997.

REIS, R. S.; PACHECO, G. J.; PEREIRA, A. G.; FREIRE, D. **Biosurfactants: Production and applications.** *Biodegradation – Life of Science, INTECH*: p. 31 – 62, 2013.

REIS, R.; ROCHA, S.; CHAPEAUROUGE, D.; DOMONT, G.; SANTA-ANNA, L.; FREIRE, D.; PERALES, J. **Effects of carbon and nitrogen sources on the proteome of *Pseudomonas aeruginosa* PA1 during rhamnolipid production.** *Process Biochemistry*, v. 45, p. 1504 – 1510, 2010.

RETALLACK, D. M., JIN, H., & CHEW, L. . **Reliable protein production in a *Pseudomonas fluorescens* expression system.** *Protein expression and purification*, 81(2), 157-165, 2012.

ROONEY AP, PRICE NPJ, RAY KJ, KUO TM. **Isolation and characterization of rhamnolipid-producing bacterial strains from a biodiesel facility.** *FEMS Microbiol Lett.*, 295:82–7, 2009.

RUDDEN M, TSAUOSI K, MARCHANT R, BANAT IM, SMYTH TJ. Development and validation of an ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method for the quantitative determination of rhamnolipid congeners. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015 Nov;99(21):9177-87. doi: 10.1007/s00253-015-6837-1. Epub 2015 Aug 15. Erratum in: *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015 Nov;99(21):9189. PMID: 26272088, 2015.

RUZZI, M., BARGHINI, P., MONTEBOVE, F., & SCHIESSER PONENTE, A. . **Effect of the carbon source on the utilization of ferulic, m-and p-coumaric acids by a *Pseudomonas fluorescens* strain.** *Annali di microbiologia ed enzimologia*, 47, 87-96, 1997.

SALAZAR-BRYAM, A. M.; LOVAGLIO, R. B.; CONTIERO, J. **Biodiesel byproduct bioconversion to rhamnolipids: Upstream aspects.** *Heliyon*, v. 3, p. 1. -19, 2017.

- SAMADI N., ABADIAN N., AHMADKHANIHA R., AMINI F., DALILI D., RASTKARI N., et al. . Structural characterization and surface activities of biogenic rhamnolipid surfactants from *Pseudomonas aeruginosa* isolate MN1 and synergistic effects against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Folia Microbiol.* 57, 501–508, 2012.
- SANTOS, A. S.; SAMPAIO, A. P. W.; WASQUEZ, G. S.; SANTA-ANNA, L. M.; PEREIRA, N.; FREIRE, D. M. G. **Evaluation of Different Carbon and Nitrogen Sources in Production of Rhamnolipids by a Strain of *Pseudomonas aeruginosa*.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 98-100, p. 1025 – 1035, 2002.
- SATYA ESWARI, J., & VENKATESWARLU, C. **Dynamic Modeling and Metabolic Flux Analysis for Optimized Production of Rhamnolipids.** *Chemical Engineering Communications*, v. 203, p. 326-338, 2016.
- SCHENK, T.; SCHUPHAN, I.; SCHMIDT, B. **High Performance liquid chromatographic determination of the rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa*.** *J. Chromatogr.*, v. 693, p. 7-13, 1995.
- SCHMIDBERGER, A., HENKEL, M., HAUSMANN, R.; SCHWARTZ, T. **Expression of genes involved in rhamnolipid synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in a bioreactor cultivation.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 97, p. 5779-5791, 2013.
- SCHUSTER, M., & GREENBERG, E. P. **A network of networks: quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*.** *International journal of medical microbiology*, 296(2-3), 73-81, 2006.
- SENTHILKUMAR, K., KUMAR, M. N., DEVI, V. C., SARAVANAN, K., & EASWARAMOORTHY, S. (). **Agro-Industrial waste valorization to energy and value added products for environmental sustainability.** In *Biomass Valorization to Bioenergy* (pp. 1-9). Springer, Singapore, 2020.
- SHARMA, H. K., XU, C., & QIN, W. (). Biological pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and bioproducts: an overview. *Waste and Biomass Valorization*, 10(2), 235-251, 2019.
- SHATILA, F., DIALLO, M. M., ŞAHAR, U., OZDEMIR, G., & YALÇIN, H. T. (). The effect of carbon, nitrogen and iron ions on mono-rhamnolipid production and

rhamnolipid synthesis gene expression by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. *Archives of microbiology*, 202(6), 2020.

SHREVE, G. S.; INGUVA, S.; GUNNAM, S. **Rhamnolipid biosurfactant enhancement of hexadecane biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa***. *Mol Mar Biol Biotechnol.*, v. 4, v. 331-7, 1995.

SIEGMUND, I., & WAGNER, F. (). New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. *Biotechnology Techniques*, 5(4), 265-268, 1991.

SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. **Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology**. *Biotechnology advances*, v. 27, p. 30-39, 2009.

SILVA, S.; FARIAS, C.; RUFINO, R.; LUNA, J.; SARUBBO, L. **Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992**. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.*, v. 79, p. 174-183, 2010.

SINGH DN, TRIPATHI AK. **Coal induced production of a rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas stutzeri*, isolated from the formation water of Jharia coalbed**. *Biores Technol.* 2013;128:215–21.

SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S. **Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences**. *Trends in Biotechnol.* Amsterdam, v. 22, nº 3, 142-146, 2004

SLININGER, P. J., & SHEA-WILBUR, M. A. (1995). Liquid-culture pH, temperature, and carbon (not nitrogen) source regulate phenazine productivity of the take-all biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Applied microbiology and biotechnology*, 43(5), 794-800.

SMITH, J. A. (1973). **Effect of carbon source on lipopolysaccharide production in *Pseudomonas fluorescens*** (Doctoral dissertation, Oklahoma State University).

SMYTH TJP, RUDDEN M, TSAOUSI K, MARCHANT R, BANAT IM (2014) **Protocols for the detection and chemical characterisation of microbial glycolipids**. In. *Springer Protocols Handbooks*. Humana Press, pp 1–32. doi:10.1007/8623_2014_25.

- SOBERÓN-CHÁVEZ, G.; LEPINE, F.; DÉZIEL, E. **Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa***. *Appl Microbiol Biotechnol.*, v. 68, p. 718-25, 2005.
- SOBERÓN-CHÁVEZ, G.; MAIER, R.M. **Biosurfactants: A general Overview**. Biosurfactants. Ed. Gloria Soberón-Chávez, *Microbiology Monographs*, Springer: Berlin: p. 1-8, 2011.
- SOLAIMAN, D. K. Y., ASHBY, R. D., GUNTHER, N. W. IV, AND ZERKOWSKI, J. A. (2015). **Dirhamnose-lipid production by recombinant nonpathogenic bacterium *Pseudomonas chlororaphis***. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 4333– 4342. doi: 10.1007/s00253-015-6433-4
- SQUIRES, C. H., RETALLACK, D. M., CHEW, L. C., RAMSEIER, T. M., Schneider, J. C., & Talbot, H. W. (2004). **Heterologous protein production in *P. fluorescens***. *BioProcess Int*, 2(58), e58.
- STOIMENOVA E, VASILEVA-TONKOVA E, SOTIROVA A, GALABOVA D, LALCHEV Z. **Evaluation of different carbon sources for growth and biosurfactant production by isolated from wastewaters**. *Z Naturforsch C*. 2009;1-2:96-102.
- SUN, W. J., ZHOU, Y. Z., ZHOU, Q., CUI, F. J., YU, S. L., & SUN, L. (2012). **Semi-continuous production of 2-keto-gluconic acid by *Pseudomonas fluorescens* AR4 from rice starch hydrolysate**. *Bioresource technology*, 110, 546-551.
- SYLDATK, C.; WAGNER, F. Production of Biosurfactants: In: KOSARIC, N.; CAIRNS, W. L.; GRAY, N.C.C. (ed), **Biosurfactants and Biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1987, p. 89-120.
- TAHZIBI, A.; KAMAL, F.; ASSADI, M. M. **Improved production o rhamnolipids by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant**. *Iranian Biomedical Journal*, v. 8, p. 23-31, 2004.
- THANOMSUB, B.; PUMEECHOCKCHAI, W.; LIMTRAKUL, A.; ARUNRATTIYAKORN, P.; PETCHLEELAHA, W.; NITODA, T.; KANZAKI, H. **Chemical structures and biological activities of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* B189 isolated from milk factory waste**. *Biores. Technol.*, v. 98, p. 1149-1153, 2007.

- THOMPSON, L.S., WEBB, J.S., RICE, S.A., KJELLEBERG, S. **The alternative sigma factor RpoN regulates the quorum sensing gene rhII in *Pseudomonas aeruginosa*.** *FEMS Microbiol. Lett.* 220, 187–195, 2003.
- TISO, T., IHLING, N., KUBICKI, S., BISELLI, A., SCHONHOFF, A., BATOR, I., et al. (). **Integration of genetic and process engineering for optimized rhamnolipid production using *Pseudomonas putida*.** *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8:976, 2020.
- TISO, T., SABELHAUS, P., BEHRENS, B., WITTGENS, A., ROSENAU, F., HAYEN, H.; BLANK, L. M. **Creating metabolic demand as an engineering strategy in *Pseudomonas putida*–Rhamnolipid synthesis as an example.** *Metabolic Engineering Communications*, v. 3, p. 234-244, 2016.
- TISO, T., ZAUTER, R., TULKE, H., LEUCHTLE, B., LI, W. J., BEHRENS, B., et al. (). **Designer rhamnolipids by reduction of congener diversity: production and characterization.** *Microb. Cell Fact.* 16:225, 2017.
- TORIBIO, J.; ESCALANTE, A.; SOBERÓN-CHAVEZ, G. **Rhamnolipids Productions in bacteria other than *Pseudomonas aeruginosa*.** *European Journal of Science Technology*, v. 112, p. 1082-1087, 2010.
- TULEVA BK, IVANOV GR, CHRISTOVA NE. **Biosurfactant production by a new *Pseudomonas putida* strain.** *Zeitschrift Fur Naturforschung C*, 57:356–60, 2002.
- VAN BOGAERT, I. N., ZHANG, J.; SOETAERT, W. **Microbial synthesis of sophorolipids.** *Process Biochemistry*, v. 46, p. 821-833, 2011
- VAN HAESSENDONCK, I. P. H. & VANZEVEEREN, E. C. A. **Rhamnolipids in bakery products.** *International application patent(PCT) W. O.* 2004/040984, 2004.
- VARNIER, A.L.; SANCHEZ, L.; VATSA, P.; BOUDESOCQUE, L.; GARCIA-BRUGGER, A.; RABENOELINA, F.; SOROKIN, A.; RENAULT, J. H.; KAUFFMANN, S.; PUGIN, A.; CLEMENT, C.; BAILLIEUL, F.; DOREY, S. **Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to *Botrytis cinerea* in grapevine.** *Plant Cell Environ.*, v. 32, p. 178-193, 2009.
- VIJAYAKUMAR, S. & SARAVANAN, V. **Biosurfactants-Types, Sources and Applications.** *Research Journal of Microbiology*, v. 10, p. 181-192, 2015.

- WANG, Q., FANG, X., BAI, B., LIANG, X., SHULER, P. J., GODDARD, W. A. III, et al. (). **Engineering bacteria for production of rhamnolipid as an agent for enhanced oil recovery.** *Biotechnol. Bioeng.* 98, 842–853, 2007.
- WANG, S.; MULLIGAN, C. N. **Arsenic mobilization from mine tailings in the presence of a biosurfactant.** *Appl. Geochem.*, v. 24, p. 935-938, 2009.
- WANG, X.; GONG, L.; LIANG, S.; HAN, X.; ZHU, C.; LI, Y. **Algicidal activity of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa*.** *Harmful Algae*, v. 4, p. 433-443, 2005.
- WANG, Y., HORLAMUS, F., HENKEL, M., KOVACIC, F., SCHLÄFLE, S., HAUSMANN, R., ... & ROSENAU, F. (). **Growth of engineered *Pseudomonas putida* KT2440 on glucose, xylose, and arabinose: Hemicellulose hydrolysates and their major sugars as sustainable carbon sources.** *GCB Bioenergy*, 11(1), 249-259, 2019.
- WATANABE, S., FUKUMORI, F., NISHIWAKI, H., SAKURAI, Y., TAJIMA, K., & WATANABE, Y. (). **Novel non-phosphorylative pathway of pentose metabolism from bacteria.** *Scientific reports*, 9(1), 1-12, 2019.
- WEI, Q.F.; MATHER, R.R.; FOTHERINGHAM, A.F. **Oil removal from used sorbents using a biosurfactant.** *Biores. Technol.*, v. 96, p. 331-334, 2005.
- WILKES, R. A., MENDONCA, C. M., & ARISTILDE, L. (). **A cyclic metabolic network in *Pseudomonas protegens* Pf-5 prioritizes the Entner-Doudoroff pathway and exhibits substrate hierarchy during carbohydrate co-utilization.** *Applied and environmental microbiology*, 85(1), e02084-18, 2018.
- WILLIAMS, P. **Quorum sensing, communication and cross-kingdom signaling in the bacterial world.** *Microbiol.*, v.153, p.3923–3938, 2007.
- WITTGENS, A., & ROSENAU, F. (). **Heterologous Rhamnolipid Biosynthesis: Advantages, Challenges, and the Opportunity to Produce Tailor-Made Rhamnolipids.** *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 2020
- WITTGENS, A., KOVACIC, F., MÜLLER, M. M., GERLITZKI, M., SANTIAGO-SCHÜBEL, B., HOFMANN, D., et al. (). **Novel insights into biosynthesis and uptake of rhamnolipids and their precursors.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 2865–2878, 2017.

- WITTGENS, A., TISO, T., ARNDT, T. T., WENK, P., HEMMERICH, J., MÜLLER, C., et al. (). **Growth independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic *Pseudomonas putida* KT2440.** *Microb. Cell Fact.* 10:80, 2011.
- WU, J., ZHANG, J., WANG, P., ZHU, L., GAO, M., ZHENG, Z., & ZHAN, X. (). **Production of rhamnolipids by semi-solid-state fermentation with *Pseudomonas aeruginosa* RG18 for heavy metal desorption.** *Bioprocess and biosystems engineering*, 40(11), 1611-1619, 2017.
- WU, J., ZHANG, J., ZHANG, H., GAO, M., LIU, L., & ZHAN, X. (). **Recycling of cooking oil fume condensate for the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* WB505.** *Bioprocess and biosystems engineering*, 42(5), 777-784, 2019.
- XAVIER J. B.; KIM, W.; FOSTER, K. R. **A molecular mechanism that stabilizes cooperative secretions in *Pseudomonas aeruginosa*.** *Molecular Microbiology*, v. 79, n. 1, p. 166-179, 2010.
- YANES ML, BAJSA N () **Fluorescent *Pseudomonas*: a natural resource from soil to enhance crop growth and health**, In: *Microbial models: from environmental to industrial sustainability* Springer Singapore, 323–349, 2016.
- YIN, D. L., BERNHARDT, P., MORLEY, K. L., JIANG, Y., CHEESEMAN, J. D., PURPERO, V., ... & KAZLAUSKAS, R. J. (). **Switching catalysis from hydrolysis to perhydrolysis in *Pseudomonas fluorescens* esterase.** *Biochemistry*, 49(9), 1931-1942, 2010.
- ZHANG, G.; WU, Y.; QIAN, X.; MENG, Q. **Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids.** *J Zhejiang Univ Sci B.* v. 6, p. 725–730, 2005.
- ZHANG, Q.; JU, L.K. **Rhamnolipids as affinity foaming agent for selective collection of b-glucosidase from cellulase enzyme mixture.** *Enzyme Microbial Technol.*, v. 48, p. 175–80, 2011.
- ZHANG, Y.; MILLER, R. M. **Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, p. 2101–2106, 1994.

- ZHANG, Y.; MILLER, R. M. **Effect of Rhamnolipid (Biosurfactant) Structure on Solubilization and Biodegradation of n-Alkanes.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, p. 2247–2251, 1995.
- ZHAO, F., JIANG, H., SUN, H., LIU, C., HAN, S., & ZHANG, Y. (). Production of rhamnolipids with different proportions of mono-rhamnolipids using crude glycerol and a comparison of their application potential for oil recovery from oily sludge. *RSC advances*, 9(6), 2885-2891, 2019.
- ZHAO, F., SHI, R., ZHAO, J., LI, G., BAI, X., HAN, S., et al. (). Heterologous production of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid under anaerobic conditions for microbial enhanced oil recovery. *J. Appl. Microbiol.* 118, 379–389, 2015.
- ZHOU, J., XUE, R., LIU, S., XU, N., XIN, F., ZHANG, W., JIANG, M., & DONG, W. (). High Di-rhamnolipid Production Using *Pseudomonas aeruginosa* KT1115, Separation of Mono/Di-rhamnolipids, and Evaluation of Their Properties. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 245, 2019.
- ZHU, K.; ROCK, C.O. **RhIA converts β -hydroxyacyl-acyl carrier protein intermediates in fatty acid synthesis to the β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate component of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*.** *J. Bacteriol.*, v. 190, p. 3147–3154, 2008.
- ZHU, Y., J. J. GAN, G. L. ZHANG, B. YAO, W. J. ZHU, Q. MENG. **Reuse of waste frying oil for production of rhamnolipids using *Pseudomonas aeruginosa* zju.u1M.** *Journal of Zhejiang University-Science A* 8 (9):1514–1520, 2007.