
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.



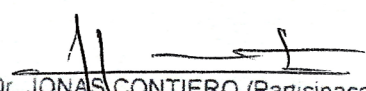
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

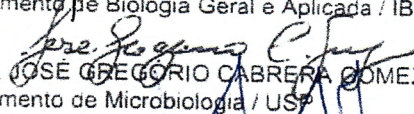
TÍTULO DA TESE: "ESTRATEGIAS UP-STREAM PARA A OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE RAMNOLÍPIDIOS A PARTIR DE FONTES ALTERNATIVAS DE CARBONO: UM ENFOQUE NA LINHAGEM"

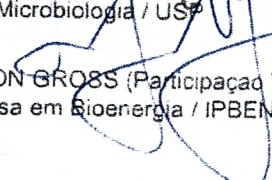
AUTORA: ANA MARIA SALAZAR BRYAM

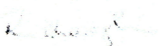
ORIENTADOR: JONAS CONTIERO

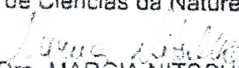
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), área: Microbiologia Aplicada pela Comissão Examinadora:


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^a

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.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Os surfactantes químicos são moléculas conhecidas há longo tempo: o surfactante mais antigo é comumente conhecido como detergente e foi utilizado pela primeira vez há 2000 anos aproximadamente (FARN, 2006). A linha de tempo do desenvolvimento dos surfactantes sintéticos começa nos anos 20's e 30's, com o crescimento de diferentes indústrias como a petrolífera. No entanto, devido ao impacto ambiental que esses surfactantes sintéticos têm no ambiente e com o crescimento da indústria petroquímica e de várias outras indústrias, a elaboração de novos surfactantes especializados está em constante demanda. Em resposta a este desafio, os biossurfactantes surgiram como alternativa viável para diferentes aplicações em diferentes indústrias e gerar baixo impacto ambiental (DEVELTER & LAURYSSSEN, 2010; HEALY *et al.*, 1996; MAKKAR *et al.*, 2011).

Enquanto isso, surfactantes sintéticos com melhor perfil ambiental foram desenvolvidos para o mercado; como os alquil poliglicosídeos, entre outros (LANG, 2003; VAN BOGAERT *et al.*, 2011). No entanto, estas moléculas nem sempre são totalmente baseadas em recursos renováveis ou ainda implicam etapas de síntese química (VAN BOGAERT *et al.*, 2011). Em contraposição, surfactantes produzidos por micro-organismos (biossurfactantes) podem ser produzidos a partir de matérias-primas renováveis ou mesmo de resíduos industriais, além de apresentarem maior biodegradabilidade e uma ecotoxicidade mais baixa (LANG, 2003).

2.1 Biossurfactantes

Os biossurfactantes são um grupo de compostos produzidos por uma grande variedade de micro-organismos. São moléculas anfipáticas com propriedades tensoativas, cujas regiões hidrofílicas e hidrofóbicas permitem a interação das interfaces entre uma parte aquosa e outra não-aquosa numa solução ou sistema complexo (MARCHANT & BANAT, 2012).

Estas moléculas atuam como emulsionantes ou como redutoras da tensão superficial em interfaces com diferentes graus de polaridade (MARCHANT & BANAT, 2012). Normalmente, a parte hidrofóbica dos biossurfactantes contém uma cadeia longa de ácidos graxos, hidróxi-ácidos ou α -alquilo- β -hidróxi-ácidos, enquanto que a

parte hidrofílica pode ser carboidratos, ácidos carboxílicos, amino ácidos, peptídeos cíclicos, fosfatos ou álcoois (PORNUNTHORNTAWEE *et al.*, 2010).

Um aspeto importante dos biossurfactantes é a concentração crítica micelar (CMC), que é a concentração onde se inicia a formação de micelas, que tem sido reportada entre 5-200 mg/L e a massa molar pode variar entre 500-1500 Da (PORNUNTHORNTAWEE *et al.*, 2010). Devido à grande variedade estrutural, estas moléculas podem ser usadas em diferentes ramos da indústria.

Tem sido relatado que os surfactantes biologicamente produzidos geram menos impacto ambiental do que os de origem química, pois são biodegradáveis e apresentam menor toxicidade. Além disso, os biossurfactantes apresentam excelentes propriedades físico-químicas: como a efetividade numa ampla variação de pH e temperatura, atividade superficial e interfacial relacionada à CMC, atividade como emulsificantes e de-emulsificantes e agentes antiadesivos (HENKEL *et al.*, 2012; LOVAGLIO *et al.*, 2011; LOVAGLIO *et al.*, 2014; OLVEIRA *et al.*, 2008; VIJAYAKUMAR & SARAVANAN *et al.*, 2015). A propriedade única e distinta dos biossurfactantes em relação aos surfactantes sintetizados quimicamente é a ampla variedade de substratos a partir dos quais podem ser produzidos, tornando assim os biossurfactantes produtos de grande interesse para aplicação em diferentes indústrias (VIJAYAKUMAR & SARAVANAN *et al.*, 2015).

Os biossurfactantes podem ser classificados de acordo com a sua estrutura química em cinco grandes categorias: (i) glicolipídios, (ii) lipopeptídios e lipoproteínas, (iii) ácidos graxos, fosfolipídios e lipídios neutros, (iv) biossurfactantes poliméricos e (v) biossurfactantes particulados (MAKKAR & CAMEOTRA, 2010; VIJAYAKUMAR & SARAVANAN *et al.*, 2015). Os ramnolipídios são os mais importantes do grupo dos glicolipídios, devido às suas propriedades tenso-ativas; este grupo de biossurfactantes é produzido principalmente por bactérias do género *Pseudomonas* (HENKEL *et al.*, 2012).

2.2 Ramnolipídios

2.2.1 Estrutura e características dos ramnolipídios

Estruturalmente, os ramnolipídios, são constituídos por uma ou duas moléculas de α -L-ramnose unidas a um ou dois β -hidróxi ácidos (SOBERÓN-CHAVEZ & MAIER, 2011). A variedade estrutural dos homólogos de ramnolipídios encontra-se no comprimento da cadeia lipídica que pode variar de C8 a C14, e de acordo com o número de moléculas de ramnose pode ser um mono ou di-ramnolipídio, (Figura 2.1) (AMANI et al., 2013; MARCHANT & BANAT, 2012). As espécies mais abundantes de ramnolipídios, produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*, são α -L-ramnopiranosil- α -L-ramnopiranosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (RL 1 ou Rha-C₁₀-C₁₀) e α -L-ramnopiranosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (RL 3 ou Rha-Rha-C₁₀-C₁₀) (ABDEL-MAWGOUD et al., 2010).

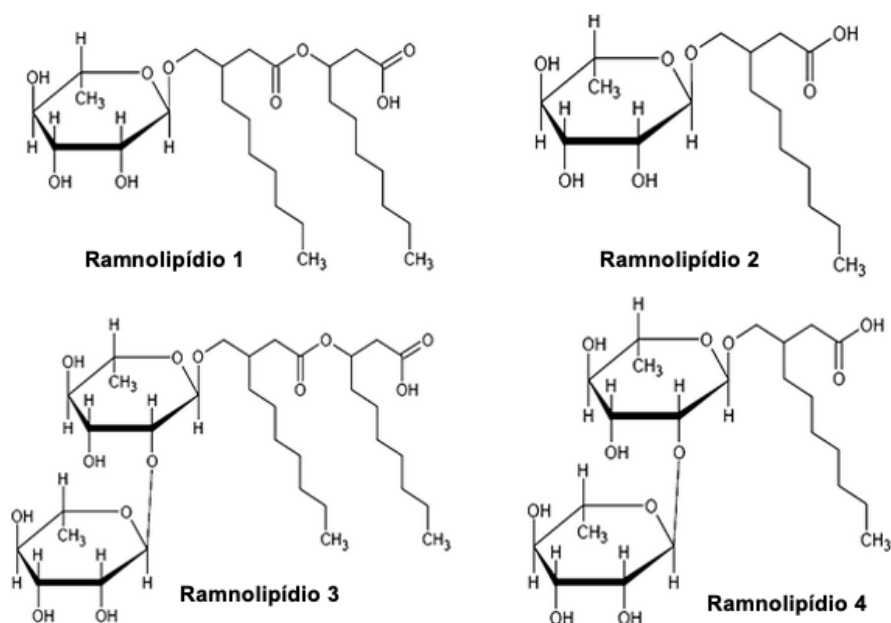


Figura 2.1 Estrutura geral dos ramnolipídios R1-4 de *Pseudomonas aeruginosa*. Modificado de Amani et al., 2013.

Existem mais de 60 espécies de homólogos produzidas por diferentes espécies de *Pseudomonas* (ABDEL-MAWGOUD et al., 2010). A variação na proporção dos homólogos produzidos depende da linhagem, do meio e as condições e duração do processo (MATA-SANDOVAL et al., 1999). Esta variação na composição de

homólogos, influencia nas propriedades físico-químicas dos ramnolipídios (GUERRA-SANTOS *et al.*, 1984; PERFUMO *et al.*, 2006) e na sua aplicabilidade.

2.3 Detecção e caracterização de ramnolipídios

Os rendimentos na produção de ramnolipídios podem ser determinados usando uma gama de métodos diferentes; estes incluem o uso de métodos gravimétricos simples, métodos colorimétricos, métodos infravermelhos e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (MARCHANT *et al.*, 2014).

O método gravimétrico é um método direto e fácil utilizado para medir o peso total do ramnolipídio extraído. Ele simplesmente envolve extrair e purificar o ramnolipídio e depois medir seu peso. A desvantagem deste método é que não fornece nenhuma indicação da pureza do produto "bruto", a extração por solventes pode ser utilizada para remover a maioria das impurezas, porém, alguns ácidos graxos podem não ser removidos (MARCHANT & BANNAT, 2014) e assumidos dentro do rendimento total da produção.

As técnicas qualitativas indiretas usadas para a detecção de ramnolipídios são metodologias indiretas dentre as mais utilizadas está a placa de ágar de azul de metileno (CTAB), que permite a detecção semi-quantitativa em placa da produção de moléculas anfifílicas aniônicas por bactérias inoculadas neste médio de cultura (SIGMUND & WAGNER 1991), esta técnica é utilizada para realizar seleção e triagem de micro-organismos produtores de biossurfactantes (SOBERON-CHAVEZ & MAIER, 2011).

Outra técnica que utiliza os princípios da microbiologia clássica é a inoculação de micro-organismos em placas de ágar sangue para análise da hemólise dos eritrócitos, no entanto, o resultado da aparição do halo por hemólise devido à presença de ramnolipídios, pode ser um falso positivo, pois pode haver secreção de proteases ou lipases (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2010).

Embora os mecanismos relacionados à atividade hemolítica dos ramnolipídios não sejam totalmente compreendidos, a porção hidrofóbica parece ser a responsável no processo da perturbação das membranas dos glóbulos presentes no ágar (MANAARGADOO-CATIN *et al.*, 2016). Este método é ideal para a seleção de

mutantes com maior atividade hemolítica, já que o aumento do diâmetro da zona clara ao redor da colônia é facilmente visível. Contudo, este tipo de técnicas deveria ser utilizado unicamente para a triagem de cepas produtoras de biossurfactantes e não como um resultado conclusivo.

A atividade de superfície é uma das características mais importantes dos biossurfactantes e, portanto, pode ser usada como ponto de partida para a determinação qualitativa e semi-quantitativa dos ramnolipídios. O teste indireto de colapso da gota, tem sido utilizado para a seleção e triagem de micro-organismos produtores de biossurfactantes em geral, o colapso de uma gota de óleo é analisado ao colocar uma gota de sobrenadante da cultura em questão, se apresentar produção de ramnolipídios, a gota da cultura se espalhara sobre o óleo (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2010). A medida direta da tensão superficial mediante o ensaio do anel de De Nöuy, permite determinar a presença de ramnolipídios aproveitando umas das suas propriedades físico-químicas mais importantes, a redução da tensão superficial (PORNUNTHORNTAWEE *et al.*, 2010).

Já como técnicas quantitativas existem várias estratégias que atualmente são as mais utilizadas. Os métodos colorimétricos medem a quantidade de açúcar pentose usando um ensaio espectrofotométrico, utilizando antrona, orcinol ou 6-deoxihexose (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2010; SMYTH *et al.*, 2014). É uma medida indireta da quantificação de ramnolipídio, pois está associada a uma curva padrão para a quantificação de ramnose (IORERE *et al.*, 2017).

Geralmente, na produção de ramnolipídios são encontradas misturas de mono e di-ramnolipídios, para aplicações industriais e ambientais, sendo de grande importância quantificar e caracterizar a composição dos homólogos produzidos (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2010). Os métodos cromatográficos permitem a detecção e separação dos congêneres de ramnolipídios, a separação cromatográfica em camada delgada (TLC) e a cromatografia em coluna de sílica gel, ambos processos utilizam um sistema de solventes na fase móvel para facilitar a interação dos diferentes homólogos com a fase estacionária (SAMADI *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2019).

Tanto a cromatografia de alta eficiência (HPLC) quanto a cromatografia de ultra eficiência (UPLC) são técnicas bastante utilizadas para análise de ramnolipídios,

geralmente acopladas a detectores ultra-violeta (UV), detector universal de Aerosol carregado (CAD) ou detecção por espalhamento de luz evaporativo (ELSD) (BEHRENS et al., 2016; INVALLY et al., 2019; MATA-SANDOVAL et al., 1999).

Com as técnicas cromatográficas a separação de mono e di-ramnolipídios também é efetiva, entretanto, não é possível elucidar os congêneres presentes no meio de cultura. Estas técnicas acopladas à espectrometria de massa (HPLC/MS; UPLC/MS) permite uma caracterização mais precisa dos homólogos em relação ao seu tempo de retenção e a massa espectral (ABDEL-MAWGOUD et al., 2010; RUDDEN et al., 2015).

A técnica de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier com modo de reflexão total atenuada (ATR-FTIR), tem sido utilizada para caracterizar e quantificar misturas complexas de homólogos de ramnolipídios (LEITERMANN et al., 2008; ZHAO et al., 2019), esta técnica permite fazer uma análise rápida em soluções aquosas identificando os grupos funcionais dos ramnolipídios.

A ressonância magnética nuclear (NMR) mede a absorção da radio frequência de vários átomos expostos num campo eletromagnético é utilizada para realizar análises estruturais de congêneres purificados (ABDEL-MAWGOUD et al., 2010). As informações estruturais são obtidas a partir do espectro com base nos deslocamentos químicos, constantes de acoplamento e análise de curvas integrais (MIAO et al., 2014).

2.4 Metabolismo e biossíntese dos ramnolipídios em *Pseudomonas aeruginosa*

Os mecanismos envolvidos na biossíntese dos ramnolipídios em *P. aeruginosa* é complexa. Primeiramente, a dTDP-L-ramnose e os β -ácidos graxos hidróxicos, precursores da porção hidrofílica e hidrofóbica respectivamente, são gerados a partir das vias metabólicas centrais dos carboidratos, da via biossintética dos ácidos graxos *de novo* e do catabolismo dos lipídios via β -oxidação (ABDEL-MAWGOUD et al., 2014; SYLDATK & WAGNER, 1987; SUH et al., 2019; ZHU & ROCK, 2008).

Segundo Sylatk & Wagner (1987) existem quatro possibilidades para a biossíntese do biossurfactante ocorrer:

1. A síntese de *novo* do carboidrato e do lipídeo
2. Síntese de *novo* da porção do carboidrato e síntese da porção lipídica partindo do substrato
3. Síntese de *novo* da porção lipídica e síntese da porção do carboidrato partindo do substrato
4. Síntese do carboidrato e do lipídeo por vias independentes partindo do substrato utilizado

Por outro lado, os ramnolípídeos, em geral, são sintetizados quando as células bacterianas entram na fase estacionária de crescimento. Em *P. aeruginosa*, isto resulta em um processo de regulação estritamente controlado (Figura 1.2) que desencadeia a produção de ramnolípídeos determinado por uma rede complexa e intrincada (MÜLLER & HAUSMANN, 2011).

Esta rede inclui o sistema *Las*, a cadeia de ramno-aciltransferase (Rhl), os sistemas de sinais por quinolonas de *Pseudomonas* (PQS), tudo isso integrado ao *Quorum sensing* (QS), à produção de outros fatores de virulência, assim como os fatores sigma alternativos RpoS e RpoN (ABDEL-MAWGOUD et al., 2014; AGUIRRE-RAMIREZ et al., 2012; OLVERA et al., 1999).

Não há estudos conclusivos sobre a função fisiológica específica dos ramnolípídeos no metabolismo de *P. aeruginosa*. Devido às propriedades emulsionantes e de natureza anfipática, atribui-se a função de produção devido a necessidade de captação de substratos pouco solúveis como os hidrocarbonetos (ABDEL-MAWGOUD et al., 2010). Na revisão da literatura feita por Chrzanowski et al. (2012) é relatado que os ramnolípídeos ajudam a incrementar o contato da célula com a superfície, aumentando a eficiência de degradação do substrato.

Ao serem liberados para o espaço extracelular, os ramnolípídeos ajudam a controlar a hidrofobicidade da célula para a fixação ou desprendimento da célula em diferentes substratos, assim como o aumento e a modulação da motilidade da bactéria (ABDEL-MAWGOUD et al., 2010; BRINKMAN et al., 2001; DÉZIEL et al., 2003).

Caiazza *et al.* (2005) relataram que o deslocamento das bactérias da espécie *P. aeruginosa* esta modulado pela biossíntese de ramnolipídios. Observou-se que os mutantes com deleção nos genes *rhlB* e *rhlC*, essenciais para a síntese de mono e di-ramnolipídios, apresentam um padrão de movimentação alterada caracterizada por *tendrils* – que corresponde a uma forma de movimentação irregular, que permite a comunicação entre grupos celulares, entretanto com menor eficiência do que na presença de ramnolipídios.

A produção de ramnolipídios está ligada ao controle da translocação da célula e ao aumento do contato celular com a superfície e com outras células, o que é controlado pelo sistema *rhl* (RASAMIRAVAKA *et al.*, 2015). Como relatado por Pamp & Tolker-Nielsen (2007), os ramnolipídios estão envolvidos na formação de micro colônias e na formação de estruturas tridimensionais que permitem a formação dos biofilmes.

Além de estarem relacionados à captação de fonte de carbono hidrofóbicas e motilidade de *P. aeruginosa*, os ramnolipídios têm sido reportados como auxiliadores na formação de biofilmes e no QS destas bactérias (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2010). Estes dois processos são afetados pela modulação da motilidade, a produção de ramnolipídios e de lecitinas (RASAMIRAVAKA *et al.*, 2015).

O QS é caracterizado pela produção de autoindutores (AIs) que se acumulam ao aumentar a densidade populacional promovendo a interação celular e a ativação dos reguladores transcricionais (WILLIAMS, 2007). Os quatro sistemas de QS da *P. aeruginosa* foram inicialmente identificados por suas funções na regulação da produção de fatores de virulência (Figura 2.2). Esses sistemas são: Las, sistema de sinais de quinolonas de *Pseudomonas* (PQS), sistema integrado de sinais de *quorum* (IQS) e Rhl (LEE & ZHANG, 2015).

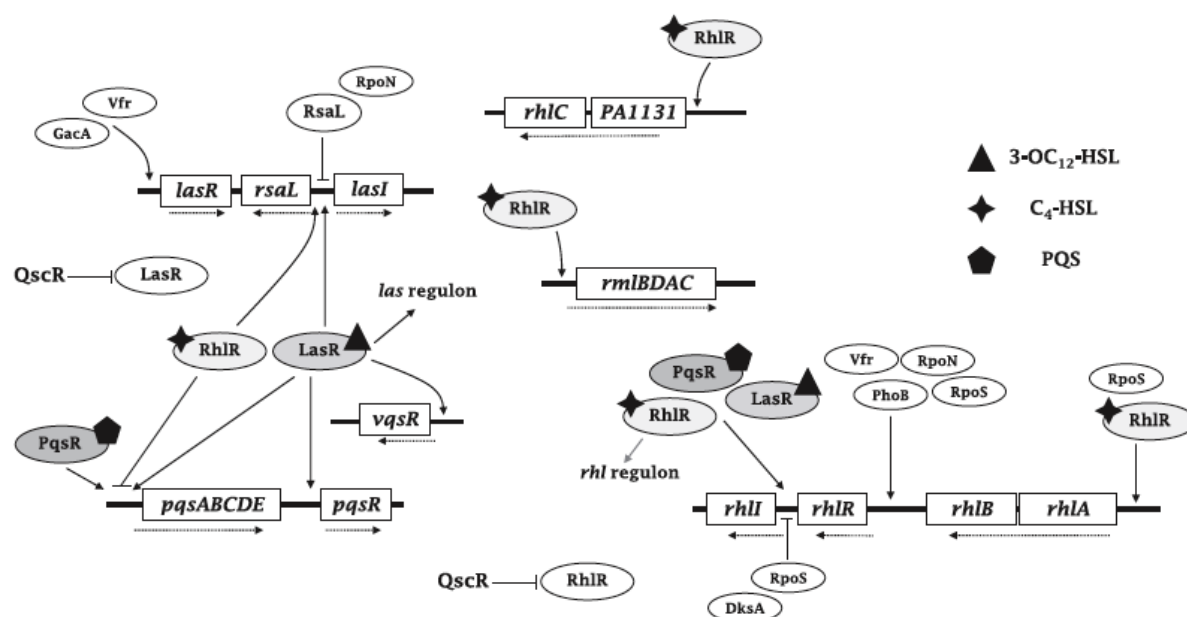


Figura 2.2 Regulação da biossíntese de ramnolipídios (SUH et al., 2019).

Os sistemas Las e Rhl são regulados por N-acil-homoserina-lactonas (AHL) e a regulação dos sistemas PQS e IQS é mediada por alquil-4-quinolonas (AQs). Quando complexadas, essas moléculas, reconhecem a resposta do regulador e induzem a expressão do sistema de QS (SUH et al., 2019).

Além disso, estão os reguladores globais do QS em *P. aeruginosa*, começando pela proteína reguladora do receptor cAMP, Vfr que se encontra no topo da cascata junto com o sistema regulador global de dois componentes GacA/GacS, controlando a expressão de LasI/LasR, que por sua vez, controla o sistema RhlI/RhlR (ALBUS et al., 1997; REIMMANN et al., 1997). Já RsaL, atua como regulador transcripcional negativo de *lasI* (BERTANI & VENTURI 2004).

O fator RpoN, associado à limitação de nitrogênio, foi caracterizado como ativador da expressão de *rhlI* (THOMPSON et al., 2003), o fator RpoS junto com DksA (regulador pos-transcricional) regula negativamente o sistema de AHL, através da repressão da expressão de *rhlI* (MULLIGAN & GIBBS, 1989; SCHUSTER et al., 2006; JUDE et al., 2003). VqsR, é um regulador transcripcional de *lasI*; é uma proteína membro da família LuxR e interfere na expressão do seu homólogo, QscR que regula negativamente a expressão de LasR (JUHAS et al., 2004; LIANG et al., 2012; LEDGHAM et al. 2003). Outro regulador é PhoB que estimula a expressão *rhlR* em

condições de limitação de fosfatos através do QS nos sistemas dependentes de quinolonas (JENSEN et al., 2006).

A hierarquia regulatória do QS começa com o sistema Las (LEE & ZHANG, 2015). O complexo LasR/N-3-oxododecanoil-homoserina-lactona (OdDHL) ativa a transcrição dos genes *lasI*, *rhIR*, *rhII*, *pqsR* e *rsaL* (Figura 2.2). A ativação transcricional de *lasI* leva ao aumento da produção de OdDHL criando um loop de feedback positivo no sistema Las (DEZIEL et al., 2004).

No sistema PQS, o sistema de enzimas PqsABCD e PhnAB envolve a síntese de 2-heptil-4-quinolonas (HHQ), enquanto PqsH converte HHQ em PQS (LIN et al., 2018). A expressão do regulador PqsR é ativada por PQS que por sua vez, ativa e regula a expressão de vários de genes relacionados a fatores de virulência, incluindo os ramnolipídios (SCHUSTER & GREENBERG, 2006; GARCIA-REYES et al., 2020).

Assim como o sistema PQS, o sistema IQS é um sistema de comunicação célula a célula dependente de quinolona, a 2-(2-hidroxifenil) -tiazol- 4-carbaldeído. O IQS é sintetizado pelos produtos genéticos da síntese peptídica não ribossomoal do operon *ambBCDE*. A regulação deste sistema é controlada pelo sistema Las sendo também fosfato dependente (JENSEN et al., 2006; LEE et al., 2013).

No sistema Rhl de QS, o *rhII* é responsável pela síntese do AI, N-butanol-L-homoserina lactona (C₄HSL) que se une à proteína RhIR e a torna ativa. O complexo RhIR–C₄HSL reconhece as caixas Las; ativa o operon *rhIAB* e desencadeia a transcrição de ramnosiltransferases (Figura 1.2) (OCHSNER & REISER., 1995).

As três enzimas que catalisam a produção de ramnolípidos a partir dos precursores são codificadas pelo operon *rhIAB* e pelo gene *rhIC* (ABDEL-MAWGOUD et al., 2014). A enzima RhlA catalisa a síntese dos dímeros de ácidos graxos e HAA, transformando as moléculas de β -hidroxiacil-ACP em HAA. A enzima RhlB do operon *rhIAB*, é uma proteína catalítica que promove a união de dTDP-L-ramnose à cadeia de acil-ramnolipídio (OCHSNER et al, 1995). RhlC catalisa a transferência de dTDP-L-ramnose para os mono-ramnolipídios já existentes (Figura 2.3).

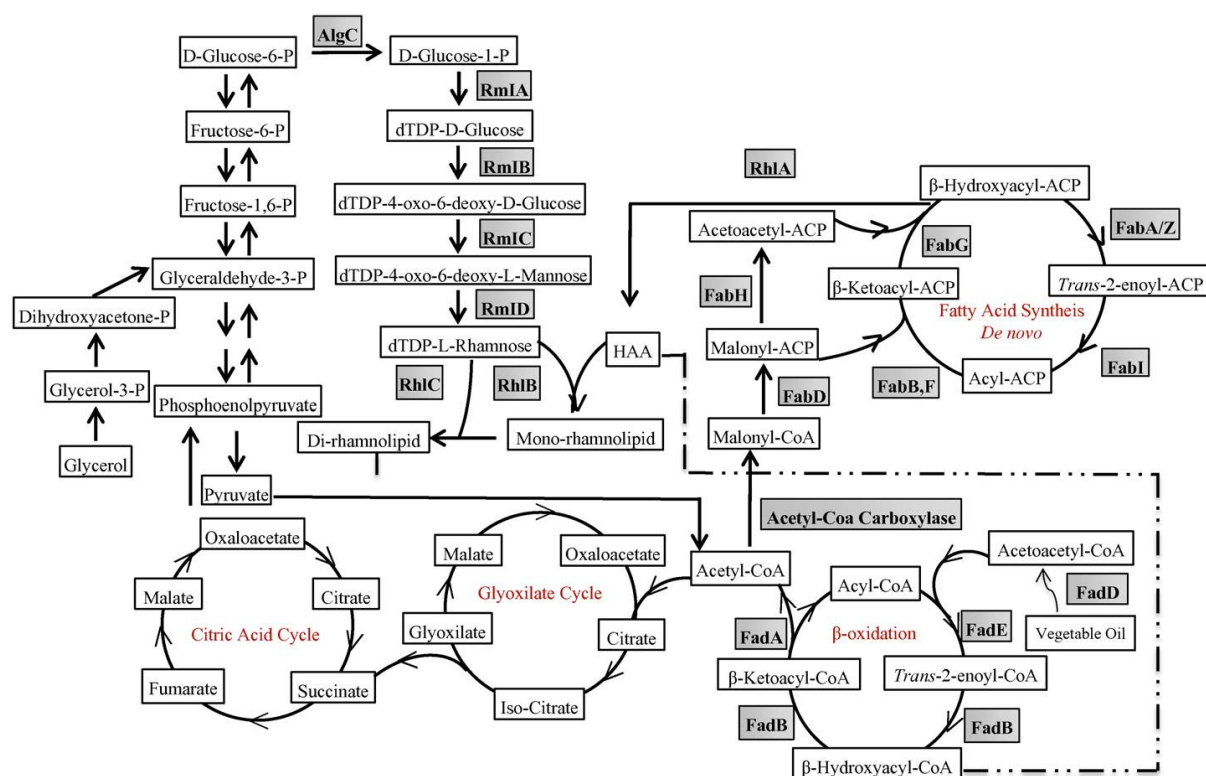


Figura 2.3 Visão geral das vias metabólicas envolvidas na biossíntese de ramnolipídios tendo como precursores fontes hidrofílicas como glicerol e glicose e hidrofóbicas como óleo vegetal (LOVAGLIO et al., 2015).

Nos estudos de Déziel *et al.* (2003) foi observado que os mutantes para *rhIA* não expressavam RhIA nem RhIB, não havendo produção de ramnolipídios. Porém, quando expressado *rhIA*, houve produção de ácidos 3-hidroxialcanóicos (HAA), demonstrando que estes HAA são precursores na biossíntese de ramnolipídios e apresentam propriedades tenso-ativas. Estes estudos levaram à conclusão que RhIA é provavelmente uma transacilase e segundo Zhu & Rock (2008), o substrato preferencial desta enzima é β -hidroxiacil-ACP, desviando-o da biossíntese de ácidos graxos para produção de HAA.

Após o primeiro modelo genético descrito para a produção de ramnolipídios, foi reportado que o gene *rhIC* codifica para a proteína RhIC cuja função é a transferência de L-ramnose para cadeias de polímeros (RAHIM *et al.*, 2001). Este gene está localizado em um operon diferente ao de *rhIAB*. Porém os dois operons estão conectados e requerem o fator σ^{54} , que codifica para a ramnosiltransferase envolvida na produção dos di-ramnolipídios de *Pseudomonas aeruginosa*. Os mutantes para este gene, só tem a capacidade de produzir ramnolipídios com uma molécula de ramnose (RAHIM *et al.*, 2001).

A síntese de *novo* da porção lipídica ocorre pela via de síntese de ácidos graxos tipo II (FAS II) (Figura 2.3), *Pseudomonas aeruginosa* tem a mesma maquinaria enzimática que *E. coli* para realizar este processo (HOANG & SCHWEIZER, 1999). Quando não ocorre a síntese de novo, o processo para metabolizar o substrato e fazer a conversão em lipídeos é a β -oxidação, que está relacionada a substratos hidrofóbicos e depende do número de carbonos do substrato (Figura 2.3) (HORI *et al.*, 2011).

Em um estudo realizado por Garcia *et al* (1998), o gene *rhIG* é responsável da síntese da porção lipídica dos ramnolipídios, e Lovaglio (2011) reportou que os mutantes para *rhIG* apresentaram uma redução na produção de ramnolipídios utilizando óleo de girassol como fonte de carbono, o que deixa uma questão sobre o envolvimento deste gene na biossíntese da parte hidrofóbica do biossurfactante.

Contudo, dados mais recentes sugerem que provavelmente a atividade catalítica da enzima FabG é 2000 vezes maior (MILLER *et al.*, 2006; ZHU & ROCK, 2008). Foi demonstrado também que *rhIAB* e *rhIG* são inversamente regulados, pelo que foi concluído que RhlG não é essencial na produção de ramnolipídios (BAZIRE & DUFOUR, 2014).

Enquanto na formação da porção hidrofílica, o precursor, dTDP-L-ramnose pode vir da via de Entner-Doudoroff partindo de um substrato hidrofílico ou da gliconeogênese (Figura 2.3), quando o substrato é hidrofóbico. A formação da dTDP-L-ramnose é derivada de uma série de reações sequenciais que começam com a conversão de D-glicose-6-fosfato em D-glicose-1-fosfato, catalisada por AlgC (OLVERA *et al.*, 1999). A D-glicose-1-fosfato é convertida em dTDP-Lramnose catalizada pelas enzimas RmlA, RmlB, RmlC e RmlD, organizadas em um operon só: *rmlBDAC* (AGUIRRE-RAMIREZ *et al.*, 2012; GIRAUD & NAISMITH, 2000; REIS *et al.*, 2013).

Na biossíntese de ramnolipídios, as rotas metabólicas de outros metabólicos podem interferir, direcionando os fluxos. A fosfoglicomutase AlgC além de possuir um papel muito importante na biossíntese de ramnolipídios (Figura 2.3), está envolvida na produção de alginato, catalisando a interconversão de manose-6-fosfato para manose-1-fosfato (OLVERA *et al.*, 1999). *Pseudomonas aeruginosa* usa dTDP-L-ramnose como o precursor não só na biossíntese dos ramnolipídios (AGUIRRE-

RAMIREZ et al., 2012), também utilizando esta molécula como precursora na biossíntese de lipopolissacarídeo (LPS) (RAHIM et al., 2000), polissacarídeo Psl (BYRD et al., 2009), e flagelina tipo-b (LINDHOUT et al., 2009).

2.5 Produção de ramnolipídios

Apesar das vantagens que os ramnolipídios apresentam por suas propriedades físico-químicas, ainda existe o grande obstáculo de atingir um processo industrial em larga escala eficiente, uma vez que, para produzir uma pequena quantidade desse composto, é necessário grande investimento de energia, reagentes e técnicas para purificação.

A produção de biossurfactantes por fermentação microbiana só poderá substituir os surfactantes sintéticos quando o custo das matérias-primas e do processo for reduzido. O elevado custo da produção de ramnolipídios deve-se principalmente às fases de fermentação e purificação do produto.

O custo de produção de um surfactante sintético varia entre \$1-3/kg, enquanto que uma avaliação técnico-econômica da produção de ramnolipídios, a partir da literatura e patentes que focam este bioprocessos (Moutinho et al., 2020), encontrou-se o preço mínimo de venda de \$59,6/kg, com um produto final 60% puro aproximadamente. Já um produto com um grau de pureza entre 90% - 99% pode ter um custo entre \$1,5-1500/g (DHANARAJAN & SEN, 2014). Por tanto estratégias para aumentar a produtividade e diminuir os custos de manufatura devem ser estudadas e avaliadas.

Em resposta aos custos altos de produção relacionados à baixa produtividade, surgem três estratégias para aumentar o rendimento do biossurfactantes: (1) o desenvolvimento de linhagens mutantes ou recombinantes para o aumento no rendimento do biossurfactantes; (2) a otimização das condições de cultivo para o melhoramento do bioprocessos; (3) A utilização de matérias primas de baixo custo ou resíduos agroindustriais (CHONG & LI, 2018).

2.6 Estratégias up-stream para melhoramento da produção de ramnolipídios

2.6.1 Linhagens mutantes e recombinantes

A genética das bactérias produtoras é um fator importante que afeta o rendimento de produção dos ramnolipídios, pois a capacidade de produzir o metabolito é conferida pelos genes do organismo. Além das linhagens naturais produtoras de biossurfactantes, algumas cepas mutantes e recombinantes com características melhoradas para a produção de biossurfactantes são relatadas na literatura (CHONG & LI, 2017; IORERE et al., 2017; WITTGENS & ROSENAU, 2020).

O melhoramento de linhagens através de mutação randômica tem sido utilizado para aumentar a produção de ramnolipídios. A inserção de transposons em uma linhagem de *P. aeruginosa* para a assimilação de hidrocarbonetos e produção de ramnolipídios foi descrita por Koch *et al.* (1991), cuja mutante produziu o dobro de ramnolipídios em comparação com a cepa selvagem. Lovaglio (2011), gerou um banco de mutantes por inserção do transposon Tn5, a linhagem mutante aumentou em 70% a produção de ramnolipídios usando meio livre de cálcio e óleo de girassol como fonte de carbono.

O uso de agentes mutagênicos químicos foi descrito por Tahzibi *et al.* (2004), os autores utilizaram N-metil-N'-nitro-N-nitroguanidina como agente mutagênico que aumentou a produção de ramnolipídio 10 vezes com respeito ao parental.; LIN et al., 1998) e agentes mutagênicos físicos (IQBAL et al., 1995; MULLIGAN & GIBBS, 1989). A radiação gama também tem sido utilizada como uma estratégia para gerar cepas de *P. aeruginosa* hiperprodutoras que em relação a linhagem selvagem aumentaram a produção entre 1,5 e 3 vezes (EL-HOUSSEINY & GHADIR, 2017; IQBAL et al.1995).

P. aeruginosa é até o momento, a linhagem com produtividades mais altas de entre 74–112 g/L de ramnolipídio (GIANI et al., 1997). Portanto, a estratégia de usar cepas recombinantes é uma abordagem favorável para evitar patogenicidade e sistemas complexos de regulação metabólica (HENKEL et al., 2017).

Diante disso, as estratégias para produção heteróloga estão baseadas na criação de sistemas de produção artificial usando os genes da biossíntese, *rhlAB(C)*,

de produtores naturais de ramnolipídios (TISO et al., 2017). Esta abordagem permite eliminar as vias biossintéticas de outros metabólitos secundários que competem diretamente pelos precursores utilizados na produção de ramnolipídios, como o ácido poli-hidroxicanoico (FUNSTON et al., 2017).

A expressão heteróloga dos genes *rhl* tem sido reportados em *E. coli* (CABRERA-VALLADARES et al. 2006; OCHSNER et al., 1994), *S. cerevisiae* (BAHIA et al., 2018), *Cellvibrio japonicus* (HORLAMUS et al., 2018), *P. chloraphis* (SOLAIMAN et al., 2015), *P. fluorescens* (OCHSNER et al., 1995), *P. oleovorans* (OCHSNER et al., 1995), *P. stutzeri* (ZHAO et al., 2015), *P. putida* (CHA et al. 2008; OCHSNER et al., 1995; WITTGENS et al., 2011; TISO et al., 2016; CAO et al., 2012) e *P. taiwanensis* (TISO et al., 2017).

Uma vantagem da produção em linhagens recombinantes é a possibilidade de dissociar a produção do crescimento (TISO et al., 2017) e como resultado a produção de ramnolipídios está em taxa específica constante usando *P. putida* como descrito por Wittgens et al. (2011). Associado a esta estratégia, diferentes promotores como os promotores *tac* e *lac* induzíveis (BEUKER et al., 2016; TISO et al., 2020; WITTGENS et al., 2017) e sistemas de expressão como o T5 e T7 têm sido estudados (WANG et al., 2007; HAN et al., 2014).

2.6.2 Ômicas e metabolismo

A superprodução de um determinado metabólito depende do entendimento das vias metabólicas associadas à sua biossíntese e ao seu comportamento *in vivo*, isto permite o desenvolvimento de estratégias de engenharia metabólica e bioinformática (MÜLLER et al., 2011; REIS et al., 2013; D'ORTH et al., 2010). Para conseguir o melhoramento do processo de biossíntese de ramnolipídios, é necessário conhecer e entender os processos de regulação metabólica durante o bioprocessamento sob determinadas condições (MÜLLER et al., 2011).

Técnicas de genômica e transcriptômica, proteômica e fluxômica permitem conhecer como os processos de regulação ocorrem e como são as respostas dos micro-organismos a condições como estresse oxidativo. *P. aeruginosa* PAO1, que está completamente sequenciada (STOVER et al., 2000) e com seus genes anotados (WINSOR et al., 2009) abre todas as possibilidades para fazer abordagens racionais que permitam desvendar mecanismos regulatórios e de interação entre genes e

proteínas. A quantificação da expressão dos genes relacionados à produção de ramnolipídios é feita por q-PCR e RT-qPCR (PERFUMO *et al.*, 2013) com o intuito de entender a regulação e padrões de expressão. Utilizando estas técnicas, a mudança na expressão dos genes de ramnolipídio tem sido relatada em função de efeito dos íons de Fe^{2+} e Fe^{3+} (SHATILA *et al.* 2020), assim como a variação na expressão dos genes *rhIB* e *rhIC* utilizando glicose e glicerol como fonte de carbono (FUNSTON *et al.*, 2016) e diferentes fontes de sulfato (ISMAIL *et al.*, 2014).

Do ponto de vista da proteômica, a espectrometria de massas, MALDI-TOF/TOF, tem sido utilizada para elucidar a expressão de proteínas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo e relacionadas à produção de ramnolipídios (PACHECO *et al.*, 2012; REIS *et al.*, 2010), isto com o objetivo de desenvolver estratégias para maximizar a produção do metabólito desejado em relação aos outros fatores de virulência (REIS *et al.*, 2013; LECOUTERE *et al.*, 2012).

A fluxômica é uma ferramenta da engenharia metabólica que permite a otimização do rendimento e da bioconversão do substrato no produto de interesse através da análise de fluxo metabólico. Esta ferramenta pode ser usada para quantificar fluxos metabólicos intracelulares usando as concentrações de metabólitos extracelulares em combinação com a estequiometria das reações intracelulares (PROVOST & BASTIN *et al.*, 2004). A estequiometria gerada com a análise de fluxo, impõe constantes que não requerem parâmetros cinéticos que podem ser difíceis de calcular, o que faz esta abordagem apropriada para estudos que precisam ter em conta diferentes perturbações como tipos de substrato e maquinaria genética (D ORTH *et al.*, 2010).

A análise de fluxo metabólico facilita a detecção de ramificações nas vias metabólicas, que podem ser direcionados para produção do metabólito desejado. Tiso *et al.* (2016) usaram a análise de fluxo metabólico em *Pseudomonas putida* para desenvolver uma estratégia baseada na capacidade do micro-organismo de redirecionar o fluxo para produção de ramnolipídios, focando no conceito “driven-by-demand”.

Outro cenário estudado com o mesmo micro-organismo é no que diz respeito ao metabolismo dos polihidroxialcanoatos (PHAs), pois este metabolismo tem muita influencia na sincronização do metabolismo global do micro-organismo (ESCAPA *et*

al., 2012). Beckers *et al.* (2016) realizaram a análise de expressão genica e de fluxos metabólicas na produção de PHAs usando glicerol como fonte de carbono cujos resultados aportam no desenvolvimento de linhagens superprodutivas de PHAs.

Esta ferramenta tem sido utilizada para o estudo de *Pseudomonas aeruginosa* pois é um micro-organismo patogênico e o entendimento do seu metabolismo é de grande importância, principalmente na elucidação da síntese dos fatores de virulência (LASSEK *et al.*, 2016). Já Satya Eswari & Venkateswarlu. (2016), avaliariam os fluxos de *P. aeruginosa* na produção de ramnolipídios, após realizar um processo de evolução diferencial como método de otimização. Por outro lado, Dulcey *et al.* (2019) fizeram uma mutagênese semi-razional da enzima RhIA de *P. aeruginosa*, o que mostrou resultados promissórios para encontrar pontos-chaves para modular a atividade da enzima e a produção de diferentes homólogos de ramnolipídios.

Por outro lado, a adaptação do micro-organismo ao meio favorece a produção do metabolito desejado, a evolução adaptativa realizada em laboratório (Adaptive Laboratory Evolution - ALE) é uma ferramenta que permite aumentar o *fitness* de um micro-organismo, por meio de culturas em série para um certo número de pressões ambientais com o intuito de desenvolver novas funções biológicas, levando em consideração as mudanças que foram favoráveis durante o processo evolutivo (KAWECKI *et al.*, 2012).

A ALE tem sido usada para aprofundar os conceitos de evolução molecular e mudanças adaptativas. *E. coli* é um dos micro-organismos que tem sido mais estudados neste campo, devido ao seu curto período de geração, além de ser um modelo para vários outros estudos de biologia celular e molecular (ELENA & LENSKI, 2003; LA CROIX *et al.*, 2017).

O ALE tem sido usado para melhorar a utilização de substratos não convencionais para melhorar a produtividade de produtos biotecnológicos (PORTNOY *et al.*, 2011). Consequentemente, a evolução adaptativa tem se tornado uma ferramenta útil para os processos biotecnológicos, pois permite ativar ou desativar rotas, através da adaptação dos organismos ao meio (DRAGOSITS & MATTANOVICH, 2013).

2.6.3 Uso de substratos alternativos: Resíduos agroindustriais

Uma das vantagens que os biossurfactantes apresentam frente aos surfactantes sintetizados quimicamente, é a ampla variedade de fontes de carbono e nitrogênio que podem ser utilizadas para a sua produção. O uso de matérias primas convencionais puras, como açúcares ou óleos vegetais competem em diferentes cadeias de produção como as de produção de alimentos para humanos e animais (HENEKEL et al., 2014).

As matérias primas de baixo custo são uma opção interessante para a redução dos custos de produção dos ramnolipídios. Em geral, estes tipos de substratos, com menor grau de pureza, são menos onerosos e geralmente são facilmente consumidos pelos micro-organismos. De acordo com Henkel *et al.* (2012), o uso de matérias primas de baixo custo ou resíduos industriais podem aumentar o rendimento na produção do biossurfactante.

Vários tipos de fontes de carbono para produção de ramnolipídios, tanto solúveis como insolúveis em água têm sido utilizadas. No entanto, as fontes de carbono hidrofóbicas, como óleos vegetais, têm sido mais efetivas na produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* (MÜLLER *et al.*, 2012).

Substratos com altos conteúdos de açúcar e que são resíduos da agroindústria como o melaço de cana de açúcar, melaço de beterraba, melaço de soja, soro de leite e diferentes polpas e cascas (DUBEY & JUWARKAR, 2001; GEORGE et al., 2009; KASKATEPE et al., 2017; NITSCHKE et al., 2004; PATOWARY et al., 2016; RASHEDI et al., 2005a) têm sido empregados na produção de ramnolipídios. Esses substratos são complexos e apesar de terem pelo menos 40% de açúcar na sua composição, possuem outros resíduos como proteínas, aminoácidos, lipídios (TAN & LI, 2018) que podem tanto estimular quanto dificultar a síntese deste biossurfactante ou inibir o crescimento do micro-organismo.

Do aproveitamento da cana de açúcar, além do melaço, a vinhaça é um resíduo comum da produção de bioetanol (FERNANDES et al., 2017), e contém também um teor considerável de açúcar. Naspolini et al. (2017) reportaram um rendimento de 2,7 g/L de ramnolipídios utilizando este resíduo. A bioconversão da vinhaça como em produtos com valor agregado, como o biossurfactantes, permite gerar uma solução ao impacto ambiental relacionado ao descarte deste resíduo.

Águas residuais de destilarias e outro efluentes de processamento de matérias primas, são outro exemplo de resíduos de grande fluxo, que são difíceis e caros de descartar devido a seu alto teor de matéria orgânica e inorgânica e alta acidez. Águas residuais de destilaria foram utilizadas apresentando resultados favoráveis na produção de ramnolipídios pela *P. aeruginosa* BS2 (DUBEY & JUWARKAR, 2001) e GIM32 (LI et al., 2011), com rendimentos de 0,91 e 2,6 g/L, respectivamente.

Além disso, resíduos de cultivos como o bagaço de cana, farelo, palha de trigo, palha de arroz, casca de soja, milho e arroz, têm sido utilizados para na produção de ramnolipídios (PRABU et al., 2015;). Nalini et al. (2018) utilizaram torta de óleo de mahua na produção de ramnolipídio por *Serratia rubidae*, em fermentação em estado sólido, obtendo um rendimento alto na produção e um ramnolipídio que apresentou eficácia em aplicação como biocontrolador de praga.

A fermentação em estado semi-sólido utilizando farelo de trigo e de colza, além de apresentar resultado promissórios na produção econômica do biossurfactante, evidenciou a aplicabilidade deste tipo de matrizes junto com ramnolipídio na solubilização de metais pesados em solução aquosa (WU et al., 2017). O bagaço de cana e farelo de trigo como matriz sólida, junto com óleo de girassol e glicerol como fonte de carbono tem um rendimento de 46 g/L (NETO et al., 2008), comparável aos rendimentos de fermentações submersas, onde o principal problema é a alta produção de espuma, devido a elevada aeração necessária, requisitando a adição de antiespumante e/ou desenvolvimento de sistemas mecânicos para quebra de espuma.

Óleos de frituras, resíduos de ácidos graxos e de diferentes óleos e borras provenientes do refinamento do óleo, são os resíduos que apresentam melhores rendimentos. Um dos efluentes mais importantes do refinamento dos óleos vegetais são as borras, que possuem uma baixa degradabilidade devido à complexidade na composição e ao alto conteúdo lipídico (HABA et al., 2000). Um estudo onde são comparados diferentes resíduos de óleos como soja, milho, babaçu, semente de algodão e de palma apresentaram resultados promissores utilizando *P. aeruginosa* como linhagem produtora, com rendimentos de 6,8 – 11,7 g/L de ramnolipídios em cultivos em escala laboratorial (De LIMA et al., 2007; NITSCHKE et al., 2005; NITSCHKE et al., 2010). Outro resíduo altamente complexo e com alto teor de nitrogênio é o lodo de óleo de palma, que contém um alto teor de triglicerídeos e

outros ácidos graxos, e que apresentou resultados promissores na produção de ramnolipídios, quando utilizado em conjunto com sacarose ou glicose (NAWAWI et al., 2010).

Os resíduos da indústria de processamento de alimentos representam a maior parte dos resíduos de óleos vegetais. Estes resíduos são utilizados principalmente como suplementos em formulações de ração animal ou para a produção de biodiesel (HENKEL et al., 2014). Vários estudos demonstram que os resíduos de óleo de fritura são substratos adequados para produção de ramnolipídios e as diferentes composições em termos de glicerídeos e ácidos graxos nos óleos usados não prejudicam significativamente o crescimento do micro-organismo ou no rendimento de produção de ramnolipídio (De LIMA et al., 2007; RAZA et al., 2006; WU et al., 2019 ZHU et al., 2007;).

Os rendimentos com este tipo de resíduo variam entre 2 – 9,6 g/L (GÁMEZ et al., 2017; LUO et al., 2013; RAZA et al., 2006), ainda relativamente baixos quando comparados com rendimentos de 10 – 45 g/L de ramnolipídio ao empregar os óleos puros como fonte de carbono (MÜLLER et al., 2012).

2.6.3.1 Glicerol e lignocelulose como substratos hidrofílicos alternativos

2.6.3.1.1 Glicerol como fonte de carbono

Estima-se que a matéria-prima seja responsável por cerca de 10 – 30% dos custos totais de produção em muitos processos biotecnológicos (MUKHERJEE et al., 2006). Além disso, o aproveitamento de resíduos pode contribuir para a redução da poluição ambiental, bem como permitir a valorização econômica dos resíduos que seriam descartados.

A produção de biodiesel está em ascensão, pois é um combustível biodegradável, renovável e com baixa toxicidade. Anualmente, são produzidos 11,2 milhões de toneladas de biodiesel por ano na Europa. Em 2010, nos Estados Unidos, a produção foi de 6,96 milhões de toneladas de biodiesel, já na Ásia e América Latina produz-se aproximadamente 130.000 toneladas por ano e espera-se que este mercado continue crescendo (KHANNA et al., 2012).

Na União Europeia, companhias de produção de biodiesel enfrentam problemas em relação ao excesso de glicerol produzido, já que, sua disposição é dispendiosa economicamente e o seu valor de mercado é baixo. Uma solução a este entrave é a utilização do glicerol como fonte de carbono em processos biotecnológicos, como a produção de biossurfactantes (SILVA *et al.*, 2009).

Como descreve Meher *et al.* (2006), o biodiesel resulta da transesterificação dos triglicerídeos com um álcool monovalente (por exemplo, metanol ou etanol) em ésteres de ácido graxos. O glicerol como resíduo industrial, é um produto secundário da reação; com a produção de 10kg de biodiesel é obtido cerca de 1 kg de glicerol (AMARAL *et al.*, 2009).

O aproveitamento efetivo e econômico do glicerol que resulta da indústria do biodiesel é um enorme desafio. Devido à sua condição de resíduo industrial, o glicerol apresenta muitos contaminantes, os quais impedem seu emprego na indústria química ou farmacêutica (AMARAL *et al.*, 2009; KHANNA *et al.*, 2012).

A síntese de ramnolipídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando glicerol foi descrita por Zhang *et al.* (2005) que obtiveram 15,4 g/L do tensoativo, já Rahman *et al.* (2002), relatam uma produção de 1,77 g/L, enquanto Silva *et al.* (2010) alcançaram 3,5 g/L de ramnolipídios, esses resultados confirmam o potencial da utilização do glicerol como fonte carbono para a produção de biossurfactante.

No entanto, como a produção de ramnolipídios a partir dessa fonte de carbono, varia entre 1,0 e 8,5 g/L e a o coeficiente de bioconversão é relativamente baixa ($Y_{P/S}=0,1-0,15$) quando comparada com a de outros substratos (HENKEL *et al.*, 2012), ainda existe o desafio de otimizar o processo com o intuito de aumentar a produção de ramnolipídios.

2.6.3.1.2 Lignocelulose como substrato emergente

A lignocelulose é uma fonte abundante de carbono que está amplamente disponível. A celulose é derivada principalmente das plantas que são potencialmente cultivadas por seu conteúdo celulosico (TAN & LI, 2018). A lignocelulose é a biomassa vegetal composta de carboidratos poliméricos: celulose (40-60%), hemicelulose (20-40%) e um polímero aromático: lignina (10-24%), como principal componente das paredes celulares das plantas (SHARMA *et al.*, 2017).

A composição da biomassa lignocelulósica varia de uma espécie vegetal para outra e suas fontes, tais como madeiras duras, resinosas e gramíneas. As fontes de biomassa lignocelulósica não só incluem resíduos de culturas e florestas, mas também encontrados em resíduos sólidos municipais, esterco animal, lodo de papel, cultivos para geração de energia e produtos florestais (KUMAR et al., 2021; MATHEWS et al., 2015).

Estima-se que cerca de 10 a 50 bilhões de toneladas de biomassa lignocelulósica são produzidas anualmente em todo o mundo. Assim, este substrato tem um futuro promissor como recurso previsível, viável e sustentável para a geração de produtos de valor agregado (KUMAR et al., 2021).

A ampla gama de estudos no contexto da síntese de produtos com valor agregado utilizando substrato lignocelulósico destacou a possibilidade de produzir uma variedade de biossurfactantes, porém, nem todas as cepas microbianas possuem a maquinaria enzimática necessária para realizar esta bioconversão (HORLAMUS et al., 2018).

O maior rendimento de ramnolipídios é alcançado quando fontes de carbono do tipo hidrofóbico são utilizados, mas o uso de fontes de carbono mais baratas e renováveis como a lignocelulose surge como uma estratégia atraente para reduzir os custos de produção (HENKEL et al., 2014). Entretanto, os processos de pré-tratamento necessários para garantir que os resíduos lignocelulósicos estejam disponíveis para que os micro-organismos sejam capazes de metabolizar estes substratos, são uma contrapartida ao uso desta matéria prima.

A produção de ramnolipídios com *Pseudomonas* sp. pode ser possível utilizando hidrolisados lignocelulósicos não tratados, pois as bactérias deste gênero possuem a capacidade de degradar a lignina e furfurais e outros produtos secundários derivados dos pré-tratamentos (LOPEZ et al. 2003; SHARMA et al., 2017). A maioria dos micro-organismos, utilizados em processos biotecnológicos são incapazes de metabolizar pentoses como xilose e arabinose, que são os principais constituintes da hemicelulose (JEFFRIES, 2005; WATANABE et al., 2019).

A produção de ramnolipídio por *P. aeruginosa* já foi reportada com uso de resíduos da agroindústria e da indústria madeireira, como biomassa hidrolisada de palha de trigo e farelo de milho (PRABU et al., 2015; RANJBAR & HEJAZI, 2019) e

biomassa hidrolisada de bétula e abeto (HRŮZOVÁ et al., 2020). Devido à patogenicidade da *P. aeruginosa*, uma das estratégias para produzir o biossurfactante de forma segura e a escala industrial é uso de outras bactérias produtoras naturais do ramnolipídio, como *Achromobacter* sp. que é capaz de utilizar açúcares provenientes de lignina hidrolisada (JOY et al., 2019; JOY et al., 2020). A produção heteróloga de ramnolipídios usando micro-organismos que possuem a capacidade de metabolizar lignocelulose, como *Cellvibrio japonicus* e *Pseudomonas putida* (HORLAMUS et al., 2018; HORLAMUS et al., 2019; WANG et al., 2019) é igualmente, uma estratégia promissória.

2.7 Aplicações dos ramnolipídios

As aplicações industriais e biotecnológicas dos ramnolipídios são bastante diversas. Por exemplo, têm sido usados para a síntese e estabilização de nanopartículas, preparação de emulsões, como agente anti-aglomerante e dispersante. Além disso, os ramnolipídios, têm propriedades detergentes e são também, uma fonte de ramnose (ABDEL-MAWGOUD et al, 2011).

Os campos de utilização dos biossurfactantes incluem a agricultura, indústria farmacêutica, petrolífera, de alimentos e bebidas, de papel, de metal, de produtos de limpeza, de couro e têxtil (FIECHTER, 1992).

2.7.1 Indústria Petrolífera

São imensamente aplicados na indústria petrolífera, onde são utilizados na produção de petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes. Remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem, e a recuperação melhorada de petróleo também fazem parte dessa gama de aplicações.

O biossurfactante pode ser adicionado ao local onde há contaminação por petróleo e derivados ou ainda o micro-organismo produtor inoculado na área impactada. A linhagem *Pseudomonas aeruginosa* LBI foi capaz de metabolizar querosene, óleo diesel e petróleo bruto como única fonte de carbono. A mais alta concentração de ramnolipídio, 9,9 g/L, foi alcançada com 30% de óleo Diesel (PIRÔLLO et al., 2008).

2.7.2 Biorremediação e biodegradação de poluentes

Vários estudos têm avaliado a influência dos ramnolipídios na biodegradação de n-hidrocarbonetos, tanto alifáticos quanto aromáticos. Igualmente já foi relatada a degradação de hexadecano, octadecano, n-parafinas e fenantreno por parte de *Pseudomonas aeruginosa* em presença de ramnolipídios (SHREVE *et al.*, 1995; ZHANG & MILLER, 1994; ZHANG & MILLER, 1995).

Além da remoção de hidrocarbonetos, os ramnolipídios são efetivos também na remoção de metais ou mistura de ambos de locais contaminados (MULLIGAN, 2005). De acordo com Wei *et al.*, (2005) os biossurfactantes podem atuar na recuperação de adsorventes de óleos usados, dessa maneira este material pode ser reutilizado na recuperação de óleo ou em outras aplicações, como a engenharia civil.

De acordo com Wang & Mulligan, (2009), biossurfactantes podem ser úteis na remoção de arsênico de rejeito da mineração. Outra aplicação é na remoção de cromo (VI) da água e do solo (ARA & MULLIGAN, 2008). Esses autores relataram que houve retirada de 100% deste metal da água quando se estabeleceu condições físico-químicas ótimas, como: pH 6,0; solução com 2% de ramnolipídios e temperatura de 25°C.

Um estudo realizado por Qiuzhuo *et al.*, (2008) comprovou a eficiência dos ramnolipídios na decomposição de palha de arroz, aumentando em 22,3% a produção de açúcares redutores quando se adicionou biossurfactante purificado ao meio de sacarificação hidrolítica. Foi avaliado também o efeito do inóculo de *P. aeruginosa* para produção *in situ* do tensoativo, e a quantidade de açúcares redutores produzidos foi 12,2% maior quando comparado ao controle (sem adição da bactéria), lembrando que este segundo método omite a etapa de purificação, reduzindo os custos do processo.

2.7.3 Indústria farmacêutica, cosmética e biomedicina

Os biotensoativos possuem propriedade antiadesiva, que impede a formação de biofilmes patogênicos em materiais hospitalares, diminuindo o risco de infecções hospitalares sem a utilização de drogas sintéticas (SINGH & CAMEOTRA, 2004). Os ramnolipídios podem atuar ainda como antimicrobianos, incluindo atividade antifúngica, antibacteriana e antiviral (ABALOS *et al.*, 2001).

Thanomsub *et al.* (2007), relataram a inibição do crescimento de células cancerígenas humanas pelos homólogos de ramnolipídios, Rha₂C₁₀C₁₀ e Rha₂C₁₀C₁₂, produzidos por *P. aeruginosa* B189. Ainda dentro das aplicações na indústria farmacêutica há relatos de que a incorporação de 0,1% de di-ramnolipídios em pomadas aumentou a eficiência do tratamento de úlceras de pacientes decúbitos (PILJAC *et al.*, 2008).

As formulações como repelentes, antiácidos, soluções para lentes de contato e desodorantes precisam de substâncias emulsionantes que apresentem uma alta atividade superficial, daí surge o uso de ramnolipídios nestes tipos de produtos (LOURITH & KANLAYAVATTANAKUL, 2009; MAIER & SOBERÓN-CHÁVEZ, 2000; PIJAC & PIJAC, 1995).

O controle de vetores transmissores de doenças é uma área que tem ganho força nos últimos anos, Da Silva *et al.*, (2015b) avaliaram a ação larvicida, inseticida e repelente dos ramnolipídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando concentrações do biossurfactante entre 800 – 1000 mg/L, as larvas morreram depois de 18h e 100% dos adultos morreram quando foi utilizada a solução de 1000 mg/L.

A atividade larvicida e mosquitocida dos ramnolipídios foi estudada em conjunto com óleos essenciais, para avaliar o efeito potencializador dos ramnolipídios nos compostos ativos de óleos essenciais contra larvas de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* (SALAZAR-BRYAM *et al.*, 2021).

Wang *et al.* (2005) verificaram que a mistura de ramnolipídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* tem efeito potencial algicida, inibindo o crescimento de *Heterosigma akashiwo* e quando em altas concentrações apresentam forte atividade lítica.

2.7.4 Agroindústria e controle biológico

Na agroindústria, os ramnolipídios atuam na proteção de videiras contra o ataque de *Botrytis cinérea*, através da inibição da germinação de esporos e crescimento do micélio fungico (VARNIER *et al.*, 2009). Soluções contendo 0,01% de ramnolipídios estimularam o sistema imune de plantas contra fungos patogênicos (NITSCHKE *et al.*, 2011).

Os ramnolipídios também apresentaram a habilidade de controlar patógenos zoospóricos como *Phytophthora cryptogea* e *Pythium spp.*, em concentrações entre 5 e 30 mg/L afetaram a motilidade dos patógenos e causaram a lise da população.

Da Silva *et al.* (2015a) estudaram a influencia dos ramnolipídios na germinação e desenvolvimento de sementes de alface, milho, soja e girassol. As sementes alface apresentaram aumento de 75% na taxa de germinação. Para as sementes de milho a concentração que estimulou o desenvolvimento das sementes foi 0,25 g/L.

2.7.5 Indústria de alimentos e outras indústrias

Na revisão da literatura feita por Nitschke *et al.* (2011) é descrito as aplicações de ramnolipídios em diferentes áreas da indústria alimentícia, onde podem atuar como controladores de consistência, solubilizadores de sabor, na conservação de produtos da panificação, e ainda em conjunto com nisina e natamicina inibem o crescimento microbiano em leite de soja, molhos de salada e queijo cottage. Além disso, os autores descrevem o retardo na formação de biofilme em superfícies tratadas com ramnolipídios.

Os ramnolipídios servem como uma fonte de L-ramnose, que é utilizada na indústria de alimentos para ressaltar o sabor do alimento. Este açúcar é difícil de se conseguir na natureza, no entanto os ramnolipídios hidrolisados são uma boa fonte do aditivo (VAN HAESSENDONCK & VANZEVEREN, 2004). Além de funcionarem como aditivos, os ramnolipídios permitem acondicionar superfícies para evitar colonização bacteriana e contaminação cruzada em processos de produção de alimentos, além disso têm sido utilizados como inibidores de corrosão em superfícies (101)

Recentemente foi descrito por Zhang & Ju (2011) a utilização de ramnolipídios para separação de β -glicosidase de uma mistura de enzimas através do fracionamento de espuma. Os ramnolipídios foram utilizados devido a sua propriedade espumante e pela presença de di-ramnose em alguns homólogos, a qual atua como um substrato análogo para a β -glicosidase.

2.7.6 Nanotecnologia

O interesse na síntese biológica de nanopartículas tem aumentado devido à sua excelente biocompatibilidade e baixa toxicidade. Os ramnolipídios estão sendo empregados na formação e estabilização de nanopartículas de óxido de níquel,

zircônia e prata (MULLIGAN, 2009; PALANISAMY& RAICHUR, 2009; KUMAR *et al.*, 2010; SALAZAR-BRYAM *et al.*, 2021). As nanopartículas de ramnolipídios e prata exibiram atividade antibiótica contra bactérias Gram positivos/ negativos e leveduras como *Candida albicans*, evidenciando o amplo espectro de ação da sua atividade antimicrobiana (KUMAR *et al.*, 2010).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

– Abordar estratégias up-stream para otimizar a produção de ramnolipídios a partir de substratos hidrofílicos de baixo custo.

3.2 Objetivos Específicos

– Estudar a influencia da proporção C/N, C/P e concentração de Ferro na produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* LBI 2A1.

– Promover um processo de evolução adaptativa com o intuito de aumentar o consumo de glicerol e a produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* LBI 2A1.

– Comparar o fluxo de carbono dos bioprocessos da cepa Parental e Mutante.

– Estudar a produção de ramnolipídios por uma linhagem recombinante de *Pseudomonas fluorescens* utilizando partir de glicerol como fonte de carbono (Doutorado Sanduiche – Universidade de Hohenheim, Alemanha).

– Estudar a produção de ramnolipídios por uma linhagem recombinante de *Pseudomonas fluorescens* utilizando partir de arabinose, glicose, manose, xilose como fonte de carbono (Doutorado Sanduiche – Universidade de Hohenheim, Alemanha).

4. CAPITULO 1

AVALIAÇÃO DA PROPORÇÃO C/N, C/P E CONCENTRAÇÃO DE FERRO NA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS POR *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1

4.1. INTRODUÇÃO

Os ramnolipídios são glicolipídios produzidos principalmente por bactérias do gênero *Pseudomonas*. Os ramnolipídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* são os biossurfactantes mais estudados, pois apresentam propriedades de solução que permitem uma ampla gama de aplicações e o rendimento de produção é alto em relação ao tempo de cultivo (ABDEL-MAWGOUD et al, 2011).

A estrutura geral dos biossurfactantes consiste em pelo menos uma parte hidrofílica e uma hidrofóbica devido a seu caráter anfifílico. Geralmente, a parte hidrofóbica compreende ácidos graxos com diferentes comprimentos de cadeia entre 8 e 18 átomos de carbono.

Apesar de serem biossurfactantes muito estudados, os custos de produção ainda são altos e estratégias devem ser promovidas para melhorar a produção (HENKEL et al., 2012). Até agora, muitos fatores relacionado a eficiência do processo para a produção de ramnolipídio com linhagens de *P. aeruginosa* foram investigados, incluindo pesquisas sobre a complexa rede reguladora de QS (HENKEL et al., 2014), monitoramento na expressão de genes associados à produção (WIGNESWARAN et al., 2016), modelagem da produção de ramnolipídios (HENKEL et al., 2014), otimização da composição e controle do processo (KUMAR et al., 2012), bem como técnicas para processamento, extração e purificação.

A otimização do meio de cultivo resulta uma estratégia importante no momento de desenvolver um bioprocesso. A seleção e avaliação dos compostos nutricionais que influenciam na biossíntese é o primeiro passo na otimização do meio de cultivo. As abordagens estatísticas para delineamento de experimentos multivariados são

ferramentas que permitem estabelecer o meio de cultivo mais apropriado para uma determinada aplicação.

O objetivo deste estudo é otimizar as proporções carbono-nitrogênio, carbono-fosfato e a concentração de FeCl_3 numa solução de elementos traços, para aumentar a produção de ramnolipídios utilizando glicerol como fonte de carbono.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Micro-organismo

Pseudomonas aeruginosa LBI 2A1 (Lovaglio, 2011) foi o micro-organismo utilizado para estudar a produção de ramnolipídios. É proveniente do Laboratório de Microbiologia Industrial (LMI) da Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Campus Rio Claro. Foi acondicionado em tubos criogênicos contendo glicerol 20% e armazenado ultra-freezer à -80°C .

4.2.2 Meios de cultura

4.2.2.1 Caldo Lisogenico (Lysogenic Broth, LB)

A composição dos meios utilizados para o pré-inóculo dos micro-organismos em (g/L): triptona – 10; extrato de levedura – 5,0 e NaCl – 10 (LB).

4.2.2.2 Meio mineral livre de cálcio com tampão fosfato (MLCTF)

O meio MLCTF, utilizado para o preparo do inóculo das fermentações, é composto por (g/L): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,05; KCl – 0,1; NaNO_3 – 0,15; como fonte de carbono foi utilizado glicerol – 2,5% (v/v); tampão fosfato 0,1 M, pH 6,5 e 1 ml/L da solução de elementos traços. Esta solução é composta por (g/L): citrato de sódio dihidratado – 2,0; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,87; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 1,2; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 1,2; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,8; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,28.

4.2.2.3 Meio mineral livre de cálcio (MLC)

Para os experimentos de otimização foram utilizados os meios de cultivo apresentados na tabela 4.2 e para a produção de ramnolipídios em reator foram utilizados os as condições otimizadas.

A concentração e a composição da solução de elementos traços utilizados foram os mesmos descritos no item anterior, com exceção do $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ que foi utilizado em várias concentrações no delineamento experimental (Tabela 4.2). A concentração de glicerol foi 5% (v/v) – 63 g/L.

4.2.3 Condições de cultivo

O micro-organismo foi pré-cultivado em frascos Erlenmeyer de 125 ml contendo 25 mL de meio LB. A incubação foi realizada em mesa agitadora, durante 24 horas à 37°C e 200 rpm. Em seguida foram transferidos 5 ml do pré-inóculo para frascos de 500 ml com 100 mL de meio MLCTF e incubado por 48 horas à 37°C e 200 rpm. Esta cultura foi utilizada para inoculação do meio utilizado para conduzir os experimentos de otimização e de validação do processo. No delineamento as células foram cultivadas à 37°C e 200 rpm.

4.2.4 Delineamento experimental composto central rotacional (DCCR)

Foi realizado um delineamento de CCRD para determinar os efeitos e interações de fatores independentes na produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* LBI 2A1, bem como as interações entre eles, na produção de ramnolipídios como variável de resposta.

Foi realizado delineamento composto central rotacional (DCCR) completo 2^2 , incluindo 4 pontos axiais e 3 pontos centrais, totalizando onze ensaios (Tabela 4.1). No delineamento experimental, foram avaliadas a proporção carbono-nitrogênio, carbono-fosfato e concentração de ferro na solução de elementos traço em cinco diferentes níveis (Tabela 4.2).

Tabela 4.1 Valores das variáveis independentes para o delineamento de composto central rotacional 1.

VALORES CODIFICADOS	-1,41	-1	0	1	1,41
C/N	3,47	6	10	14	16,52
C/P	15,91	50	100	150	184,08
$\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,03	0,12	0,24	0,36	0,44

Neste estudo, foi escolhido como intervalo de confiança, o valor de 95%, ou seja, um valor-p inferior a 0,05, inferindo que a variável é estatisticamente significativa. Após a eliminação dos fatores não significativos, verificou-se a significância da regressão e da falta de ajuste a um nível de confiança de 95%, através da Análise de Variância (ANOVA), utilizando teste F para o planejamento

estudado. O software STATISTICA Versão 10.0 (USA) foi utilizado para realizar o delineamento experimental, ANOVA e otimização do processo.

Tabela 4.2 Matriz do delineamento do composto central rotacional (CCRD) 1 das variáveis independentes.

CORRIDA	VALORES CODIFICADOS			COMPOSIÇÃO DOS MEIO DE CULTIVO ^a		
	C/N	C/P	Fe	NaNO ₃ (g/L)	K ₂ HPO ₄ (g/L)	FeCl ₃ · 6H ₂ O (g/L)
1	-1	-1	-1	24,86	0,90	0,12
2	-1	-1	1	24,86	0,90	0,36
3	-1	1	-1	24,86	0,30	0,12
4	-1	1	1	24,86	0,30	0,36
5	1	-1	-1	10,65	0,90	0,12
6	1	-1	1	10,65	0,90	0,36
7	1	1	-1	10,65	0,30	0,12
8	1	1	1	10,65	0,30	0,36
9	-1,41	0	0	45,61	0,45	0,24
10	1,41	0	0	8,92	0,45	0,24
11	0	1,41	0	14,92	2,83	0,24
12	0	-1,41	0	14,92	0,24	0,24
13	0	0	-1,41	14,92	0,45	0,04
14	0	0	1,41	14,92	0,45	0,45
15 (C)	0	0	0	14,92	0,45	0,24
16 (C)	0	0	0	14,92	0,45	0,24
17 (C)	0	0	0	14,92	0,45	0,24

^a; A concentração de glicerol foi mantida constante: 5% (v/v)

4.2.5 Produção de Ramnolipídios em reator

A partir dos resultados obtidos na fermentação em frasco, foi avaliada a produção de ramnolipídios em biorreator de 13L, contendo 4L de meio MLC. Foram controlados os seguintes parâmetros físico-químicos: temperatura, pH, pO₂ e nível de espuma. Estes parâmetros físico-químicos serão: temperatura de 37 °C; pH 6,8; aeração de 0,4 VVM; velocidade de agitação inicial 300 rpm sendo ajustada por meio de configuração de cascata para manter a pO₂ acima de 10%; o volume da espuma formada foi controlado usando um sistema de bombas acoplado ao vaso do reator, para retirar a espuma e retorná-la ao reator, adicionalmente foi utilizado antiespumante Contraspum A4050 (Zschimmer & Schwarz GmbH & Co. KG). A saída de gases foi monitorada ao longo do cultivo. Foram adicionados elementos traços nos seguintes tempos de cultivo: 0, 20, 40, 70, e 120h. Foram retiradas amostras para processamento e análise. As fermentações foram feitas em triplicata.

4.2.6 Métodos Analíticos

4.2.6.1 Processamento das amostras

Foram retiradas amostras de 5 e 20 mL, para experimentos em frasco e em reator, cada amostra foi centrifugada à 10000 rpm, à 4°C por 20 min para que ocorresse separação das 2 fases: células / fase aquosa.

4.2.6.3 Avaliação da produção de ramnolipídios

4.2.6.3.1 Extração de ramnolipídios

À uma alíquota de 2 mL da fase aquosa adicionou-se 20 µL de H₃PO₄ 85% (v/v) 1:100, e foi adicionado 2,5 mL de acetato de etila (1:1,25), a mistura foi agitada por 1 min e centrifugada à 10000 rpm, à 4°C por 10 min, obtendo assim duas fases: a fase superior foi separada e o procedimento de extração foi repetido com a fase inferior.

Determinação da produção de Ramnolipídios – Cromatografia em Camada Delgada

A cromatografia em camada delgada foi realizada em placas de sílica-gel e como fase – móvel a seguinte mistura: clorofórmio/metanol/ácido acético (65:15:2). foram aplicados 12 µl dos extratos obtidos a partir do caldo livre de células em diferentes tempos de cultivo, além dos padrões de ramnolipídios adquiridos da Agae. O agente revelador está composto por ácido acético, anisaldeído e ácido sulfúrico (100:2:2).

Quantificação de Ramnolipídios – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Derivatização

Para a análise em HPLC as amostras contendo ramnolipídios foram derivatizadas a fim de serem detectadas via detector de UV, os padrões e as amostras de ramnolipídios foram derivatizados de acordo com Schenk *et al.* (1995) com pequenas modificações. As amostras de ramnolipídio em acetato de etila, foram evaporadas e ressuspendidas em acetonitrila.

Para a derivatização foi utilizado 90 µL de amostra, foi adicionado 40 µL da uma solução 1:1 de brometo de 4-bromofenacil 40mM e trietilamina 20mM, ambos

em acetonitrila e foi adicionado 270µL com acetonitrila. A diluição apropriada da amostra foi realizada em acetonitrila. A derivatização foi feita durante 1,5 h à 60°C e 1400 rpm, em um aquecedor de bloco seco

HPLC

As análises foram feitas em um equipamento HPLC (Shimadzu) acoplado a um detector UV, de acordo com o descrito por Müller *et al.* (2010). Foram utilizadas soluções de padrão de mono (Rha-C₁₀-C₁₀) e di-ramnolipídio (Rha-Rha-C₁₀-C₁₀) comercial nas concentrações de 0,25; 0,50; 0,75; 1,0 g/L, para realizar curva de calibração. Foi utilizada uma coluna de fase reversa Nucleodur 100-5 C18 ec, Macherey Nagel – 150 mm X 0,46 mm, 5 µm silica gel) à 30°C. As fases móveis foram metanol 5% e 95%, para as bombas A e B respectivamente, em água ultra-pura.

Para separação do mono e o di ramnolipídio foi estabelecido um gradiente de 80 à 100% da solução B, de acordo com o seguinte protocolo: de T=0 à T=17 min, aumento da solução B de 80 para 100%, conservando-se em 100% até 25 min. Em seguida o gradiente foi decrescido para 80% até 30 min, mantendo-se por mais 5 min para que houvesse equilíbrio. O fluxo utilizado foi de 0,4 mL/min e os ramnolipídios foram monitorados à 254 nm.

4.2.6.4 Quantificação da biomassa microbiana

Para as fermentações em erlenmeyers de 1L, crescimento microbiano foi quantificado pelo método gravimétrico, onde o *pellet* de células foi ressuspenso em NaCl 0,85% (v/v) e centrifugado à 4000 rpm, 4°C e 30 min. Em seguida o *pellet* foi dissolvido em 1 mL de NaCl 0,85% (v/v) e mantido em estufa à 100 °C até atingir peso constante.

4.2.6.5 Quantificação da fonte de carbono

O consumo do glicerol foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência. Para as análises foi utilizada coluna Rezex RCM (300 17 x 7,8 mm) da Phenomenex à 40 °C; foi injetado 20 µL de amostra e o fluxo foi de 0,6 ml/min,. Água ultrapura foi usada como fase móvel. O tempo de retenção é de 18 ± 0,1 min, foi utilizado o detector de índice de refração.

4.2.6.6 Determinação do consumo de Nitrogênio

A partir de 5 mL de fase aquosa foi determinado o consumo da fonte de nitrogênio nos diferentes tempos de fermentação. A concentração de nitrato foi quantificada por meio do eletrodo Thermo Scientific™ Orion™. As análises foram feitas conforme as instruções do fabricante.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Efeito da proporção C/N, proporção C/P e concentração de ferro na produção de ramnolipídios

Foram estudadas varias condições de cultivo variando as proporções de carbono-nitrogênio, carbono-fosfato, concentração de ferro. A produção de ramnolipídios foi a variável de resposta avaliada na batelada de experimentos do delineamento. Como observado na tabela 4.3 a maior produção de ramnolipídios ocorreu no experimento 10, com 1,58 g/L.

O modelo DCCR é uma parte que integra a metodologia da superfície de resposta. Esse modelo fornece quase tanta informação quanto um modelo fatorial de três níveis e requer menor quantidade de testes do que o delineamento fatorial completo. Tem se mostrado suficiente para descrever a maioria das respostas de uma grande quantidade de processos (ASLAN, 2008).

Tabela 4.3 Matriz do delineamento do composto central rotacional (CCRD) 1 das variáveis independentes. com as respostas experimentais e preditas

CORRIDA	C/N	C/P	Fe	CONCENTRAÇÃO DE RAMNOLIPÍDIO (g/L)	
				EXPERIMENTAL	PREDITA
1	-1	-1	-1	0,23	0,07
2	-1	-1	1	0,52	0,68
3	-1	1	-1	0,21	0,47
4	-1	1	1	0,04	0,14
5	1	-1	-1	1,11	1,21
6	1	-1	1	1,28	1,22
7	1	1	-1	1,25	1,29
8	1	1	1	0	0,35
9	-	0	0	0,39	0,28
	1,41				
10	1,41	0	0	1,58	1,42
11	0	1,41	0	0,86	0,94
12	0	-	0	0,90	0,55
		1,41			
13	0	0	-	0,68	0,64
			1,41		
14	0	0	1,41	0,60	0,37
15 (C)	0	0	0	0,95	1,06
16 (C)	0	0	0	1,16	1,06
17 (C)	0	0	0	1,00	1,06

C; ponto central

O modelo escolhido explica os efeitos de dois dos 3 fatores na produção de ramnolipídios, a significância de cada um dos coeficientes é apresentada na tabela 4.4. A proporção C/N apresentou um efeito positivo no termo linear e a concentração de FeCl₃ apresentou um efeito negativo no termo quadrático, sendo ambos efeitos foram significativos na resposta ($p \leq 0,05$). A interação entre a proporção C/P e FeCl₃ apresentou um efeito negativo e significativo no termo linear ($p \leq 0,05$), pelo que é possível afirmar que as mudanças nessas variáveis estão associadas às alterações na variável de resposta, mas os efeitos dependem de outro fator. O coeficiente de determinação para produção de ramnolipídios (R^2) foi de 96.24%.

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.

	EFEITO	ERRO ESTÁNDAR	t(7)	p
(1)C/N(L)	0.679122	0.146985	4.62034	0.002425 *
C/N(Q)	-0.145206	0.161756	-0.89769	0.399174
(2)C/P(L)	-0.231632	0.146985	-1.57589	0.159055
C/P(Q)	-0.221434	0.161756	-1.36894	0.213326
(3)Fe (L)	-0.161223	0.147050	-1.09638	0.309192
Fe (Q)	-0.390451	0.162047	-2.40949	0.046809 *
1L BY 2L	-0.160779	0.192045	-0.83719	0.430137
1L BY 3L	-0.300794	0.192045	-1.56627	0.161269
2L BY 3L	-0.469831	0.192045	-2.44646	0.044337 *

L; efeito no termo linear – Q; efeito no termo quadrático – by: interação entre os fatores, p. ex: 1L by 2L, efeito da interação ente o fator 1 e o fator 2. * $p \leq 0,05$; estatisticamente significativo

As representações gráficas da superfície resposta são apresentadas na figura 4.1, nas três figuras de superfície de resposta apresentadas, o valor fixo utilizado foi o valor central de cada variável. A figura 4.1a mostra os efeitos da proporção C/N e concentração de FeCl₃ na variável de reposta. Com a proporção C/N na faixa 12 – 18

junto com uma concentração de FeCl_3 variando entre 0,04 – 0,45 g/L, foi obtida uma resposta de 1,1 a 1,5 g/L de ramnolipídio.

O efeito positivo da proporção C/N corrobora os resultados relatados na literatura indicando que o aumento nessa proporção pode levar a uma maior produção de ramnolipídios (SANTOS et al., 2002). Tem sido relatado que o aumento significativo na síntese de ramnolipídios resulta da limitação do nitrogênio, isso está relacionado à regulação da transcrição de genes relacionados à produção deste biossurfactante (MEDINA et al., 2003; MULLIGAN et al., 1989; KUMAR et al., 2012). RpoN (σ_{54}), um regulador de genes envolvidos no metabolismo e assimilação de nitrogênio sob condições limitantes de nitrogênio, demonstrou estar envolvido na regulação do operon *rhIAB*, assim como na expressão *rhIR* e *rhIC* (RAHIM et al. 2001; MEDINA et al. 2003; TOTTEN et al., 1990).

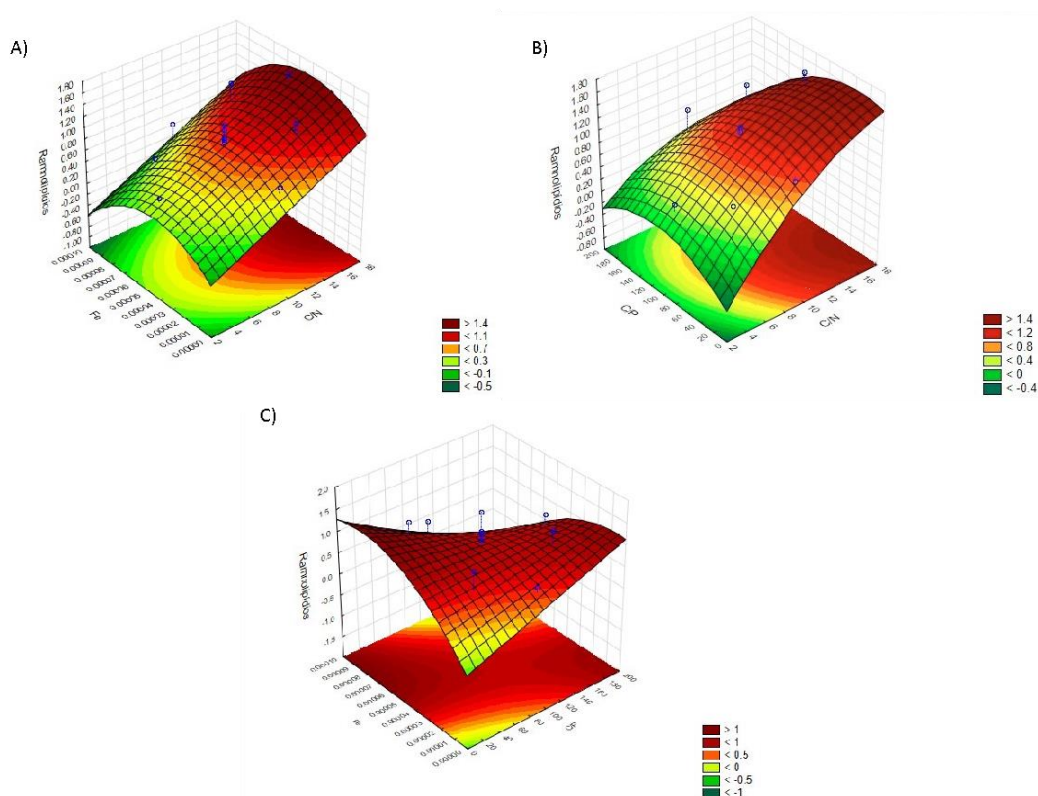


Figura 4.1 Gráfico de superfície resposta da interação entre A) proporção C/N – Concentração de FeCl_3 ; B) proporção C/N – proporção C/P; C) proporção C/P – Concentração de FeCl_3

Na figura 4.1b, uma resposta maior (1,5 g/L de ramnolipídio) foi observada ao utilizar uma proporção alta de C/N (16 – 18) e isso foi independente da relação C/P utilizada. Foi observado (Figura4.1c) que a relação C/P nos valores mais baixos (0 –

80) frente a valores baixos na concentração de FeCl_3 (0 – 0,12 g/L) exerce uma resposta menor que 0,5 g/L de ramnolipídio. O mesmo comportamento foi observado na interação entre proporções C/P e concentrações de FeCl_3 altas, na faixa de 100 – 200 de C/P e 0,30 – 0,48 g/L de FeCl_3 .

A influência do FeCl_3 está relacionada a regulação do sistema Pqs que é ativado em dependência da concentração deste elemento no meio (OGLESBY et al., 2008). Ao mesmo tempo, o sistema Pqs é dependente da concentração de fosfato no meio, isso confirma o efeito significativo que teve a interação entre a concentração de ferro e a proporção C/P na produção de ramnolipídios.

Como observado na tabela 4.4, só a variação na proporção C/P, em geral não teve um efeito significativo na produção de ramnolipídios, porém a interação desta variável (C/P) com a concentração de ferro tem um efeito na resposta, valores extremos destes fatores tem um efeito negativo na produção de ramnolipídio.

Adicionalmente, foi descrito que o sistema de sinais por quinolonas de *Pseudomonas* (PQS) pode ativar a transcrição de *rhIR* independentemente de PhoB, ao haver limitação de ferro no meio, porém este deve estar em quantidades suficientes (JENSEN et al., 2020). Estas constatações poderiam explicar a baixa influência da variação de C/P nos experimentos realizados. Contudo, Soto-Aceves et al. (2021), avaliaram a expressão de *lasR* frente a concentrações baixas e altas de fosfato, e encontraram que os níveis de expressão desse gene permaneceram iguais, indicando que *lasR* não está sujeito a uma regulação significativa em dependência da disponibilidade de fosfato no meio.

Entretanto, outros estudos descrevem o contrario, Clarke et al. (2010) observaram durante o período de crescimento limitado por exaustão de fosfato a concentração total de ramnolipídio aumentou. Porém, isso aconteceu na presença de excesso de nitrogênio, os autores sugerem que uma maior quantidade de ramnolipídios seria produzida pela linhagem quando o carbono estivesse em excesso da capacidade metabólica. Outros autores descreveram um comportamento semelhante ao avaliarem o efeito da limitação do fosfato na produção de moléculas de sinalização celular e de ramnolipídios (BAZIRE et al., 2005).

4.3.2 Validação do delineamento experimental

A condições determinadas para realizar a validação do delineamento experimental, foram: C/N: 18, C/P: 100; e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0,28 (g/L) na solução de elementos traços, a resposta esperada era 1,85 g/L de ramnolipídio. Na figura 4.2 são apresentadas as cinéticas de crescimento, de produção de ramnolipídio, consumo de fonte de carbono e de produção comparando as condições para a validação do experimento e com a corrida do planejamento (corrida 10, Tabela 4.3) que apresentou a melhor resposta.

O perfil de consumo de fonte de carbono se manteve parecido em ambos casos, é não houve diferenças significativas no consumo máximo da fonte de carbono. O micro-organismo consumiu $62,25 \pm 0,12 \%$ e $73,01 \pm 0,19 \%$, na corrida 10 (Figura 4.2a) e na validação experimental do modelo (Figura 4.2b), respectivamente.

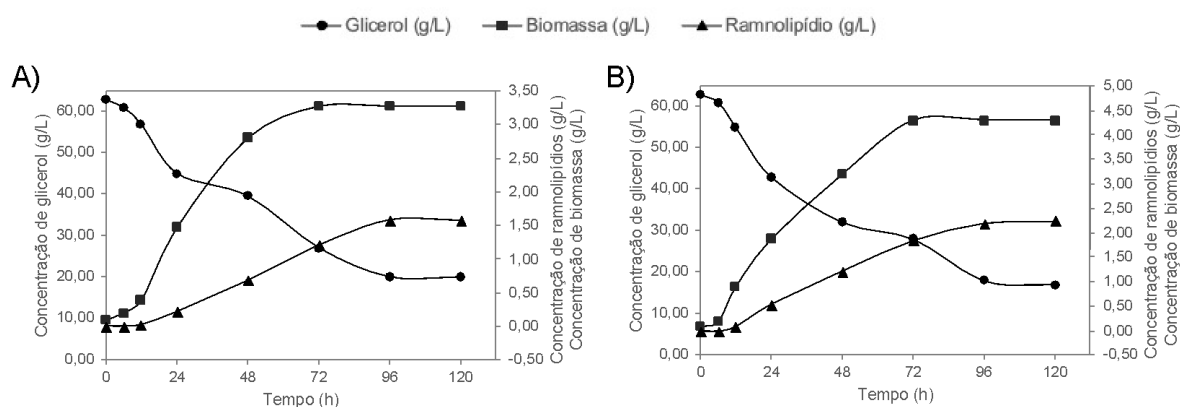


Figura 4.2 Cinética do cultivo em frasco de *P. aeruginosa* LBI 2A1 utilizando A) Corrida 10 – C/N 16,72 C/P: 100; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0,24 (g/L) e B) Validação do delineamento experimental – C/N: 18, C/P: 100; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0,28 (g/L).

O perfil de crescimento celular também apresentou um comportamento similar em ambos casos. A fase estacionária foi atingida depois de 72 h de cultivo, com uma produção máxima de biomassa de $3,27 \pm 0,13$ g/L e $4,30 \pm 0,14$ g/L, na corrida 10 (Figura 4.2a) e na validação experimental (Figura 4.2b), respectivamente.

Observa-se que em ambos casos o consumo máximo de glicerol ocorreu até às 96 h de cultivo, coincidindo com a produção máxima de ramnolipídios, que apresentou diferenças significativas ($p \leq 0,05$), foram obtidos $1,57 \pm 0,03$ g/L na corrida

10 (Figura 4.2a) e $2,24 \pm 0,02$ g/L na validação experimental do modelo (Figura 4.2b), respectivamente. Como é observado aqui, a produção de ramnolipídios pela *P. aeruginosa* depende de condições específicas de baixa concentração de nitrogênio e alto teor de carbono/nitrogênio. (C/N), e se inicia durante a fase exponencial tardia e começo da fase estacionária.

Respeito ao consumo de glicerol, nas condições comparadas (tabela 4.4) não foi observada uma diferença significativa, o que indica que provavelmente a variação de C/N não interfere na capacidade do micro-organismo de consumir de forma mais eficiente esta fonte de carbono, apesar disso tem um efeito no crescimento significativo do mesmo e na produção de biossurfactante.

Tabela 4.4 Comparação dos bioprocessos para produção de ramnolipídios usando a linhagem *P. aeruginosa* LBI 2A1 com diferentes proporções de C/N.

C/N	C/P	FeCl ₃ . 6H ₂ O (g/L)	Glicerol consumido (%)	Biomassa (g/l)	Ramnolipídio (g/l)	Yp/s	Yp/x	Px/s
18	100	0,28	73	4,30*	2,24*	0,049*	0,533*	0,120
16,72	100	0,24	68	3,27	1,57	0,033	0,498	0,116

Os rendimentos de conversão de produto-substrato, produto-biomassa e biomassa-substrato apresentaram diferenças significativas, sendo que os maiores rendimentos foram obtidos na validação do delineamento, $0,049 \pm 0,01$ (g/g), $0,533 \pm 0,09$ (g/g) e $0,12 \pm 0,08$ (g/g).

4.3.2 Produção de ramnolipídio em biorreator

A partir das condições em que foi realizada a validação do delineamento experimental aumentou-se a escala para cultivo em reator. A cinética de crescimento deste bioprocessos é apresentada na figura 4.3. A produção máxima de ramnolipídio ocorreu às 96 horas de cultivo, atingindo uma concentração de $5,99 \pm 0,17$ g/L, a partir desse tempo a produção de ramnolipídios atingiu uma fase estacionária.

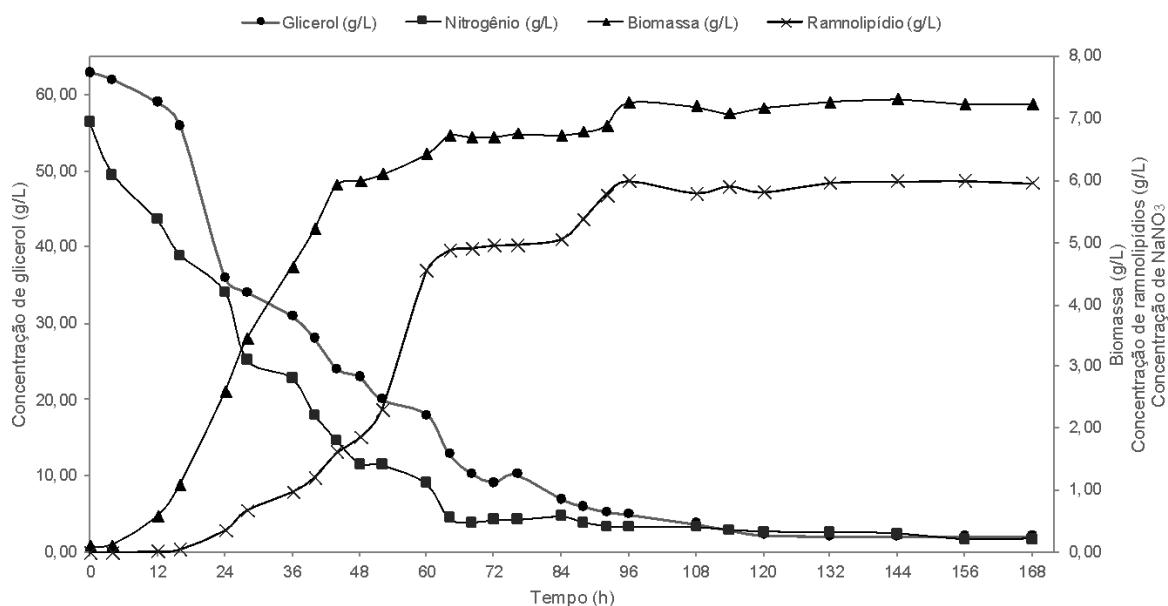


Figura 4.3 Cinética do cultivo em reator de *P. aeruginosa* LBI 2A1 nas condições otimizadas para produção de ramnolipídios. (37 °C, pH 6,8 e cascata de agitação de 300 - 900 rpm em função da pO₂).

O micro-organismo apresentou uma fase de adaptação curta entre às 0 h e 4 h de cultivo, depois entrou na fase exponencial. A fase exponencial de crescimento do micro-organismo ocorreu até 44 h de cultivo, onde apresentou um $\mu_{\text{máx}}$ de 0,254 h⁻¹, entre às 16 – 24 h de cultivo. Depois desse tempo, o micro-organismo continuou crescendo, porém de forma mais lenta e teve um aumento na concentração da biomassa de 5,94 ± 0,36 g/L para 6,89 ± 0,4g/L, já às 96 h de cultivo a biomassa atingiu a fase estacionária até o fim do cultivo.

Foi observada uma estreita relação entre o consumo da fonte de nitrogênio e o comportamento do crescimento microbiano. As curvas de crescimento e de concentração de ramnolipídios apresentaram um comportamento logístico típico (ZHU et al. 2012), implicando assim condições limitantes do crescimento e caráter metabólico secundário (DESAI & BANAT 1997).

O nitrato foi consumido mais rapidamente nas primeiras 44 h de cultivo. Depois desse tempo o consumo a produção de biomassa diminui drasticamente, fato relacionado ao nitrogênio ser um fator limitante para a produção de biomassa. Coincidiu que a produção máxima de ramnolipídios ocorreu quando o nitrato tinha sido consumido em um 95%, coincidindo que com tem sido relatado na literatura (MANRESA et al. 1991; ROBERT et al. 1989; SOBERON-CHAVEZ et al., 2005).

A produção de biossurfactantes em *P. aeruginosa* se vê beneficiada quando há condição de limitação de nutrientes como o nitrogênio, fosfato e elementos traços, devido a que vários fatores que regulam a expressão da cascata que regula a síntese de ramnolipídios são ativados nessas condições limitantes. Sob condições de limitação de nitrogênio, tanto a expressão *rhlA* quanto a expressão *rhlC* foi fortemente aumentada, ou seja, aproximadamente 30 e 20 vezes, respectivamente, em comparação com a expressão gênica sob condições onde o nitrogênio não foi limitado (SCHMIDBERGER et al., 2013).

4.4. CONCLUSÃO

O delineamento experimental composto central rotacional como estratégia para otimizar as condições de cultivo apresentou resultados promissórios pois se mostrou efetiva para aumentar a resposta desejada.

A proporção C/N foi a variável que mais influenciou no aumento na produção do biossurfactante. Este estudo contribui na busca de alternativas para melhorar a produção de ramnolipídios ao abordar o aproveitamento de glicerol como fonte de carbono.

Devido à complexa regulação da síntese dos ramnolipídios dependente de QS em *P. aeruginosa*, um processo de otimização mais fino quase certamente dependerá da compreender de forma mais precisa os processos de regulação e expressão assim como as respostas gênicas à mudanças no meio.

5. CAPITULO 2

EVOLUÇÃO ADAPTATIVA COMO ESTRATÉGIA PARA O USO MAIS EFICIENTE DE GLICEROL NA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS

5.1. INTRODUÇÃO

A evolução adaptativa de laboratório é uma abordagem que permite analisar fenômenos evolutivos em um cenário laboratorial controlado (DRAGOSITS & MATTANOVICH, 2013). A modificação do metabolismo celular a través da evolução dirigida traz uma abordagem inovadora no entendimento de rotas metabólicas de interesse biotecnológico e comercial (CHATTERJEE & YUAN, 2005). A elucidação, delineamento e aplicação da reestruturação dos mecanismos do genoma são elementos chave na evolução dirigida das vias metabólicas celulares (CHATTERJEE & YUAN, 2005)

A adaptação por seleção natural ocorre através da disseminação e substituição de mutações que melhoram a desempenho de um organismo e seu sucesso reprodutivo em um ambiente determinado (ELENA & LENSKI, 2003). Os micro-organismos podem sobreviver a condições adversas e se adaptarem rapidamente a novas condições ambientais, a evolução adaptativa tem se tornado uma ferramenta útil para aplicações biotecnológicas em processos industriais (PORTNOY et al., 2011; WANG et al., 2016), seja para ativação de rotas metabólicas latentes, otimização de fenótipos ou adaptação ambiental (PORTNOY et al., 2011; YU et al., 2013).

O uso de estratégias de engenharia metabólica, como a evolução adaptativa, permite a otimização do rendimento e da bioconversão de substrato no produto de interesse. Existem estudos relacionados ao melhoramento do consumo de glicerol. Wang et al. (2016) melhoraram a produção de goma xantana a través de um processo de evolução adaptativa, Yu et al. (2013) aumentaram a produção de lipídios em *Clamydomonas reinhardtii* aumentando o consumo de glicerol, ambos processos visando a uma aplicação biotecnológica e escalonamento industrial.

Os ramnolipídios estão entre os biossurfactantes mais estudados do tipo glicolipídio. Estas moléculas apresentam diversas aplicações na agricultura, indústria

farmacêutica, petróleo, alimentos e bebidas, papel, metal, produtos de limpeza e têxteis (Tiso et al., 2017). Diferentes fontes de carbono têm sido estudadas para a produção de ramnolipídios. Fontes hidrofóbicas de carbono, como óleos vegetais e n-alcanos, são as que apresentam melhores resultados na produção de ramnolipídios (ABDEL-MAWGOUD et al., 2011), e as fontes hidrofílicas como glicerol, glicose, manitol e etanol têm sido usados na produção de biossurfactantes, mas o rendimento não alcança o obtido com fontes de carbono hidrofóbico (NITSCHKE et al., 2005).

Os ramnolipídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* ainda representam um desafio para otimização do processo industrial. Vários tipos de fontes de carbono para produção de ramnolipídios, tanto solúveis como insolúveis em água têm sido utilizadas. Neste estudo, é proposta uma abordagem de evolução adaptativa para o melhoramento do consumo de glicerol como fonte carbono, para aumentar a produção de ramnolipídios.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Micro-organismo

Pseudomonas aeruginosa LBI 2A1 (LOVAGLIO, 2011) foi o micro-organismo utilizado para estudar a produção de ramnolipídios. É proveniente do Laboratório de Microbiologia Industrial (LMI) da Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Campus Rio Claro. Foi acondicionado em tubos criogênicos contendo glicerol 20% e armazenado ultra-freezer à -80°C.

5.2.2 Meios de cultura

5.2.2.1 Luria Bertani (LB)

A composição dos meios utilizados para o pré-inóculo dos micro-organismos em (g/L): peptona - 5,0; extrato de carne - 3,0 (CN) e triptona – 10; extrato de levedura – 5,0 e NaCl – 10 (LB).

5.2.2.2 Meio mineral livre de cálcio com tampão fosfato (MLCTF)

O meio MLCTF, utilizado para o preparo do inóculo das fermentações, é composto por (g/L): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,05; KCl – 0,1; NaNO_3 - 0,69; tampão fosfato 0,1 M, pH 6,5 e 1 ml/L da solução de elementos traços. Solução composta por (g/L):

citrato de sódio dihidratado – 2,0; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,87; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 1,2; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 1,2; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,8.

5.2.2.3 Meio mineral livre de cálcio (MLC)

Para os experimentos de evolução, produção de ramnolipídios em frascos e em reator foi utilizado o seguinte meio (g/L): K_2HPO_4 – 0,3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5; KCl – 1,0; NaNO_3 – 6,94; glicerol como fonte de carbono. O volume e a composição da solução de elementos traços utilizados foram os mesmos descritos no item anterior.

5.2.3 Condições de cultivo

5.2.3.1 Preparo do Inoculo

O micro-organismo foi pré-cultivado em frascos Erlenmeyer de 125 ml contendo 25 mL de meio LB. A incubação foi realizada em mesa agitadora, durante 24 horas à 37°C e 200 rpm. Em seguida foram transferidos 5 ml do preinóculo para frascos de 500 ml com 100 mL de meio MLCTF e incubado por 48 horas à 37°C e 200 rpm. Esta cultura foi utilizada para inoculação do meio utilizado para conduzir os experimentos de evolução e a avaliação da produção de ramnolipídios.

5.2.3.2 Experimento de evolução adaptativa

A linhagem *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 foi plaqueada em ágar nutriente para selecionar a colônia *Parental*. O *Parental* foi inoculado em um erlenmeyer de 500 mL com 100 mL de meio MLC, após 48 h de cultivo, foi transferido um volume determinado do cultivo, para ter uma $\text{D.O}_{600\text{nm}}$ inicial de 0,1, para dois erlenmeyers de 500 mL com 100 mL meio MLC novo.

O experimento de evolução adaptativa foi conduzido durante 60 dias, tendo um total de 29 transferências. Após atingida a concentração onde o crescimento diminuiu em mais do 70%, em comparação ao parental, foram feitas 10 transferências no meio com concentração de glicerol testada. Foi calculado o número de total gerações no final do experimento (g), e para cada transferência foi calculada a velocidade máxima de crescimento (μ_{max}).

5.2.3.3 Produção de Ramnolipídios em frasco

Foram conduzidos experimentos em frascos Erlenmeyer de 1 L para avaliar a cinética de crescimento, produção de ramnolipídios e consumo da fonte de carbono

por parte do *Parental* e dos *Evoluídos*. As cepas foram inoculadas em caldo nutriente para ativação e preparo do inoculo que foi crescido em meio MLCTF. O inoculo foi transferido para os frascos de 1L, contendo 100 mL de volume de meio MLC, mantidos em mesa agitadora à 200 rpm, 37°C durante 120 horas. Foram retiradas amostras após a cada 24 horas, e processadas como descrito no item 5.2.3.5. Cada cultivo foi feito em triplicata.

5.2.3.4 Produção de Ramnolipídios em reator

A partir dos resultados obtidos na fermentação em frasco, foi avaliada a produção de ramnolipídios em biorreator de 13L, contendo 30% de volume de meio de MLC. Foram controlados os seguintes parâmetros físico-químicos: temperatura, pH, pO₂ e nível de espuma. Estes parâmetros físico-químicos serão: temperatura de 37 °C; pH 6,8; aeração de 1 L/min velocidade de agitação 300 rpm sendo ajustada para manter a pO₂ acima de 10%; o volume da espuma formada foi controlado usando um sistema de bombas acoplado ao vaso do reator, para retirar a espuma e retorná-la ao reator e antiespumante Contraspum A4050 (Zschimmer & Schwarz GmbH & Co. KG); a saída de gases foi monitorada ao longo do cultivo. Foram adicionados elementos traços nos seguintes tempos de cultivo: 0, 20, 40, 70, e 120h. Foram retiradas amostras quatro vezes ao dia para processamento e análise.

5.2.4 Métodos Analíticos

5.2.4.1 Monitoramento do crescimento durante os ciclos de evolução

O crescimento das cepas nas transferências com choque de glicerol foi monitorado utilizando o sistema de Quantificador de Crescimento Celular (CGQ) de Aquila Biolabs, Baesweiler.

5.2.4.2 Processamento das amostras

Foram retiradas amostras de 5 e 20 mL, para experimentos em frasco e em reator respectivamente, cada amostra foi centrifugada à 10000 rpm, à 4°C por 20 min para que ocorresse separação das 2 fases: células / fase aquosa.

5.2.4.3 Avaliação da produção de ramnolipídios

Extração de ramnolipídios

À uma alíquota de 2 mL da fase aquosa adicionou-se 20 µL de H₃PO₄ 85% (v/v) 1:100, e foi adicionado 2,5 mL de acetato de etila (1:1,25), a mistura foi agitada por 1 min e centrifugada à 10000 rpm, à 4°C por 10 min, obtendo assim duas fases: a fase superior foi separada e o procedimento de extração foi repetido com a fase inferior.

Determinação da produção de Ramnolipídios – Cromatografia em Camada Delgada

A cromatografia em camada delgada foi realizada em placas de sílica-gel e como fase – móvel a seguinte mistura: clorofórmio/metanol/ácido acético (65:15:2). foram aplicados 12 µl dos extratos obtidos a partir do caldo livre de células em diferentes tempos de cultivo, além dos padrões de ramnolipídios adquiridos da Agae. O agente revelador está composto por ácido acético, anisaldeído e ácido sulfúrico (100:2:2).

Quantificação de Ramnolipídios – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Derivatização

Para a análise em HPLC as amostras contendo ramnolipídios foram derivatizadas a fim de serem detectadas via detector de UV, os padrões e as amostras de ramnolipídios foram derivatizados de acordo com Schenk *et al.* (1995) com pequenas modificações. As amostras de ramnolipídio em acetato de etila, foram evaporadas e ressuspensas em acetonitrila.

Para a derivatização foi utilizado 90 µL de amostra, foi adicionado 40 µL de uma solução 1:1 de brometo de 4-bromofenacil 135 mM e trietilamina 67,5 mM, ambos em acetonitrila e foi adicionado 270µL com acetonitrila. A diluição apropriada da amostra foi realizada em acetonitrila. A derivatização foi feita durante 1,5 h à 60°C e 1400 rpm, em um aquecedor de bloco seco (Thermomixer comfort, Eppendorf AG).

HPLC

As análises foram feitas em um equipamento HPLC (Shimadzu) acoplado a um detector UV, de acordo com o descrito por Müller *et al.* (2010). Foram utilizadas soluções de padrão de mono (Rha-C₁₀-C₁₀) e di-ramnolipídio (Rha-Rha-C₁₀-C₁₀) comercial nas concentrações de 0,25; 0,50; 0,75; 1,0 g/L, para realizar curva de

calibração. Foi utilizada uma coluna de fase reversa Nucleodur 100-5 C18 ec, Macherey Nagel – 150 mm X 0,46 mm, 5 µm silica gel) à 30°C. As fases móveis foram metanol 5% e 95%, para as bombas A e B respectivamente, em água ultra-pura.

Para separação do mono e o di ramnolipídio foi estabelecido um gradiente de 80 à 100% da solução B, de acordo com o seguinte protocolo: de T=0 à T=17 min, aumento da solução B de 80 para 100%, conservando-se em 100% até 25 min. Em seguida o gradiente foi decrescido para 80% até 30 min, mantendo-se por mais 5 min para que houvesse equilíbrio. O fluxo utilizado foi de 0,4 mL/min e os ramnolipídios foram monitorados à 254 nm.

5.2.4.4 Quantificação da biomassa microbiana

Para as fermentações em erlenmeyers de 1L, crescimento microbiano foi quantificado pelo método gravimétrico, onde o *pellet* de células foi ressuspendido em NaCl 0,85% (v/v) e centrifugado à 4000 rpm, 4°C e 30 min. Em seguida o *pellet* foi dissolvido em 1 mL de NaCl 0,85% (v/v) e mantido em estufa à 100 °C até atingir peso constante.

5.2.4.5 Quantificação da fonte de carbono

O consumo do glicerol foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência. Para as análises foi utilizada coluna Rezex RCM (300 17 x 7,8 mm) da Phenomenex à 40 °C; foi injetado 20 µL de amostra e o fluxo foi de 0,6 ml/min. Água ultrapura foi usada como fase móvel. O tempo de retenção é de $18 \pm 0,1$ min, foi utilizado o detector de índice de refração.

5.2.4.6 Determinação do consumo de Nitrogênio

A partir de 5 mL de fase aquosa foi determinado o consumo da fonte de nitrogênio nos diferentes tempos de fermentação. A concentração de nitrato foi quantificada por meio do eletrodo Thermo Scientific TM Orion TM. As análises foram feitas conforme as instruções do fabricante.

5.2.5 Análise de balanço de fluxo

Foi utilizado o protocolo descrito por Krömer et al., (2014), onde para cada amostra retirada foi analisada a concentração de biomassa, produção de CO₂ e ramnolipídios, bem como, o consumo de O₂ e da fonte de carbono. Foram calculadas as taxas específicas de crescimento, consumo de substrato e formação de produto.

O programa utilizado para monitorar o bioprocesso foi IRIS versão 5.4, foi monitorado o consumo e produção de gases e foram calculadas automaticamente as taxas de consumo de oxigênio (OUR) e produção de dióxido de carbono (CER).

A análise de balanço de fluxo foi feita através de um modelo em escala genômica (OBERHARDT et al., 2011) e as análises foram executadas no programa COBRA Toolbox dentro da plataforma do MATLAB, a função objetiva utilizada foi a velocidade do crescimento microbiano.

5.2.6 Análise estatística

Foi analisada a normalidade dos dados com a prova Shapiro wilk ($\alpha = 0,05$). Aplicou-se uma prova paramétrica (ANOVA, $\alpha = 0,05$) para avaliar a existência de diferenças entre as médias dos tratamentos. Por fim, para comparar entre quais tratamentos existem diferenças, foi aplicada o teste de Tukey-Kramer (Key-Kr). Foi utilizado o software R (versão 3.2.0).

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Perfil de crescimento de *P. aeruginosa* LBI 2A1 durante experimento de evolução adaptativa

Foi realizada uma curva de crescimento na condição inicial (5% de glicerol em meio MLC) para determinar o tempo em que seriam realizadas as transferências do experimento de evolução. Na figura 5.1 observa-se a curva de crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1, a fase de adaptação do micro-organismo foi registrada entre 0 e 16 horas de cultivo. A fase exponencial do micro-organismo ocorreu até às 48 h de cultivo, registrando uma $\mu_{m\acute{a}x}$ de crescimento de 0,257. O gráfico apresenta um comportamento típico de crescimento logístico, onde por causa da limitação de nutrientes, o micro-organismo entrou na fase estacionária, que foi observada a partir de 48 h de cultivo até 72 h onde o mesmo foi encerrado.

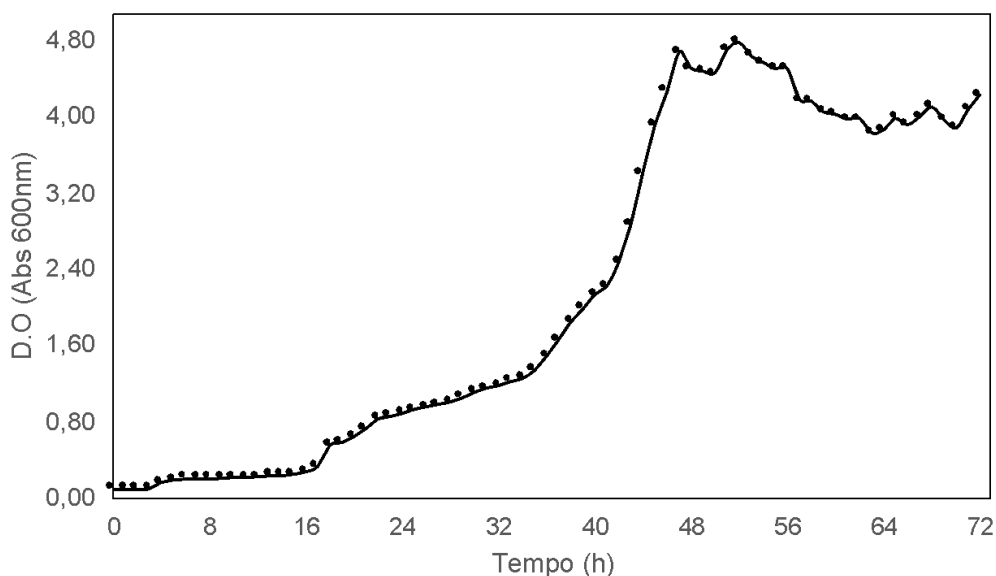


Figura 5.1 Curva de crescimento *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 em MLC com 5% de glicerol, 37°C, 200 rpm, pH inicial 6,8.

No experimento de evolução adaptativa foram realizadas 16 transferências, onde foi variada a concentração de glicerol. Depois foram realizadas 13 transferências no meio contendo a ultima concentração de glicerol, estas transferências foram feitas com o intuito de melhorar o crescimento do micro-organismo nessa ultima concentração de glicerol (12,75% de glicerol) onde foi evidenciada uma $D.O_{600nm}$ 3 vezes inferior à $D.O_{600nm}$ do parental na transferência 0 (5% de glicerol).

A densidade celular inicial foi mantida em $D.O_{600nm}$ de 0,1, depois de 48 h de cultivo no meio MLC, os cultivos das transferências numero 0 (o parental) até a numero 8 atingiram uma $D.O_{600nm}$ entre 4,21 e 11,62 para a população A e entre 4,51 e 10,72 para a população B. A partir da transferência número 9 até a número 16 a $D.O_{600nm}$ variou entre 9,65 e 1,14 para a *População A* e 7,98 e 2,39 para a *População B*, este último valor corresponde à ultima transferência de cada uma das populações onde o glicerol foi variado (Figura 5.2).

As transferências 16 – 29 foram realizadas com o intuito de melhorar o crescimento do micro-organismo na ultima concentração avaliada (12,75%), pois a partir de 13,25%, não foi evidenciado crescimento apesar de ter feito várias transferências. Houve um aumento na $D.O_{600nm}$, para a *População A* foi de 1,145

(Transf. 17) para 5,99 (Transf. 29), no caso da *População B*, a D.O._{600nm}, não teve uma variação tão marcada, pois foi de 2,39 (Transf. 17) para 2,64 (Transf. 29) (Figura 5.2)

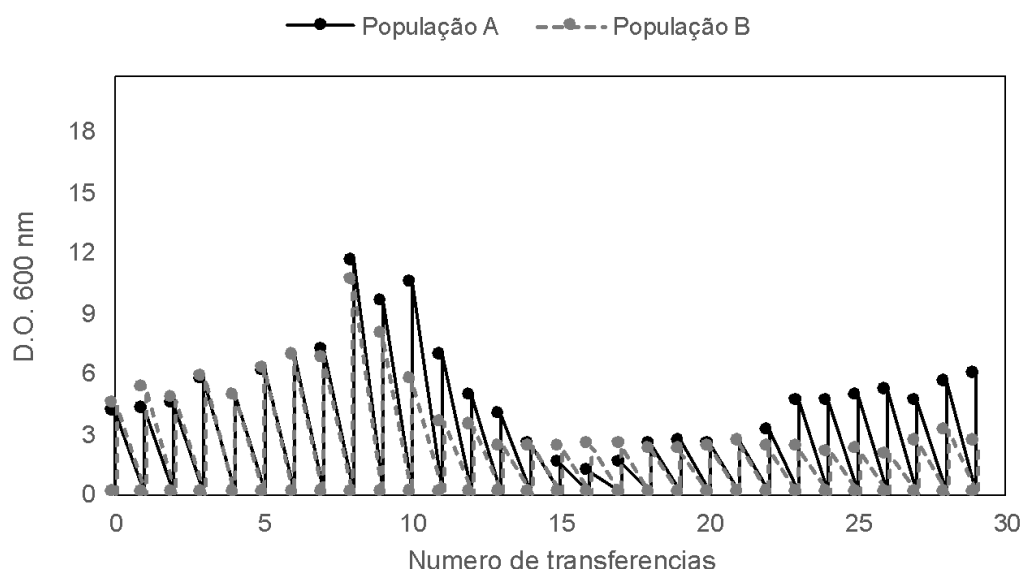


Figura 5.2 Processo esquematizado do experimento de evolução adaptativa de *P. aeruginosa* LBI 2A1. Variação da densidade celular de 0h até 48h de cultivo para cada transferência. Meio MLC à 37°C, 200 rpm, com variação na concentração de glicerol de 5 – 12,75% entre transferências 0 e 16, e entre as transferências 17 – 29 o glicerol foi mantido constante em 12,75%.

Em total foram obtidas 65 gerações, 43 nas primeiras 16 transferências onde o glicerol foi variado e mais 32 onde o glicerol foi mantido na concentração constante (12,75%). O crescimento do micro-organismo ao longo do experimento foi monitorado em tempo real com o sistema quantificador de crescimento celular CGQ, com as curvas de crescimento obtidas, foram calculadas as velocidades de crescimento ao longo das gerações.

Em processos aplicados à biotecnologia, parâmetros como $\mu_{\max}$, taxas de sobrevivência em concentrações tóxicas de certos nutrientes e rendimento absoluto de biomassa são adequados para ter em conta como critérios de aptidão (DRAGOSITS & MATTANOVICH, 2013). A velocidade específica de crescimento além de estar relacionada ao consumo do substrato, em *P. aeruginosa* está acoplada à produção de metabólitos secundários, principalmente aqueles relacionados ao sistema de regulação de QS (NICKZAD & DÉZIEL, 2016; WINSTANLEY et al., 2016).

Entre a geração 2 e 7 o $\mu_{\max}$ variou entre 0,265 e 0,320 h⁻¹, a partir da geração 10 e até a geração 19, a velocidade máxima de crescimento aumentou, e variou entre

0,325 e 0,431 h⁻¹. Entre as gerações geração 21 e 33 houve outro aumento no $\mu_{\text{máx}}$, e os valores mais altos deste parâmetro aconteceram entre a geração 24 e 27, onde o $\mu_{\text{máx}}$ variou entre 0,559 e 0,622 h⁻¹. Nas ultimas gerações, 36 até 43, foi observado um decréscimo no $\mu_{\text{máx}}$, de 0,288 para 0,062 h⁻¹, o que provavelmente estaria indicando que um aumento na concentração de glicerol afetaria o crescimento do micro-organismo. A partir deste ponto foram realizadas transferências na mesma concentração de glicerol, 12,75%, e entre a geração 44 e 65 o valor deste parâmetro aumentou de 0,113 para 0,404 h⁻¹, indicando que provavelmente o micro-organismo estaria se adaptando para consumir de forma mais eficiente e rápida o glicerol presente no meio.

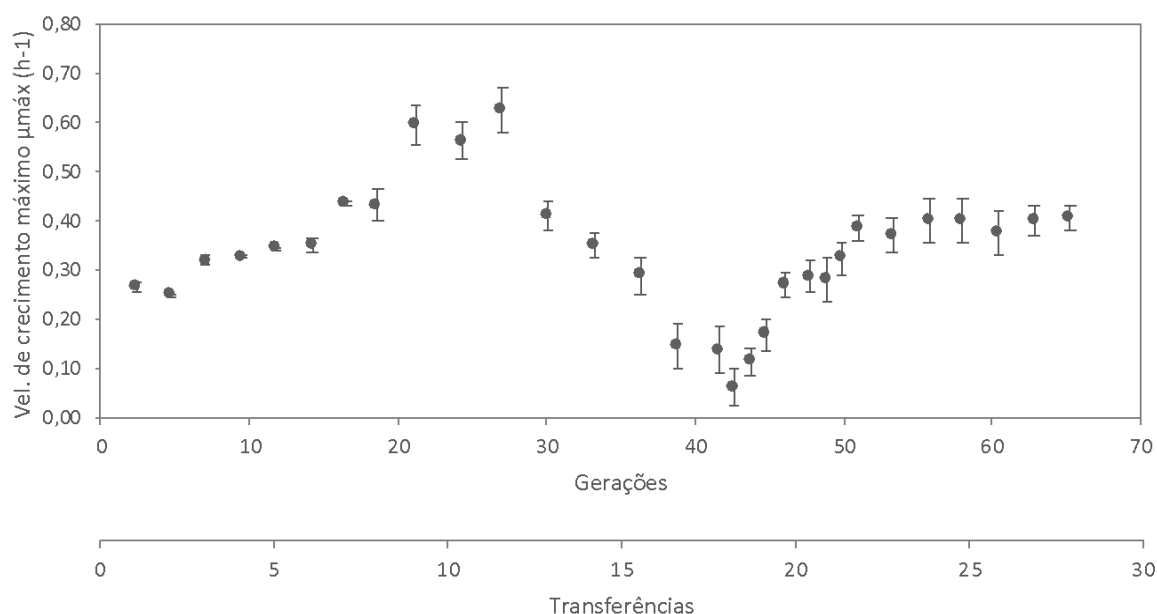


Figura 5.3 Velocidade máxima de crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 (h⁻¹) em relação ao número de gerações e transferências realizadas. 37°C, 200 rpm, pH inicial 6,8.

A validação de um experimento de evolução adaptativa pode estar determinada pelo aumento na velocidade específica de crescimento do micro-organismo, este aumento está relacionado à tolerância ou consumo mais rápido do substrato (WINKLER et al., 2013). Este processo eventualmente resultará no aumento no tempo da população com uma mutação (WINKLER et al., 2013). A próxima etapa do experimento realizado neste trabalho foi avaliar a produção de ramnolipídios por parte de mutante obtido depois de evidenciar o aumento na velocidade específica de crescimento.

5.3.2 Fermentações em frasco para avaliação da cinética de crescimento e produção de ramnolipídios

Foram realizadas fermentações em frasco de 1L para estudar e comparar a cinética de crescimento, produção de ramnolipídios e consumo da fonte de carbono por parte o *Parental* e um mutante escolhido das *Populações A e B*, daqui em diante serão descritos como T16A e T16B, na condição inicial e na condição final do experimento de evolução adaptativa, 5 e 12,75% de glicerol, respetivamente.

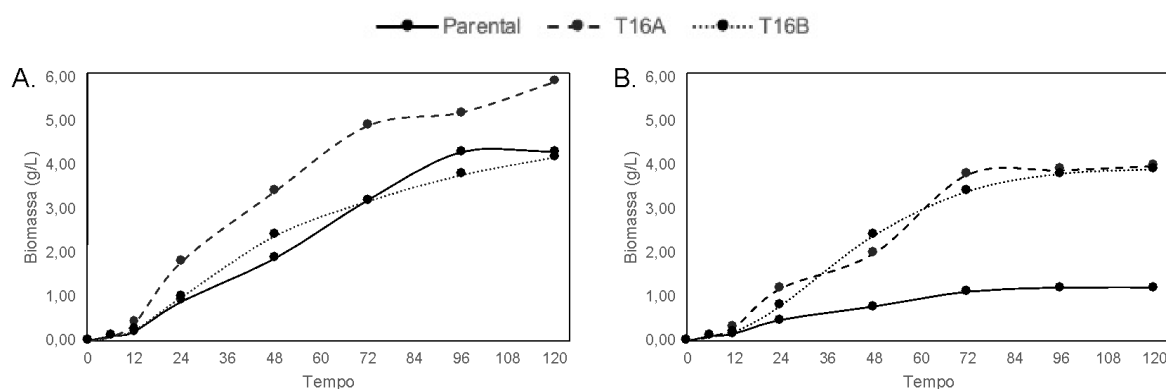


Figura 5.4 Cinética do crescimento de *P. aeruginosa* LBI 2A1, cepa Parental e T16A A e T16B. Concentração inicial de glicerol A) 5% g/L; B) 12,75% g/L. Meio MLC à 37°C, 200 rpm, pH inicial 6,8.

Na figura 5.4, são apresentados as curvas de crescimento das fermentações realizadas com o *Parental*, a *T16 A* e *B*. No caso do *Parental*, é possível observar uma diferença na produção de biomassa quando utilizada uma concentração inicial de glicerol de 5% e 12,75% pois a cepa não estava condicionada à concentração maior, pelo que o crescimento no meio contendo maior concentração de glicerol foi 3,6 vezes menor.

Na produção de biomassa, a *T16 A* apresentou um crescimento 1,5 vezes maior no meio com 5% de glicerol, evidenciando que provavelmente melhorou a sua capacidade de utilizar de forma mais eficiente esta fonte de carbono, e que ainda em concentrações maiores consegue crescer. A *T16 B* também apresentou um crescimento maior ao ser cultivada no meio com 5% de glicerol, porém não houve uma diferença significativa quanto a que apresentou a *T16 A*, frente ao *Parental*.

Foi evidenciada uma diferença significativa ($p \leq 0,05$) na produção de ramnolipídio no caso do *T16 A*, já no *T16 B*, quando comparada a produção de ramnolipídio na condição inicial e na condição final, apesar de haver evidenciado um

aumento na produção, a diferença nesse aumento não foi significativa (Figura 5.5 A). Como mencionado anteriormente, a *T16 A* atingiu uma densidade celular maior, em comparação com os outros dois cultivos, isso pode indicar que o micro-organismo além de ter aumentado a sua capacidade de consumir concentrações de glicerol mais altas, melhorou na sua eficiência para consumir essa fonte de carbono e metabolizá-la.

O aumento na produção de ramnolipídios poderia ser uma consequência do aumento na produção de biomassa, pois existe uma relação direta entre a densidade celular e a produção de ramnolipídios em *Pseudomonas aeruginosa*. A produção de ramnolipídios está ligada ao controle da translocação da célula e ao aumento do contato celular com a superfície e com outras células, o que é controlado pelo sistema *rhl* (RASAMIRAVAKA *et al.*, 2015). O sistema *rhl*, controlado por um complexo sistema de sinalização celular determinado por autoindutores que se acumulam ao aumentar a densidade populacional o que promove a interação celular e a ativação dos reguladores transcricionais (WILLIAMS, 2007).

Quando utilizada a condição inicial, 5% de glicerol, houve um consumo de 73, 86 e 78% da fonte de carbono por parte do *Parental*, *T16 A* e *T16 B*, respectivamente, e quando usado 12,75% de glicerol o consumo foi de 40, 64 e 52%, para as três cepas avaliadas, após 120 h de fermentação (Figura 5.5 B).

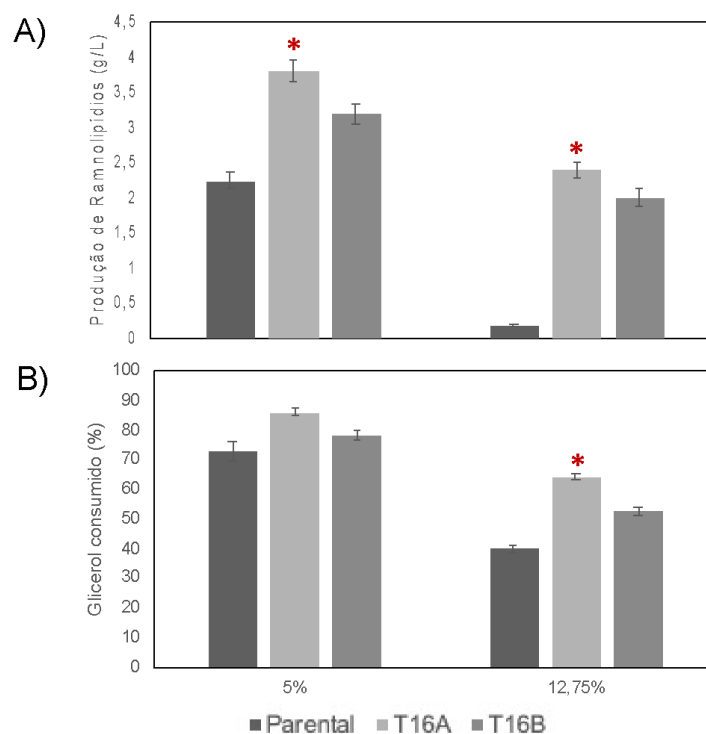


Figura 5.5 A) Produção máxima de ramnolipídios (g/L) e B) consumo máximo de glicerol(%) por *P. aeruginosa* LBI 2A1, cepa Parental e T16 A e B. 37°C, 200 rpm, pH inicial 6,8.

A velocidade máxima de crescimento nos bioprocessos realizados (Tabela 5.1), foram maiores no *Parental* quando utilizado 5% de glicerol e na *T16 A* quando usado 12,75%. Em relação aos rendimentos de conversão, a População A também teve os rendimentos mais altos e com diferenças significativas, esse foi o critério de seleção para escolher a *T16 A* para realizar as fermentações em reator e avaliar o bioprocessos sob condições controladas.

Tabela 5.1 Rendimentos de conversão e Velocidade máxima de crescimento dos cultivos em frascos de 1L.

	Y x/s		Y p/x		Y p/s		μmáx.	
	5%	12,75%	5%	12,75%	5%	12,75%	5%	12,75%
Parental	0,12 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0,55 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,05 ± 0,02	0,01 ± 0,02	0,25 ± 0,01	0,01 ± 0,02
T16A	0,22 ± 0,01*	0,08 ± 0,01	1,00 ± 0,02*	0,45 ± 0,02*	0,15 ± 0,01*	0,07 ± 0,01*	0,23 ± 0,01	0,15 ± 0,01*
T16B	0,15 ± 0,01	0,07 ± 0,018	0,74 ± 0,01	0,48 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,09 ± 0,01

*p ≤ 0,05; estatisticamente significativo

5.3.3 Fermentações em reator

Um bioprocesso sob condições controladas permite avaliar melhor as estratégias que poderiam ser aplicadas para melhorá-lo. Após o experimento de evolução adaptativa, e as fermentações em frasco, foram realizadas fermentações em biorreator com o *Parental* e o *T16 A*, ambos com 5% de glicerol para comparar a produção de ramnolipídio e biomassa em maior escala. Foi avaliado também, o consumo de nitrogênio, pois é conhecido que este é um nutriente limitante na produção de ramnolipídio (XAVIER et al., 2010). Na figura 5.6 são apresentados os resultados das fermentações em biorreator utilizando 5% de glicerol com o *Parental* e o *T16 A*. O consumo da fonte de carbono, foi do 84% para o *Parental* e 95% para a *T16 A* após 120 h de cultivo e até o final do bioprocesso.

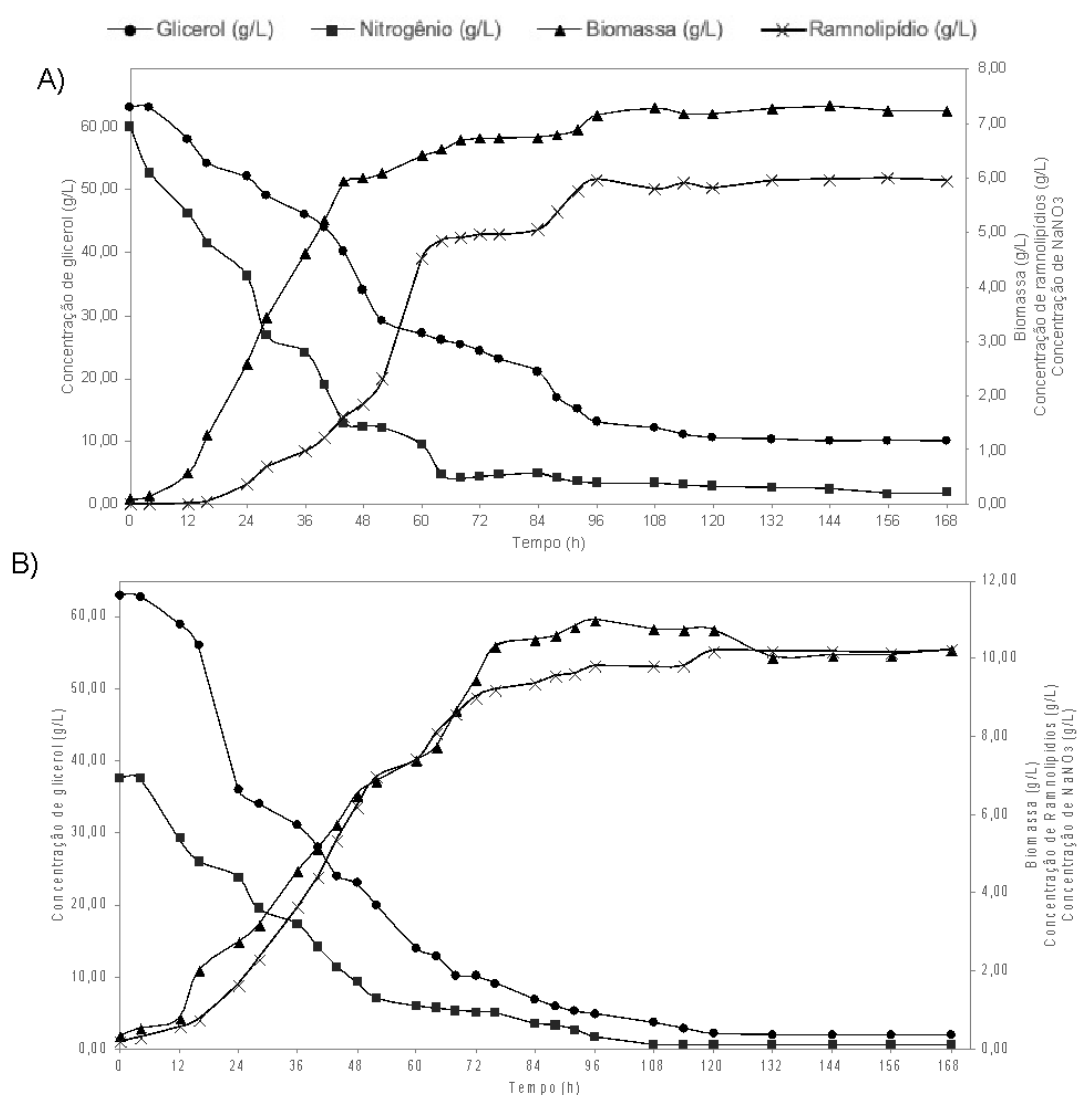


Figura 5.6 Fermentações em biorreator usando 5% de glicerol, Meio MLC à 37°C, cascata de agitação em função da pO₂, pH 6,8. A) Parental B) T16 A.

O crescimento do *Parental* foi exponencial até 44 h de fermentação, depois desse tempo, começou entrar na fase estacionária, isso coincide com a diminuição da fonte de nitrogênio que foi consumida em um 70% em 48 h. Entre 48 e 96 h houve pouco crescimento, e a produção de ramnolipídios começou depois de 60 h de cultivo, a produção máxima de ramnolipídio foi de 5,94 g/L em 96 h, depois desse tempo a concentração desse metabolito se manteve constante.

A produção de biomassa do *T16A* aumentou consideravelmente em comparação com o obtido nos cultivos com o *Parental*, condições controladas de pH e aeração favoreceram o crescimento do micro-organismo adaptado a essa condição de glicerol. Após 84 h de fermentação o micro-organismo entrou na fase estacionária, relacionado a este comportamento, a produção de ramnolipídios começou depois de 72 h de fermentação, porém a maior produção foi obtida nas últimas 40 h de fermentação, foram obtidos 10,21 g/L do biossurfactante, quando a bactéria estava na fase estacionária e o nitrogênio foi consumido em um 80%.

A melhora na capacidade da *T16A* para produzir ramnolipídios a partir de glicerol, de forma mais eficiente foi evidente no aumento no rendimento de conversão $Y_{p/s}$, que foi significativamente maior em comparação à cepa *Parental*. Da mesma forma o rendimento de conversão produto em relação à biomassa $Y_{p/x}$ também aumentou significativamente (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 Rendimentos de conversão dos cultivos em reator com 5 e 12,75% de glicerol.

	$Y_{x/s}$		$Y_{p/x}$		$Y_{p/s}$	
	5%	12,75%	5%	12,75%	5%	12,75%
Parental	0,26 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,85 ± 0,01	0,4 ± 0,21	0,12 ± 0,02	0,04 ± 0,02
T16A	0,26 ± 0,01	0,23 ± 0,01*	1,00 ± 0,08*	0,24 ± 0,02	0,17 ± 0,01*	0,05 ± 0,02

* $p \leq 0,05$; estatisticamente significativo

Nos cultivos em reator realizados na condição final, 12,75% glicerol (Figura 5.7), o *Parental* atingiu uma biomassa celular de 4,9 g/L, 1,5 vezes menos do que com 5% de glicerol, evidenciando a dificuldade do micro-organismo para crescer em concentrações altas de glicerol. Já o mutante conseguiu um crescimento significativamente maior, 27 g/L, porém na produção de ramnolipídio *T16A* ainda teve

uma performance melhor nos cultivos com 5% de glicerol, pois com 12,75% produziu 1,5 vezes menos ramnolipídios (6,5 g/L), o que diminuiu os rendimentos de conversão nestas condições de cultivo (Tabela 5.2).

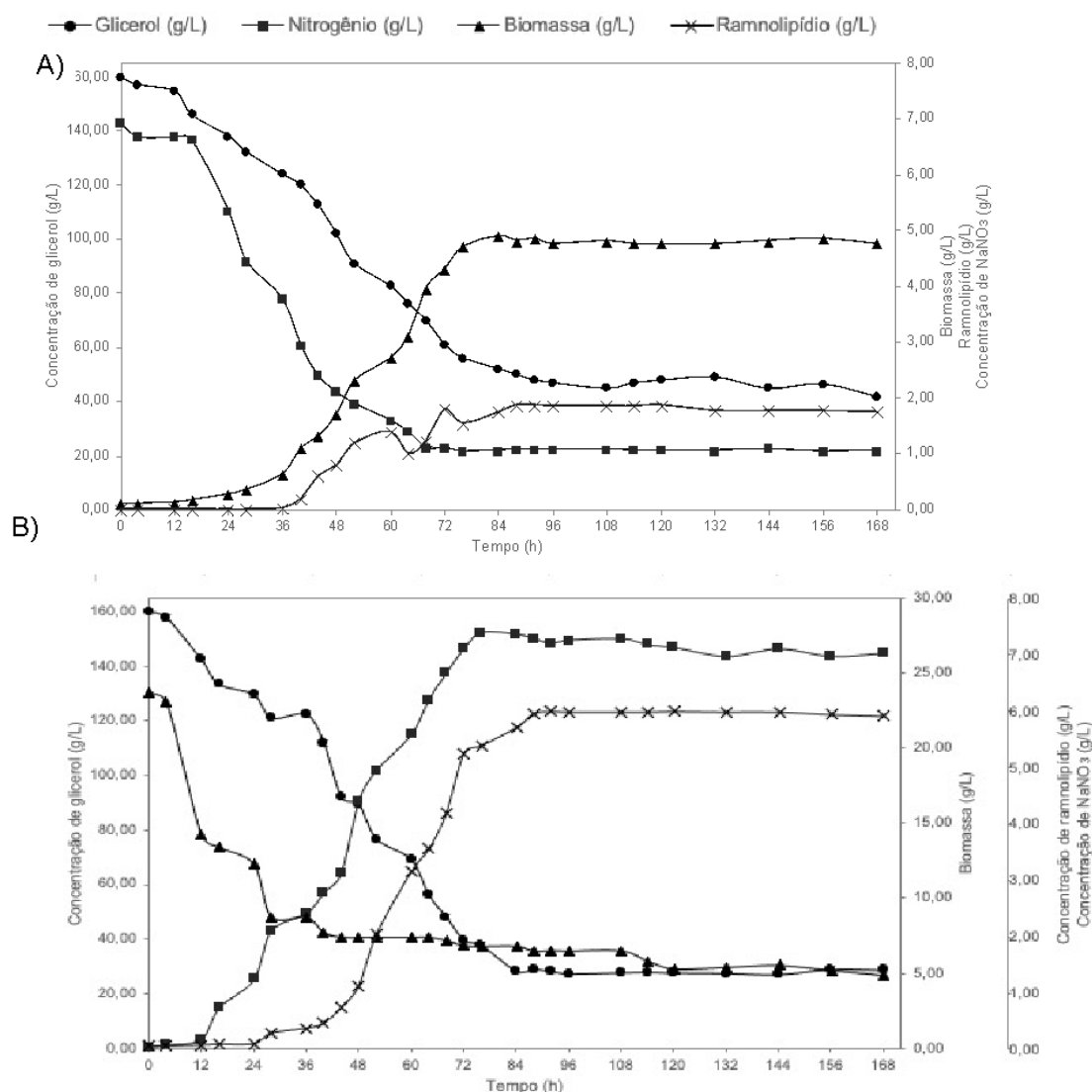


Figura 5.7 Fermentações em biorreator usando 12,75% de glicerol, Meio MLC à 37°C, cascata de agitação em função da pO₂, pH 6,8. A) Parental B) T16 A.

A fonte de carbono é utilizada pelos micro-organismos para produção de biossurfactante, sob duas condições i) quando há limitação de nutrientes, principalmente nitrogênio, fosfato ou ferro (CHAYABUTRA et al., 2001; KÖHLER et al., 2000; MELLBYE & SCHUSTER, 2014), ii) quando a fonte de carbono não pode ser mais utilizada para crescimento devido a uma limitação (XAVIER et al., 2010). Condições ambientais também influenciam na produção de ramnolipídios, *P. aeruginosa* na sua complexa regulação do sistema QS, só secreta ramnolipídios se

estes não forem afetar o crescimento, por não estar associados ao crescimento (MELLBYE & SCHUSTER, 2014; SOUZA et al.,2011; XAVIER et al.,2010).

Na figura 5.8 são apresentadas as velocidades específicas de crescimento e a produtividade específica de ramnolipídios para o *Parental* e a *T16 A*. Observa-se que a velocidade específica aumenta depois de 24 h em ambos casos, pois coincide com a entrada tanto do quanto da *T16 A* na fase exponencial, porém a velocidade máxima é atingida em momentos diferentes, para o *Parental*, é atingida em 44 h de cultivo, já a *T16 A* atingiu essa velocidade 8 h antes. A Q_{RL} começou a apresentar um aumento depois do micro-organismo haver passado pelo momento de velocidade de crescimento máximo, evidenciando que valores altos de μ , afetam a produtividade pois o metabolismo microbiano esta sendo direcionado em função do crescimento e como é observado no gráfico de cinética do bioprocesso (Figura 5.6), o ramnolipídio tem um caráter de metabolito secundário.

A velocidade de crescimento específica (μ) e a produtividade específica de ramnolipídios são parâmetros que permitem avaliar a performance do bioprocesso, pois estão relacionados, Guerra-Santos et al (1986) demonstraram que estão relacionados, pois ao manter uma velocidade específica $\mu+0,10 - 0,15 \text{ h}^{-1}$, a produtividade foi maior, havendo variação drástica nessa velocidade específica de crescimento a produtividade diminuiu.

O estudo realizado por Xavier et al. (2010), apresenta evidencias da influencia da velocidade máxima de crescimento na produção de ramnolipídios, a secreção de ramnolipídios é garantida i) quando há uma densidade celular alta o suficiente para expressar os genes relacionados à produção e ii) há suficiente fonte de carbono no meio para minimizar o impacto da síntese na população microbiana. Esta evidencia corresponde com o resultado obtido com o *T16 A*, pois tendo uma densidade celular suficiente (11 g/L), começou a produção e secreção de ramnolipídios no meio que ainda tinha um excedente de glicerol.

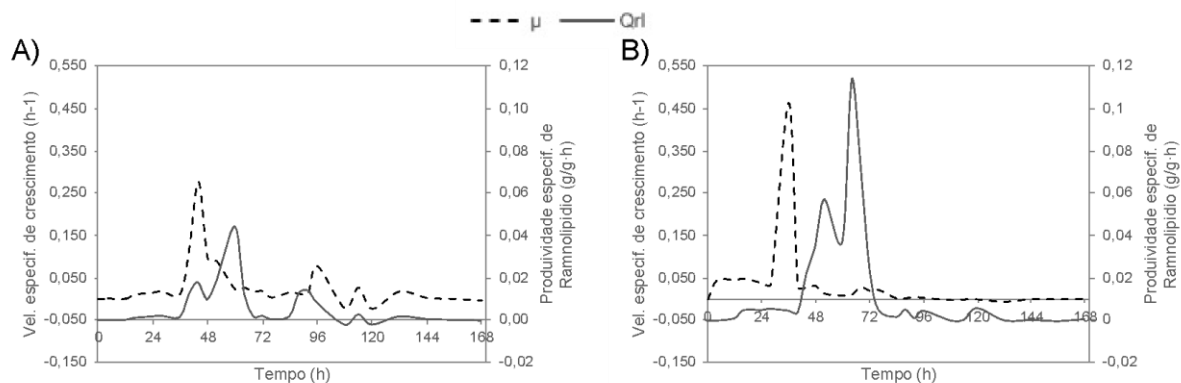


Figura 5.8 Velocidade específica de crescimento (μ) e produtividade específica de ramnolipídio (Q_{RL}) Parental e B) T16 A.

Ao longo dos cultivos, as pressões parciais de oxigênio e dióxido de carbono foram analisadas no gás de exaustão e registradas pelo sistema de controle do processo. A Figura 5.9 mostra a taxa de absorção de oxigênio calculada (OUR) e a taxa de exaustão do dióxido de carbono (CER) que aumentou durante a fase de crescimento, e atinge o pico de taxa máxima de consumo de oxigênio durante a fase estacionária. Ambos mostraram um pico distinto dentro de o intervalo de tempo da produção máxima de ramnolipídios, e isso foi observado tanto no cultivo com o *Parental* quanto no cultivo da *T16 A*, porém há maior perda de carbono em forma de CO_2 nos cultivos com o Parental.

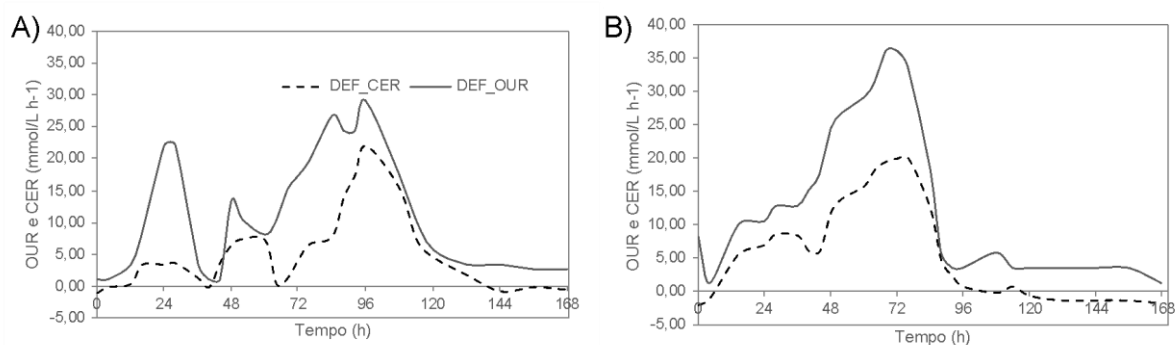


Figura 5.9 Resultados das taxas de consumo de oxigênio (OUR) e exaustão de dióxido de carbono (CER). A) Parental e B) T16 A.

As taxas de consumo de oxigênio, exaustão de dióxido de carbono e a velocidade de consumo da fonte de carbono, foram utilizadas para realizar a análise de fluxos metabólicos, e comparar a distribuição dos fluxos no metabolismo destinado ao crescimento e a produção de ramnolipídios. Na figura 5.10, é apresentada a

distribuição dos fluxos tanto do *Parental* quanto da *T16 A*. As taxas de crescimento calculadas a partir dos dados experimentais foram $0,017 \pm 0,001$ e $0,027 \pm 0,002 \text{ h}^{-1}$, já com o modelo, as taxas previstas foram $0,0023$ e $0,047 \text{ h}^{-1}$, para o *Parental* e a *T16 A*, respectivamente.

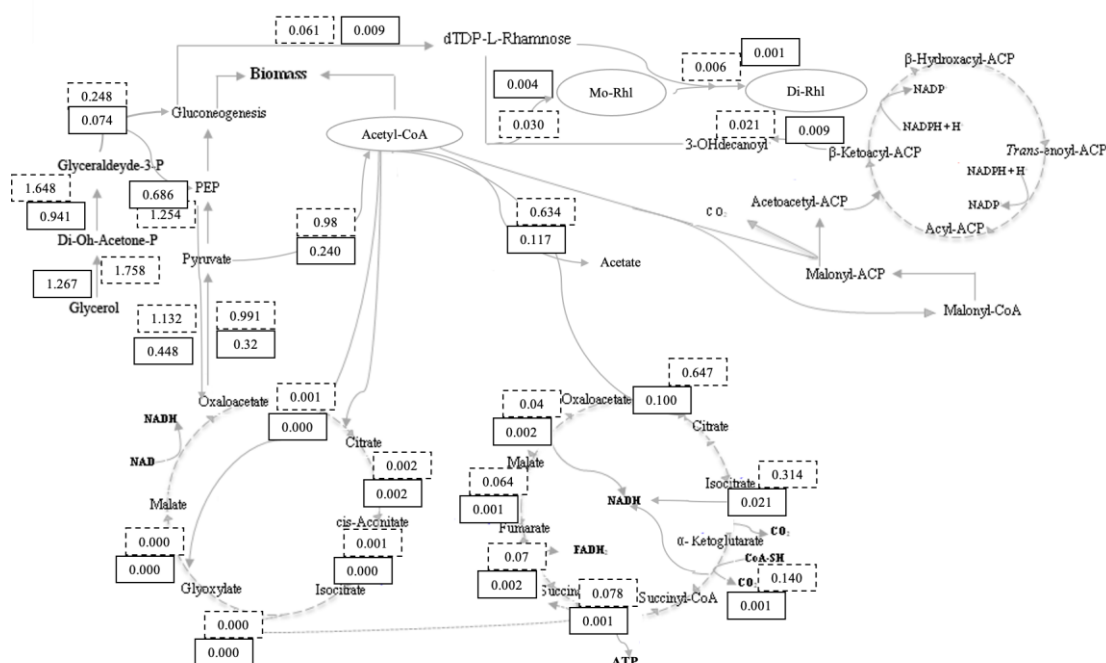


Figura 5.10 Distribuição de fluxo em *P. aeruginosa* LBI 2A1, do *Parental* (Retângulos em linha sólida) e a *T16 A* (Retângulos em linha pontilhada), usando glicerol como fonte de carbono. Retângulos em linha sólida. Os fluxos estão expressos em $\text{mmol (g de biomassa livre de PHA)}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

A rota catabólica apresentou um fluxo maior em ambos casos, porém a População A apresenta o dobro do fluxo em comparação com o *Parental*. Já o fluxo que vai para gliconeogénese, é 3 vezes maior na População A, e consequentemente a predição do fluxo para a síntese da porção hidrofílica de ramnolipídico aumentou.

Já foi descrito na literatura que um dos fatores limitantes na produção de ramnolipídios, é a síntese da porção hidrofílica, pois esta via metabólica está interligada com varias outras, por exemplo para a síntese de LPS ou para síntese de alginato (OLVERA et al., 1999; PHAM et al., 2004), que deveriam ser analisadas em termos de formação de produto para introduzir os dados no modelo e avaliar se deveriam ou não serem controladas.

O ciclo do glioxilato não apresentou fluxos como esperado, e observam-se grandes perdas de carbono em forma de acetato o que indica que esta rota também deve ser controlada. A acetogênese ocorre quando o fluxo de carbono excede a

capacidade catabólica do ciclo do ácido tricarboxílico e de outras vias metabólicas centrais; isto pode ocorrer quando o oxigênio é limitado (ELMANSI, 2004), como ocorreu neste caso, o oxigênio foi um nutriente limitante e controlado.

5.5. CONCLUSÃO

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-organismo consumisse mais rapidamente o glicerol e a fonte de nitrogênio, aumentando assim a produção de ramnolipídios.

Considerando que o mutante da população A, *T16A*, atingiu simultaneamente uma taxa de crescimento maior do que o *Parental*, isto sugere que o carbono assimilado pela *T16 A* foi mais eficiente, o que permitiu de maneira indireta melhorar a performance do micro-organismo para produzir ramnolipídios.

6. CAPITULO 3

PRODUÇÃO HETEROLOGA DE RAMNOLIPÍDIOS POR *Pseudomonas fluorescens* UTILIZANDO GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO.

6.1. INTRODUÇÃO

Os ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa*, são os biossurfactantes mais estudados, pois apresentam uma atividade de superfície elevada e o rendimento de produção é alto em relação ao tempo de cultivo (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2011). Outro gênero bacteriano que possui várias representantes produtoras de ramnolipídios é Burkholderia, como *B. thailandensis*, *B. plantarii*, *B. pseudomallei* e *B. mallei*. No entanto este gênero tem sido mais estudado em relação á produção de ramnolipídios com vistas ao processo de infecção e não pelo interesse biotecnológico (TORIBIO *et al.*, 2010).

Bactérias de outros gêneros como *Pseudoxanthomonas* sp. PNK-04, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterobacter hormaechei*, *Pantoea stewartii* e *E. absuriae* são espécies pouco comuns produtoras de ramnolipídios, e possuem a particularidade de terem sido isoladas de lugares com derramamento de petróleo (ROONEY *et al.*, 2009; TORIBIO *et al.*, 2010).

A utilização de *P. aeruginosa* na produção de ramnolipídios em escala industrial é restringida devido a sua potencial patogenicidade, embora ainda seja um dos micro-organismos mais importantes e representativos devido ao seu elevado rendimento de produção de ramnolipídios (MULLER *et al.*, 2011). Apesar de existirem estudos onde são utilizadas linhagens do gênero *Pseudomonas* não patogênicas produtoras de ramnolipídios (GUNTHER *et al.*, 2005; ROONEY *et al.*, 2009; SINGH *et al.*, 2013; TULEVA *et al.*, 2002), a *P. aeruginosa* é a linhagem com títulos mais altos (GIANI *et al.*, 1997).

Assim, a estratégia de usar cepas recombinantes é uma abordagem adequada para evitar patogenicidade e sistemas complexos de regulação metabólica (HENKEL *et al.*, 2017). As linhagens de *P. putida* e *E. coli* destacam-se como hospedeiros heterólogos para a produção de ramnolipídios (CABRERA-VALLADARES *et al.* 2006; CHA *et al.* 2008; MULLER *et al.* 2012; OCHSNER *et al.* 1994; OCHSNER *et al.* 1995;

WANG et al., 2007; WITTGENS et al., 2011). Uma vantagem da produção em linhagens recombinantes é a possibilidade de dissociar a produção do crescimento e dos sistemas de regulação do QS (TISO et al., 2017; WITTGENS et al., 2011).

Além disso, a utilização de novos substratos principalmente hidrofílicos diminui custos na purificação do ramnolipídio (HEYD et al., 2008). Muitos desses substratos podem ser obtidos a partir de resíduos agroindustriais, contribuindo ao desenvolvimento de um bioprocesso que se encaixa dentro do marco da economia circular (SENTHILKUMAR et al., 2020).

A versatilidade catabólica que *P. fluorescens* apresenta, lhe confere um amplo status e potencial biotecnológico. Além disso, este micro-organismo é fácil de manipular geneticamente e pode ser aplicado a processos que requerem alta densidade celular, o que facilita abordagens de engenharia genética para aplicação na escala industrial (SQUIRES et al., 2004). O objetivo deste estudo é produzir ramnolipídios usando *Pseudomonas fluorescens*, utilizando glicerol como fonte de carbono, como estratégia sustentável para a produção destas biomoléculas.

6.2. MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Micro-organismos

Pseudomonas fluorescens DSM 50090, foi o micro-organismo utilizado para produção heteróloga de ramnolipídios. É proveniente da coleção de micro-organismos de cultivos celulares do Instituto Leibniz. Foi acondicionado em tubos criogênicos contendo glicerol 20% e armazenado ultra-freezer à -80°C.

Pseudomonas putida KT2440 pSynPro_80 (Figura 6.1), que carrega o plasmídeo de interesse foi utilizada para extração do DNA plasmidico. Este micro-organismo faz parte da coleção do Departamento de Engenharia de Bioprocessos da Universidade de Hohenheim. Foi utilizado também nos experimentos em frascos para comparar os resultados obtidos com *P. fluorescens*.

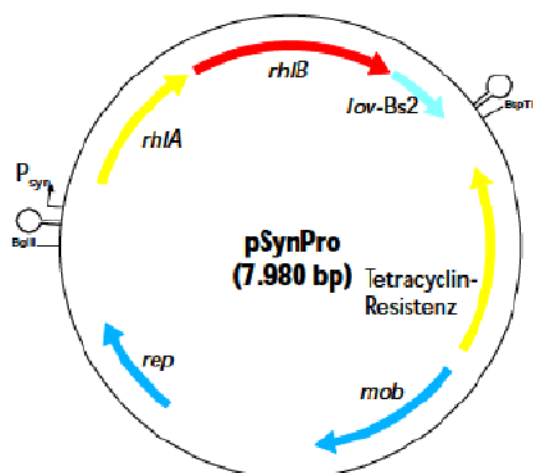


Figura 6.1 Mapa do plasmídeo pSynPro_80 que carrega os genes *rhIAB* para produção de ramnolipídios.

6.2.2 Meios de cultivo

6.2.2.1 Caldo lisogênico (Lysogenic Broth – LB)

A composição dos meios utilizados para o pré-inóculo dos micro-organismos em (g/L): peptona - 5,0; extrato de carne - 3,0 (CN) e triptona – 10; extrato de levedura – 5,0 e NaCl – 10 (LB).

6.2.2.2 Meio mineral SupM para o preinóculo

O meio de cultivo utilizado para o preparo do inóculo dos cultivos (BEUKER et al., 2016), é composto por (g/L): NH_4Cl – 1; Na_2HPO_4 – 4.4; KH_2PO_4 – 2 H_2O – 1.5 g L^{-1} ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0.2; $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ – 0.02; FeCl_3 – 0.006. O pH foi ajustado para 6,8 e foi adicionado 1 mL/L da solução de elementos traços (g/L): H_3BO_3 – 0.3; $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ – 0.2; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0.1; $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ – 0.03; $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ – 0.01; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ – 0.03; $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ – 0.02. O glicerol, empregado como fonte de carbono, foi utilizado na metade da concentração a ser utilizada no cultivo para produção de ramnolipídios.

6.2.2.3 Meio mineral ModR

Para a produção de ramnolipídios em frascos foi utilizado o meio utilizado por Beuker et al. (2016) (g/L): KH_2PO_4 – 22; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – 1.4; $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ – 0.87; $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0.01, o pH foi ajustado para 6.8. O volume e a composição da solução de elementos traços utilizados foram os mesmos descritos no item anterior.

A fonte de nitrogênio para os experimentos com variação de concentração de glicerol foi $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 2.6 g/L. Para estes experimentos, as concentrações de glicerol utilizadas foram: 5, 10 e 20 g/L.

Para avaliar o efeito da fonte de nitrogênio, foram estudadas diferentes proporções C/N: 7, 12 e 36; a concentração de glicerol foi mantida constante (10g/L). As fontes de nitrogênio avaliadas foram $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, NH_4Cl , NaNO_3 e ureia.

6.2.3 Transformação de *P. fluorescens* para produção de ramnolipídios

6.2.3.1 Extração do plasmídeo

O plasmídeo pSynPro_80 foi extraído com o kit InnuPREP Plasmid Mini Kit 2.0. O procedimento foi realizado de acordo com as instruções do manual do fabricante. Assim, 2 mL de cultura de células na fase exponencial foram centrifugadas a 12000 rpm, 2 min, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado, e o plasmídeo foi extraído do sedimento da célula restante. As etapas de centrifugação foram realizadas a 11000 rpm. Finalmente, o pDNA foi eluído com 50 μL água livre de nucleases e armazenado a 4 °C ou -20 °C até ao processamento posterior.

6.2.3.2 Determinação da concentração de pDNA

A concentração de pDNA foi determinada através de NanoDrop (ND-1000, p Scientific, Waltham, US). Como branco foi realizado água livre de nucleases. Posteriormente, a medição foi realizada com 1,2 μL da solução de pDNA.

6.2.3.3 Preparo de células eletrocompetentes de *Pseudomonas fluorescens*

De um cultivo *over-night* *P. fluorescens* DSM 50090 em LB, foram transferidos 2 mL para um frasco erlenmeyer de 1L contendo 200 mL de LB. As células foram cultivadas a 30°C, 150 rpm até atingirem uma DO de 0,4. A suspensão foi centrifugada em tubos falcon de 50 mL durante 10 min a 4.700 rpm. Posteriormente, o pellet de células foi lavado três vezes com uma solução de sacarose 0,3 M. Na primeira etapa com um volume de 100 mL e na segunda e terceira etapa com 50 mL. Finalmente, o *pellet* foi ressuspenso em 1,5 mL de sacarose 0,3 M em 15 % (v/v) de glicerol. As alíquotas com 50 μL e 100 μL foram armazenadas a -80 C.

6.2.3.4 Dessalinização do DNA de plasmídeo

As soluções de DNA a serem utilizadas para transformação foram dessalinizadas antes da electroporação para atingir taxas de electroporação mais elevadas. Portanto, uma placa de petri livre de nucleases foi preenchida com água livre de nucleases e um filtro de membrana (0,025 µM, Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, DE) foi colocado sobre a água. O pDNA foi aplicado à membrana e incubado durante 30 min à temperatura ambiente. Posteriormente, a solução foi cuidadosamente transferida para um tubo novo de 1,5 mL.

6.2.3.5 Electroporação

A electroporação foi realizada para a introdução de DNA plasmídeo nas células. As cubetas de electroporação (VWR International GmbH, Darmstadt, DE), foram armazenadas a -20 °C durante pelo menos 20 minutos. Alíquotas congeladas a -80°C foram descongeladas em gelo durante 10 min. Após as células terem sido descongeladas. 2 µL de pDNA foram misturados com 50 µL de células electrocompetentes. A suspensão plasmídeo-bactérias foi transferida para a cubeta de electroporação. A cubeta foi colocada no electroporador (Eporator, Eppendorf AG, Hamburgo, DE).

As células *P. fluorescens* foram electroporadas a 1500 V: Imediatamente após a electroporação, 950 µL meio LB foram adicionados às células, misturados bem pipetando 2 vezes. A suspensão foi transferida para um tubo falcon de 15 mL. As células de *P. fluorescens* foram incubadas a 30°C, 120 rpm durante 4 h. Logo depois foram feitas diluições seriadas até 10⁻³ e foram plaquedadas em meio Ágar Sangue com Tetraciclina, para a confirmação indireta da produção do biossurfactante, como controle negativo foi utilizada *P. fluorescens* selvagem. As placas foram incubadas à 30°C por 24 h, a confirmação foi realizada por detecção do halo de hemólise.

6.2.4 Condições de cultivo

6.2.5.1 Preparo do Inoculo

O micro-organismo foi cultivado em frascos Erlenmeyer de 100 ml contendo 10 mL de meio LB. A incubação foi realizada em mesa agitadora, durante 24 horas à 30°C e 180 rpm. Em seguida foram transferidos 1 mL do preinóculo para frascos de 500 ml com 50 mL de SupM e incubado por 24 horas à 30°C e 200 rpm.

6.2.5.2 Produção de Ramnolipídios em frasco

Foram conduzidos experimentos em frascos Erlenmeyer de 1 L para avaliar a cinética de crescimento, produção de ramnolipídios e consumo da fonte de carbono por parte dos micro-organismos. Do inoculo crescido em SupM foi mensurado a densidade óptica (D.O) à 600nm e a densidade óptica inicial do inoculo foi padronizada para 0,1. O inoculo foi transferido para os frascos de 1L, contendo de 100 mL de meio ModR. O cultivo foi mantido em mesa agitadora à 200 rpm, 37°C durante 96 horas. Cada cultivo foi feito em triplicata.

As fontes de nitrogênio avaliadas foram $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, NH_4Cl , NaNO_3 e ureia. A proporção C/N foi avaliada concentração de glicerol foi mantida constante, 10g/L.

6.2.6 Métodos Analíticos

6.2.6.1 Processamento das amostras

Foram retiradas amostras de 5 mL, do quais 1 mL foi utilizado para avaliar o crescimento microbiano medindo a D.O. à 600 nm, os 4 mL restantes foram centrifugados à 4700 rpm, 4°C e 20 min para que ocorresse separação das 2 fases: células / fase aquosa.

6.2.6.2 Avaliação da produção de ramnolipídios

Extração de ramnolipídios

Á uma alíquota de 2 ml da fase aquosa adicionou-se 20 µl de H_3PO_4 85% (v/v) (1:100), foram adicionados 2,5 mL de acetato de etila (1,25:1) e centrifugou-se à 4700 rpm, 4°C e 15 min. Das duas fases obtidas, 1,5 mL da fase superior foi separada e o procedimento de extração foi repetido com a fase inferior. Após a extração o solvente foi evaporado em uma centrifuga à vácuo por 40 min, à 40°C e 10 mbar. O ramnolipídio foi ressuspense em acetonitrila.

Derivatização dos ramnolipídios

Para a derivatização foi utilizado 90 µL de amostra, foi adicionado 40 µL de uma solução 1:1 de brometo de 4-bromofenacil 135 mM e trietilamina 67,5 mM, ambos em acetonitrila e foi adicionado 270µL com acetonitrila. A diluição apropriada da amostra foi realizada em acetonitrila. A derivatização foi feita durante 1,5 h à 60°C e 1400 rpm, em um aquecedor de bloco seco (Thermomixer comfort, Eppendorf AG).

Determinação da produção de Ramnolipídios – Cromatografia em Camada Delgada de Alta eficiência (HTPLC)

A HPTLC foi realizada utilizando placas de sílica-gel 60 com indicador de fluorescência 254 nm. A amostra foi aplicada nas placas utilizando o aplicador automático de TLC (ATS 4). Em cada placa foi aplicado: 0,5 µL; 1 µL; 5 µL; 10 µL do padrão de di-ramnolipídio (RL3) para realizar a curva padrão de 0,125 - 3,75µg de ramnolipídio, 5 µL de mono-ramnolipídio (RL1) como controle e 0,5-8 µL das amostras a serem analisadas. Para o desenvolvimento da cromatografia foi utilizada uma cuba de desenvolvimento automático (ADC2), utilizando 35 mL de fase móvel: Isopropilacetato, etanol, água, ácido acético glacial (32:5:2,5:1), 25 mL para saturação e 10 mL para desenvolvimento da cromatografia. Para a avaliação e análise dos resultados por utilizado o documentador TLC Visualizer 2 a 245 nm. E a varredura dos picos foi realizada a 263 nm utilizando o TLC Scanner 4.

6.2.6.3 Quantificação da fonte de nitrogênio

O consumo das fontes de nitrogênio foi determinado por método enzimático, utilizando kit da Megazyme K-GCROL 08/18. O procedimento foi realizado de acordo com as instruções do manual do fabricante para análise em microplaca.

6.2.7 Análise estatística

Foi analisada a normalidade dos dados com a prova Shapiro wilk ($\alpha = 0,05$). Aplicou-se uma prova paramétrica (ANOVA, $\alpha = 0,05$) para avaliar se existem diferenças entre as médias dos tratamentos. Por fim, para comparar entre quais tratamento existem diferenças, foi aplicada o test de Tukey-Kramer (Key-Kr). Foi utilizado o software R (versão 3.2.0).

6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 Confirmação da transformação

Com o objetivo de confirmar o processo de transformação de *P. fluorescens*, o micro-organismo foi plaqueado em ágar sangue para verificar a hemólise como um indicador indireto da produção de biossurfactantes. Foram selecionadas varias colônias e plaqueadas pelo método de estriamento para visualizar de forma mais clara a formação do halo de hemólise (Figura 6.2).

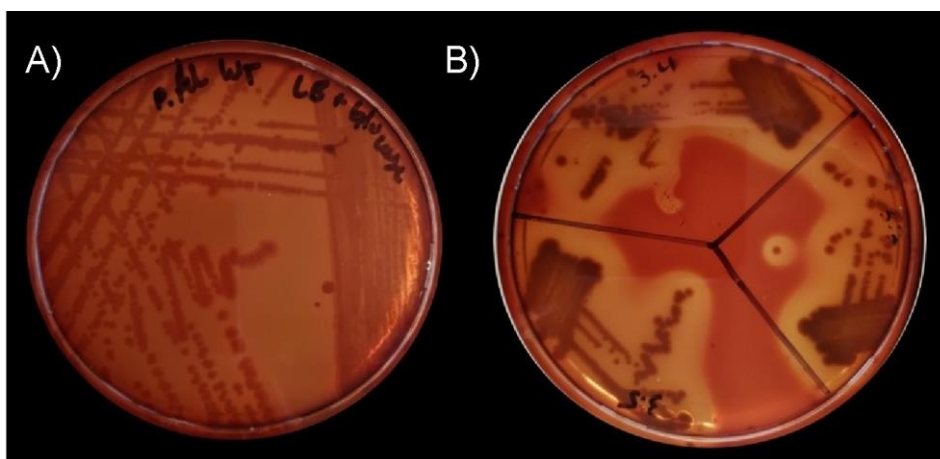


Figura 6.2 Confirmação da transformação, *P. fluorescens* em ágar sangue. A) *P. fluorescens* DSM50090, linhagem selvagem; B) *P. fluorescens* DSM50090 pSynPro_80.

Na literatura são descritos três tipos de hemólise: α , β , e γ . A hemólise alfa (α) ocorre quando uma coloração esverdeada é produzida em torno da colônia. A hemólise Beta (β) ocorre quando um halo mais claro é produzido ao redor da colônia, enquanto Hemólise gama (γ) ocorre quando não há alteração da coloração da colônia ou aparição de halo (RASHEDI et al., 2005b).

A atividade hemolítica é uma das etapas iniciais utilizadas para a seleção de micro-organismos produtores de biossurfactantes (ABDEL-MAWGOUD et al., 2010). Atividade hemolítica de alguns biossurfactantes encontra-se associada à propriedade anfifílica destas moléculas, desestabilizando as membranas e causando lise dos glóbulos vermelhos presentes no meio. Na figura 6.2 A, é apresentada a cultura de *P. fluorescens* selvagem, observa-se a ausência de halos ao redor da colônia, e a coloração da mesma não é esverdeada o que indica, que esta linhagem apresenta uma γ Hemólise. Em contraste como o observado nas colônias transformadas (Figura 6.2 B), que apresentam um halo claro, evidenciando uma β hemólise, o que indica indiretamente a produção de ramnolipídios.

O plasmídeo utilizado, pSynPro_80 otimizado para a expressão do operon *rhIAB* foi idealizado por Wittgens (2013). Para isso foi construída uma biblioteca de sequências de promotores, foram utilizados nucleotídeos aleatórios para a construção do Promotor syn (P_{syn}) fora das regiões conservadas, cada variante do promotor tinha uma sequência diferente, portanto a expressão do operon *rhIAB* na variante do pSynPro8 resultou em concentrações mais altas mono-ramnolípido em comparação

com outro vector, pVLT31_ *rhlAB*, também utilizado para produzir ramnolipídios com *P. putida* (WITTGENS et al., 2011).

6.3.2 Produção de ramnolipídios por *P. fluorescens* e *P. putida* utilizando glicerol como fonte de carbono.

Para fazer uma avaliação inicial do desempenho da linhagem transformada, foi realizado um cultivo com *P. fluorescens* e *P. putida* empregando três concentrações diferentes de glicerol e foram comparados a produção de ramnolipídio, o crescimento microbiano e o consumo de fonte de carbono. Nas três concentrações de glicerol avaliadas nenhum dos dois micro-organismos consumiu totalmente a fonte de carbono (Figuras 6.3 e 6.4).

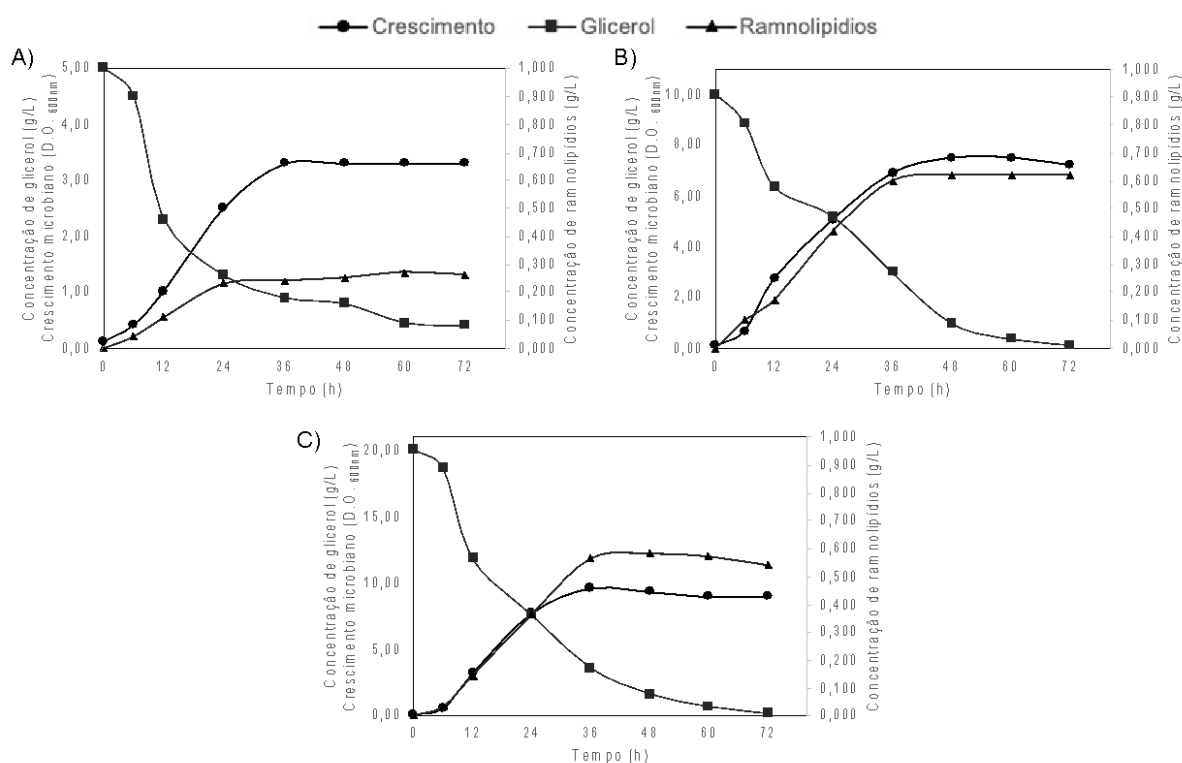


Figura 6.3 Cinética dos cultivos de *P. fluorescens* utilizando A) 5; B) 10; C) 20 g/L de glicerol. (30 °C, 200 rpm, pH inicial 6,8)

No caso de *P. fluorescens*, a fase exponencial foi prolongada até 36 horas nas três concentrações de glicerol. E a bactéria consumiu a fonte de carbono em mais de 90%. Nos cultivos realizados nas concentrações mais altas de glicerol (10 e 20 g/L), *P. fluorescens* consumiu de forma mais rápida a fonte de carbono nas primeiras 48 h, já no cultivo de menor concentração de glicerol a desaceleração aconteceu depois de 60 h.

A partir das 6 h de cultivo foi detectada produção de ramnolipídios. Os títulos mais altos de produção de biossurfactante nos cultivos realizados em 5, 10 e 20 g/L com *P. fluorescens*, foram 0,270, 0,620 e 0,580 g/L de ramnolipídios, respectivamente. Em todos os casos, uma vez atingida a concentração máxima de ramnolipídios e a D.O_{600nm} máxima, esses valores mantiveram-se estáveis. A produção de ramnolipídio por *P. putida* foi maior, atingindo títulos de 0,470, 0,810 e 0,700 g/L de ramnolipídio nas três concentrações de glicerol avaliadas, 5, 10 e 20 g/L, respectivamente.

P. putida desacelerou o consumo de glicerol depois de 36 h, no cultivo com 10 e 20 g/L, já com 5 g/L, essa desaceleração aconteceu só a partir das 48 h. O micro-organismo consumiu 60, 58, 55% da fonte carbono, nos cultivos com 5, 10 e 20 g/L de glicerol respectivamente. Usando 10 e 20 g/L de glicerol, o crescimento de *P. putida* foi significativamente mais baixo que o de *P. fluorescens*.

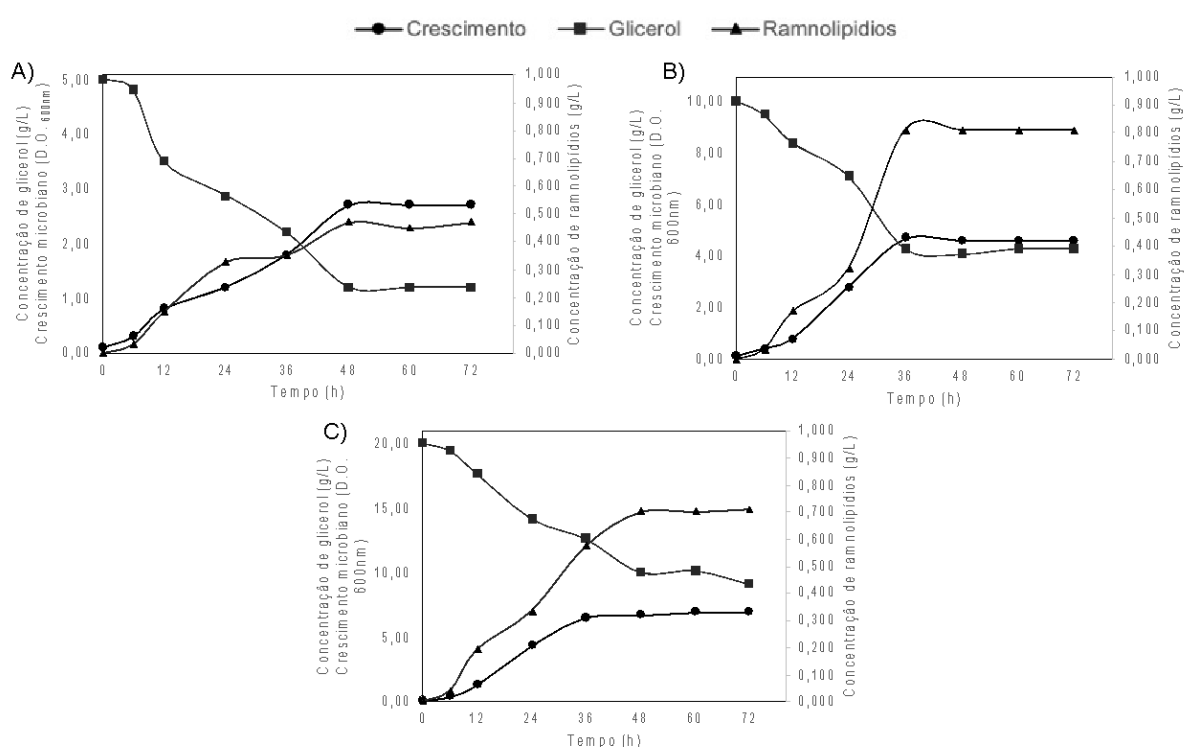


Figura 6.4 Cinética dos cultivos de *P. putida* A) 5; B) 10; C) 20 g/L de glicerol. (30 °C, 200 rpm, pH inicial 6,8)

A velocidade específica de crescimento é um parâmetro importante a ser controlado durante um cultivo, pois representa o comportamento dinâmico dos micro-organismos. O uso da taxa específica de crescimento como parâmetro de controle

implica que o substrato está presente em quantidades suficientes e, portanto, pode atuar como uma ferramenta indireta para o controle do ambiente extracelular (SRIVASTAVA & GUPTA, 2011). A velocidade específica de crescimento em *P. fluorescens* e *P. putida* apresentou um comportamento similar em todas condições, entre as 12 e 48 h de cultivo, observa-se diminuição na velocidade específica de crescimento conforme o micro-organismo entrava na fase estacionária, porém os valores de μ observados são maiores para *P. fluorescens* (Figura 6.5).

Utilizando 5 g/L, *P. putida* apresentou uma diminuição nessa velocidade pois entrou na fase estacionária depois de 24 h. Já foi reportado que a velocidade de crescimento máxima de *P. putida* utilizando glicerol como substrato diminui em comparação com outros substratos como succinato (NIKEL et al., 2014) e que a concentração também é um fator limitante, contrario ao que já foi descrito para *P. fluorescens* que apresenta uma $\mu_{\max}$ alta utilizando glicerol como fonte de carbono, resultado comparável ao obtido utilizando succinato (LIU et al., 2017).

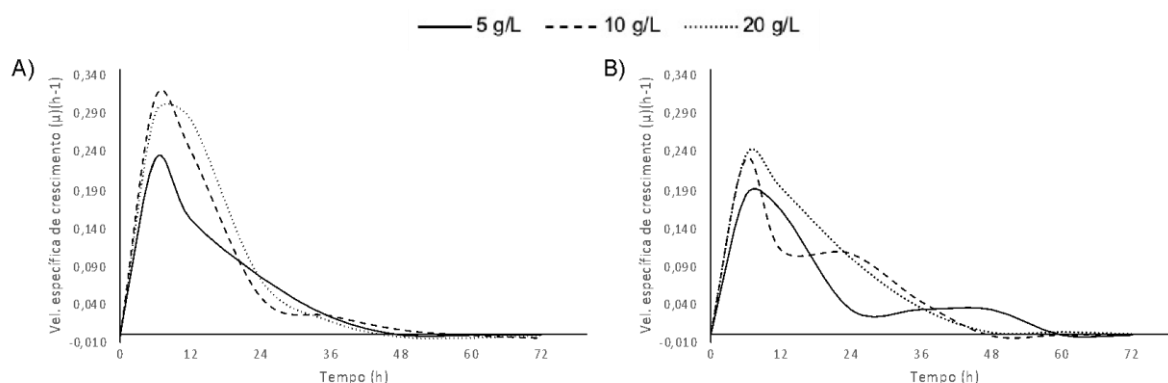


Figura 6.5 Velocidade específica de crescimento de A) *P. fluorescens*; B) *P. putida* utilizando glicerol como fonte de carbono. (30 °C, 200 rpm, pH inicial 6,8)

Os valores mais altos de $Y_{p/s}$ nos cultivos de *P. fluorescens* e *P. putida* foram obtidos empregando 10 g/L e 5 g/L de glicerol, respectivamente (Tabela 6.1). Para *P. fluorescens* a produção máxima foi de 0,62 g/L de ramnolipídio depois de 48 h de cultivo, e o rendimento máximo alcançado, $Y_{p/s}$ de 0,086 g/L. Já, a produção do biossurfactante com *P. putida* foi maior, foram obtidos 0,810 g/L de ramnolipídio, junto com um rendimento $Y_{p/s}$ de 0,148, ambos atingidos após 36 h de cultivo.

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 ($Y_{p/s}$).

	$Y_{p/s}$	
	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i>
5 g/L	0,059 ± 0,009	0,148 ± 0,012*
10 g/L	0,085 ± 0,014*	0,140 ± 0,010
20 g/L	0,034 ± 0,008	0,082 ± 0,009

6.3.3 Influencia da fonte de nitrogênio na produção de ramnolipídios.

O efeito das fontes de nitrogênio e carbono sobre vários aspectos metabólicos de *Pseudomonas fluorescens* tem sido estudado, no comportamento de crescimento (PEIGHAMY et al., 2007; KOCHÉ et al., 2012; ROCA & OLSSON, 2001) e a produção de metabólitos como a proteinase (FAIRBAIRN et al., 1987), a lipase (MAKHZOUN et al., 1995) e o alginato (ERTESVAG et al., 2017) que é um metabólito estreitamente relacionado ao metabolismo do precursor hidrofílico necessário para os ramnolipídios.

A superexpressão do operon *rhlAB* em *P. fluorescens* levou a produção de ramnolipídios de forma heteróloga quando cultivada em condições de limitação de nitrogênio (OCHSNER et al. 1995). Nessa bactéria, uma quantidade baixa, de ramnolipídios foram produzidos (entre 10 e 25% desse produzido pela *P. aeruginosa*), mas o fator limitante na sua produção não foi determinado (OCHSNER et al. 1995). Com base nos resultados anteriores, foram realizados cultivos com *P. fluorescens* avaliando diferentes fontes nitrogênio que têm sido reportadas na literatura para produção de ramnolipídios.

Na figura 6.6 são apresentados os resultados de produção de ramnolipídios, crescimento e consumo de glicerol por *P. fluorescens* utilizando $(NH_4)_2HPO_4$ como fonte de nitrogênio, em diferentes proporções de C/N. A síntese de ramnolipídios foi detectada a partir das 6 horas de cultivo, o maior título de ramnolipídios foi obtido na proporção C/N 7 (Figura 6.6 a), levando a 0,62 g/L de ramnolipídios, e 7,5 de D.O_{600nm} (Figura 6.6 b). O consumo da fonte de carbono melhorou conforme a proporção C/N diminuiu, sendo que na proporção C/N de 7, o micro-organismo consumiu quase 98% da fonte de carbono (Figura 6.6 c). A proporção C/N 35 interferiu negativamente de forma significativa no desempenho do micro-organismo, o seu crescimento, produção de ramnolipídio e no consumo de glicerol.

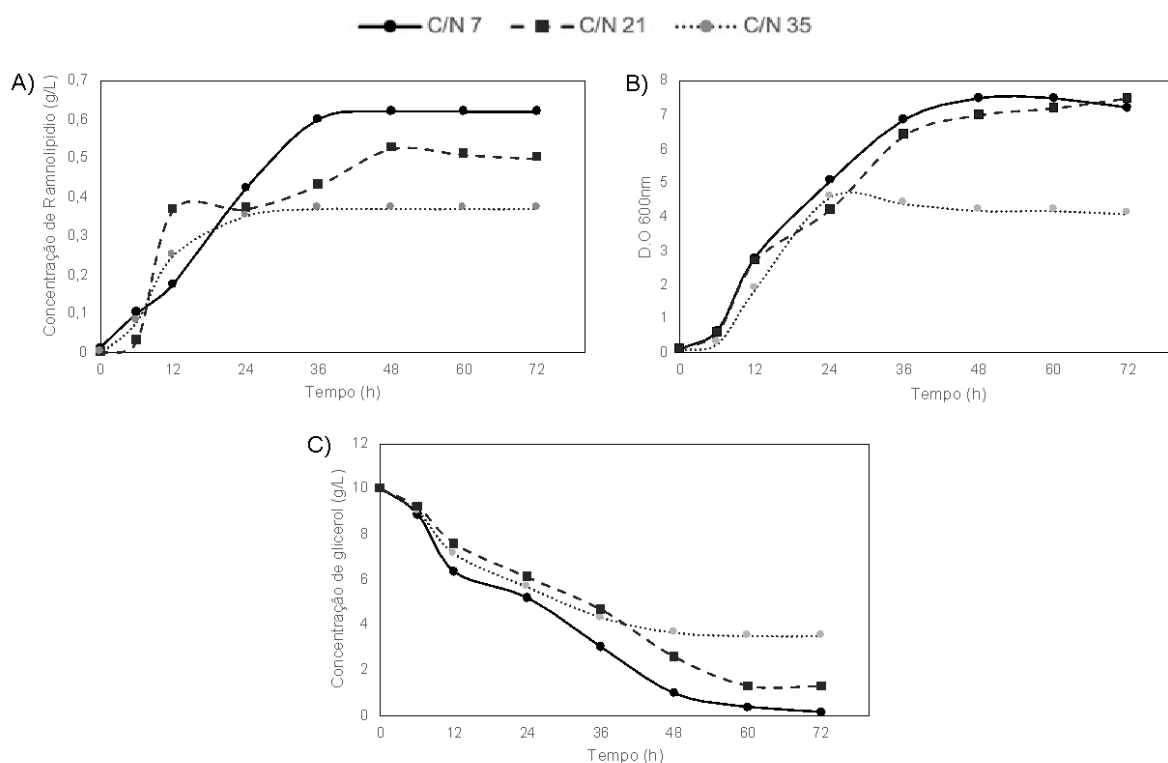


Figura 6.6 Influência da proporção C/N no cultivo de *P. fluorescens* utilizando $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ como fonte de nitrogênio. A) Produção de ramnolipídios; B) Crescimento celular; C) Consumo de glicerol. (30 °C, 200 rpm, pH inicial 6,8)

Quando NH_4Cl , foi utilizado como fonte de nitrogênio, a maior produção de ramnolipídios aconteceu depois das 36 h em todas as proporções C/N. A maior produção de ramnolipídios foi observada com a proporção C/N de 35 (Figura 6.7a), levando a 0,41 g/L de ramnolipídios. Não houve diferenças significativas na produção de ramnolipídios nas três condições avaliadas, utilizando esta fonte de nitrogênio.

Em um dos poucos estudos em que é reportada uma linhagem de *P. fluorescens* produtora de biossurfactantes do tipo ramnolipídico de forma natural, foi avaliada a influência a fonte de nitrogênio e da proporção C/N na produção do biossurfactante (ABOUSEOUD et al., 2008). Os sais de amônia na forma de NH_4Cl favoreceram o crescimento, mas não na produção de biossurfactantes, um padrão parecido foi observado na linhagem avaliada neste estudo, a proporção de C/N não interferiu no crescimento celular, atingindo uma $\text{D.O}_{600\text{nm}}$ máxima de 4,5, 3,5 e 3,8 (C/N 7, 21 e 35, respectivamente). Adicionalmente, o consumo de fonte de carbono foi similar nas três condições avaliadas (Figura 6.7c).

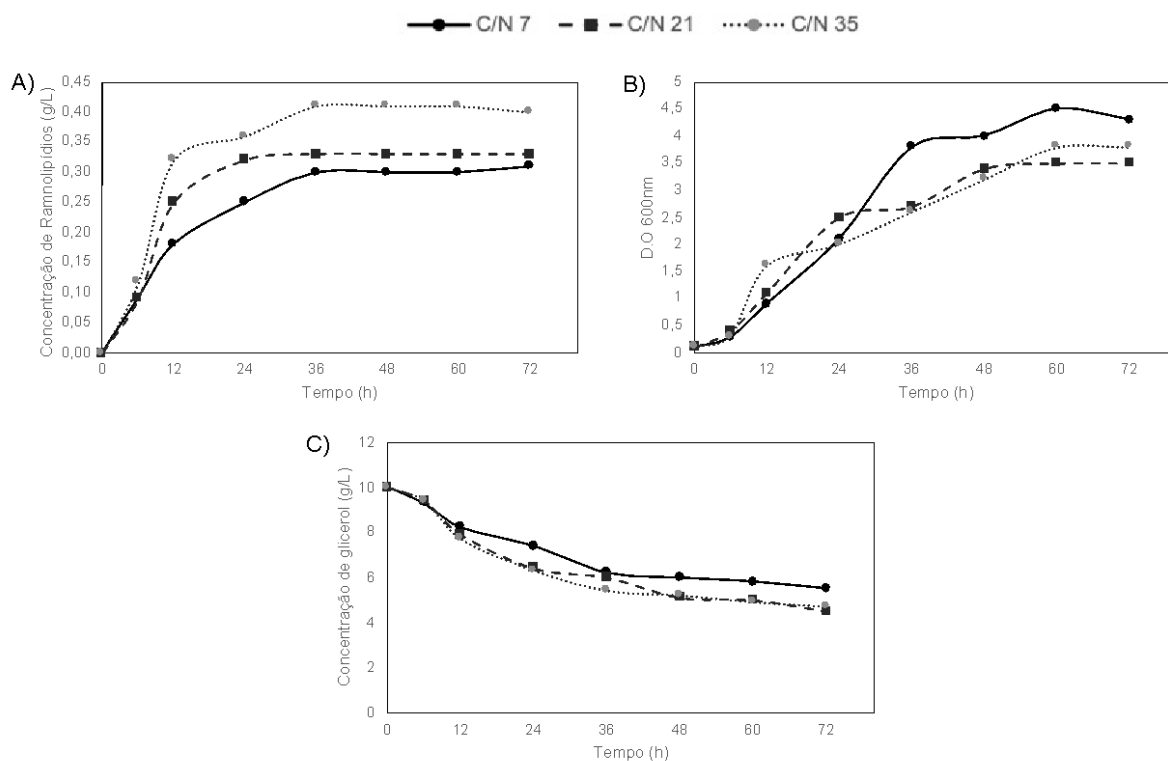


Figura 6.7 Influencia da proporção C/N no cultivo de *P. fluorescens* utilizando NH_4Cl como fonte de nitrogênio. A) Produção de ramnolipídios; B) Crescimento celular; C) Consumo de glicerol. (30 °C, 200 rpm, pH inicial 6,8)

Nos cultivos realizados com ureia, nas proporções C/N 21 e 35 *P. fluorescens* consumiu só 60% da fonte de carbono. Sob estas condições, a produção de ramnolipídio apresentou um padrão parecido nos dois cultivos, foram obtidos 1,58 e 1,53 g/L de ramnolipídios depois de 48 h, respectivamente. Já quando foi utilizada a proporção C/N 7, o crescimento celular ($\text{D.O}_{600\text{nm}}$) foi maior, porém a concentração de ramnolipídios foi a mais baixa, 0,79 g/L (Figura 6.8a).

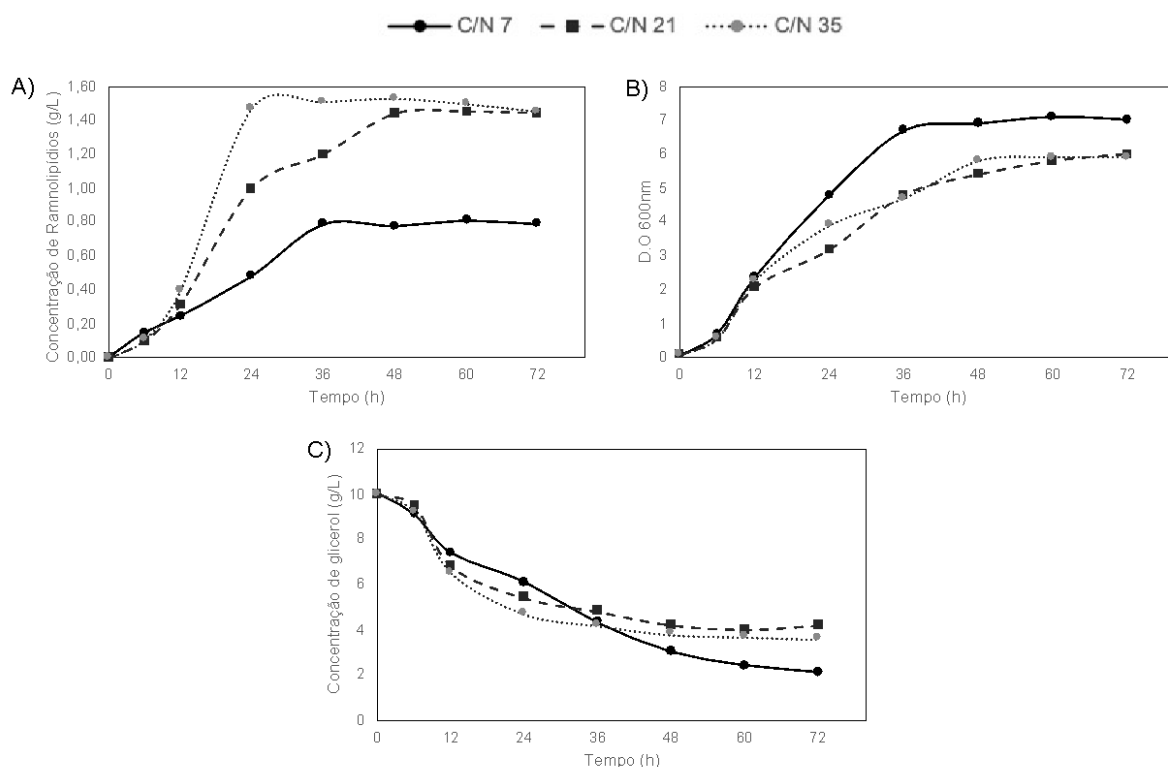


Figura 6.8 Influência da proporção C/N no cultivo de *P. fluorescens* utilizando ureia como fonte de nitrogênio. A) Produção de ramnolipídios; B) Crescimento celular; C) Consumo de glicerol. (30 °C, 200 rpm, pH inicial 6,8)

Com a ultima fonte de nitrogênio avaliada, NaNO_3 , o micro-organismo cresceu mais rapidamente no estágio inicial do cultivo, a densidade óptica aumentou rapidamente durante as primeiras 36 h. A produção máxima de ramnolipídio atingida no cultivo com proporção C/N 35 nas 48 h foi de 1,65 g/L, foi 1,47 e 1,25 vezes maior do que o obtido nas menores proporções de C/N testadas 7 e 21, respectivamente (Figura 6.9a). A proporção de C/N não interferiu no crescimento celular, assim como o consumo de fonte de carbono foi similar nas três condições avaliadas (Figura 6.9b-c).

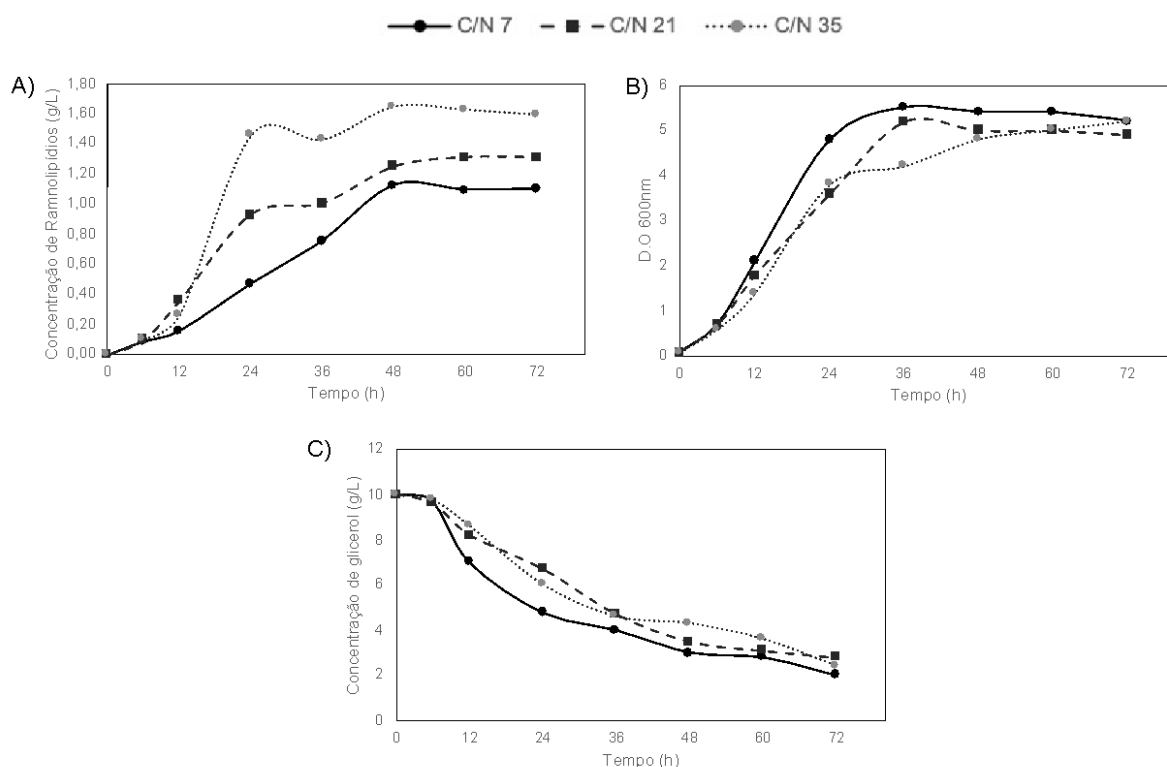


Figura 6.9 Influência da proporção C/N no cultivo de *P. fluorescens* utilizando NaNO_3 como fonte de nitrogênio. A) Produção de ramnolipídios; B) Crescimento celular; C) Consumo de glicerol. (30 °C, 200 rpm, pH inicial 6,8)

Mulligan & Gibbs (1989) estabeleceram uma relação direta entre o metabolismo do nitrogênio e a produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa*. O sistema de dois componentes NtrBC acoplado ao CbrAB está relacionado com a regulação da utilização de fontes de nitrogênio em *P. fluorescens* (Zhang et al., 2008). Em ambas bactérias, a regulação da síntese de alginato está relacionada com ao NtrC.

NtrC foi descrito como um regulador importante de nitrogênio e Hervás et al. (2020) sugerem que ele não só ativa vias para a assimilação de fontes alternativas de nitrogênio, mas também reprime o catabolismo de carbono sob condições limitadas de nitrogênio, possivelmente para evitar o fluxo excessivo de carbono e energia na célula em *P. putida*.

Sob condições de limitação de nitrogênio o fluxo do carbono pode ser direcionado para a conversão de fructose-6-fosfato (F6P) em glicose-6-fosfato (G6P) (LIEN et al., 2013), e depois para glicose-1-fosfato (G1P), que seria o primeiro passo para começar a cascata de expressão do operon *rmIBCAD*, que são os genes

encarregados da síntese dos precursores da porção hidrofílica de ramnolipídios, dTDP–L–ramnose. Isso explica os resultados obtidos nos cultivos realizados com ureia e NaNO_3 onde quanto maior a proporção de C/N, houve maior produção de ramnolipídio.

Por outro lado, sob condições de limitação de nitrogênio, também foi descrita a regulação, dependente de NtrC, de um conjunto de genes envolvidos no acúmulo de polímeros de armazenamento de carbono, tais como poli-hidroxialcanoatos (PHAs) (HERVÁS et al., 2008). Estudos relatam que quando os níveis de fonte de nitrogênio são limitados, as bactérias aumentam a atividade da PHA sintase, a enzima responsável pela produção de PHA (REHM & STEINBÜCHEL, 1999). As vias metabólicas envolvidas na produção de PHA, são as mesmas relacionadas à síntese da porção hidrofóbica dos ramnolipídios.

Os rendimentos de produção de ramnolipídio em relação ao substrato (g/g) são apresentados na figura 6.10. A fonte de nitrogênio influenciou nos rendimentos do micro-organismo, assim como a proporção C/N também apresentou uma influência dependendo da fonte de nitrogênio utilizada.

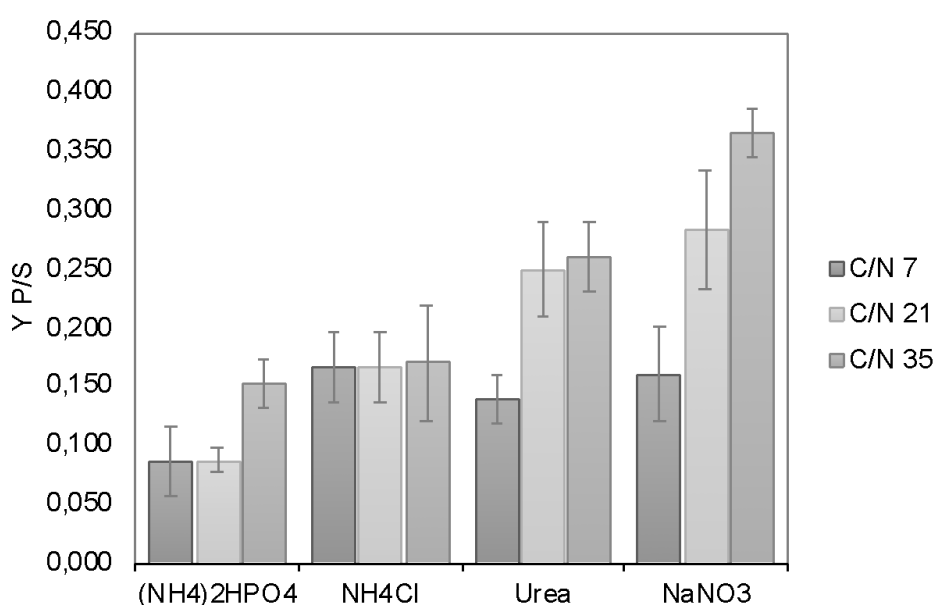


Figura 6.10 Comparação dos rendimentos de produto em relação ao substrato (g/g) com as fontes de nitrogênio avaliadas nas diferentes proporções de C/N utilizadas. (30 °C, 200 rpm, pH inicial 6,8)

Com NH_4Cl como fonte de nitrogênio a proporção de C/N não teve um efeito significativo no rendimento de produção $Y_{p/s}$. O contrario foi observado nos cultivos

realizados com $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, ureia e NaNO_3 , onde a $Y_{p/s}$ aumentou à medida que houve aumento da C/N. O melhor rendimento de conversão p/s foi obtido com NaNO_3 e o mais baixo com $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

Em um estudo realizado com *P. aeruginosa*, o uso de nitrato em uma proporção C/N de 55 apresentou melhor produção do que o uso de amônia na mesma proporção C/N, glicerol como fonte de carbono. Esse resultado condiz com o que foi observada neste estudo, pois, o valor de $Y_{p/s}$ mais alto foi observado com NaNO_3 (0,364) como fonte nitrogênio na proporção C/N 35, esse valor é 4,26 vezes maior do que o observado na condição inicial utilizando $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Este resultado pode ser explicado pelo fato de que o nitrato sofre primeiro uma redução para a amônia e a assimilação pelo metabolismo do glutamina-glutamato. Isto significa que a assimilação do nitrato como fonte de nitrogênio é tão lenta que simularia uma condição de limitação do nitrogênio (RASHEDI et al., 2006).

6.4. CONCLUSÕES

P. fluorescens é apresentada como um possível candidato para produção heteróloga de ramnolipídios com o plasmídeo utilizado. Como estratégia de otimização, uma visão a nível molecular poderia valer a pena, devido a robustez metabólica deste micro-organismo.

Com o fim de obter altas concentrações de ramnolipídios, é necessário otimizar as condições do cultivo. Os resultados apresentados mostraram que o nitrato é mais eficaz na produção de ramnolipídios do que sais de amônia e ureia. A variação na concentração na fonte de carbono teve influência na produção assim como a fonte de nitrogênio. Utilizando glicerol como fonte de carbono e NaNO_3 como fonte de nitrogênio, na proporção C/N 35, favoreceram o aumento na produção do biossurfactante.

Uma estratégia importante seria também determinar outros fatores que influenciam a produção de biomassa, bem como a produção de ramnolipídios, e devem ser realizadas mais experimentos com componentes do meio, por exemplo, a influência de microelementos e do fosfato.

7. CAPITULO 4

BIOCONVERSÃO DE AÇÚCARES PRESENTES EM HIDROLISADOS DE BIOMASSA PARA A PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS POR *Pseudomonas fluorescens*

7.1. INTRODUÇÃO

Devido à quantidade finita de combustíveis fósseis do mundo, a necessidade de encontrar fontes renováveis para geração de energia e de produtos químicos de valor agregado está se tornando cada vez mais importante. Para tratar esta questão, muitas pesquisas estão sendo dirigidas para encontrar novas estratégias compatíveis com este conceito da bioeconomia na conversão da biomassa celulósica de plantas (HOOD et al., 2011; LINGER et al., 2014) .

A valorização dos principais componentes da lignocelulose, incluindo lignina, celulose e hemicelulose, é fundamental para o fortalecimento da bioeconomia. Um dos desafios para a utilização biológica simultânea dos açúcares presentes na biomassa é encontrar micro-organismos robustos que possam não apenas utilizar os açúcares hexoses, como glicose, mas também as pentoses, como xilose, encontrados na celulose e hemicelulose (NAIK et al., 2010). Por exemplo o bagaço de cana de açúcar é composto por aproximadamente 25% de xilose (LINGER et al., 2014). Ao mesmo tempo estes micro-organismos devem ter a capacidade de aproveitar os ácidos orgânicos e compostos aromáticos encontrados na hemicelulose e lignina despolimerizada (DAVIS et al., 2013).

A maioria dos micro-organismos utilizados em engenharia metabólica e biologia sintética são capazes de consumir glicose, alguns tem a capacidade de consumir outros açúcares hidrolisados e compostos derivados da lignina (DE GONZALO et al., 2016). Porém, poucos micro-organismos conseguem utilizar todas as fontes de carbono presentes na biomassa lignocelulósica sem serem inibidos (KUMAR et al., 2009).

Um dos micro-organismos mais estudados para produção heteróloga de ramnolipídios (TISO et al., 2016) e outros produtos de interesse industrial

(LOESCHCKE et al., 2015), *Pseudomonas putida*, possui uma limitação na utilização e co-utilização das cinco fontes de carbono principais da biomassa hidrolisada: glicose da celulose; D-xilose, L-arabinose e ácido acético de hemicelulose; e ácido p-cumárico provenientes da lignina (ELMORE et al., 2020). Esta limitação aumenta os passos necessários no bioprocesso, pois uma grande quantidade de enzimas é necessária para inicialmente conseguir a assimilação do substrato para sintetizar de forma subsequente o produto alvo por meio da expressão heteróloga.

Uma alternativa é o uso de micro-organismos que já possuem a maquinaria necessária para a utilização destes compostos. Vários estudos demonstram a plasticidade metabólica de *Pseudomonas fluorescens* para utilizar hexoses e pentoses como fonte de carbono para a produção de metabolitos de interesse industrial (AREMU et al., 2010; KULKARNI & GADRE, 2002; SLININGER & SHEA-WILBUR, 1995; SUN et al., 2012). Além disso, já foram descritas enzimas produzidas por bactérias desta espécie, que catalisam as reações envolvidas na hidrólise de lignina (YIN et al., 2010; RAHMANPOUR & BUGG, 2015) e no metabolismo dos compostos presentes na lignina, como os ácidos p-cumárico, m-cumárico e ferúlico (GHOSH et al., 2019; RUZZI et al., 1997).

Esta bactéria possui uma maquinaria metabólica que a torna excepcionalmente adequada para obter altos níveis de expressão, assim como tolera uma ampla gama de condições e é capaz de utilizar muitos substratos pouco comuns (RETALLACK et al., 2012). Além disso, os procedimentos de recuperação e purificação depois do processo com *P. fluorescens* são padrão e consistentes com os empregados com outros organismos utilizados na indústria para expressão heteróloga, como *E. coli* (SQUIRES et al., 2004).

Embora *P. fluorescens* tenha sido considerada há muito tempo como um organismo metabolicamente diverso, versátil e não patogênico, até agora não foi seriamente considerado como um hospedeiro para a produção de ramnolipídios de forma heteróloga. Os ramnolipídios, são biossurfactantes e são classificados como glicolipídios, apresentam propriedades físico-químicas que lhes conferem uma alta aplicabilidade na indústria (ABDEL-MAWGOUD et al., 2011). No entanto, a produção destes biossurfactantes, está sendo encaminhada à processos heterólogos pois o maior produtor natural, *P. aeruginosa* é um patógeno oportunista.

Os custos de produção em grande escala deste metabolito ainda são pouco competitivos na indústria; assim a busca de substratos alternativos para a redução de custos aparece como uma estratégia viável (DHANARAJAN & SEN, 2014; CHONG & LI, 2018). O objetivo deste estudo foi produzir ramnolipídios de forma heteróloga usando *Pseudomonas fluorescens* a partir de açúcares presentes em diferentes tipos de biomassa hidrolisada.

7.2. MATERIAL E MÉTODOS

7.2.1 Micro-organismos

Pseudomonas fluorescens DSM 50090 pSynPro_80, foi o micro-organismo utilizado para produção heteróloga de ramnolipídios. É proveniente da coleção de micro-organismos de cultivos celulares do Instituto Leibniz. Foi acondicionado em tubos criogênicos contendo glicerol 20% e armazenado ultra-freezer à -80°C.

7.2.2 Meios de cultura

7.2.2.1 Caldo lisogênico (Lysogenic Broth LB)

A composição dos meios utilizados para o preinóculo dos micro-organismos em (g/L): peptona - 5,0; extrato de carne - 3,0 (CN) e triptona – 10; extrato de levedura – 5,0 e NaCl – 10 (LB).

7.2.2.2 Meio mineral SupM para o pré-inóculo

O meio de cultura utilizado para o preparo do inóculo dos cultivos (BEUKER et al., 2016), era composto por (g/L): Na_2HPO_4 – 4.4 ; KH_2PO_4 – 2 H_2O – 1.5 g L^{-1} ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0.2; $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ – 0.02; FeCl_3 – 0.006. O pH foi ajustado para 6,8 e foi adicionado 1 mL/L da solução de elementos traços (g/L): H_3BO_3 – 0.3; $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ – 0.2; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0.1; $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ – 0.03; $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ – 0.01; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ – 0.03; $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ – 0.02. Como fonte de carbono foi utilizado arabinose, glicose, manose e/ou xilose, na metade da concentração utilizada no cultivo para produção de ramnolipídios.

7.2.2.3 Meio mineral ModR

Para a produção de ramnolipídios em frascos foi utilizado o meio utilizado por Beuker et al. (2016) (g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 2.6; KH_2PO_4 – 22; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – 1.4;

$C_6H_8O_7$ – 0.87; $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ – 0.01, o pH foi ajustado para 6.8. O volume e a composição da solução de elementos traços utilizados foram os mesmos descritos no item anterior. Arabinose, glicose, manose e/ou xilose foram utilizados como fonte de carbono. Foram realizados três experimentos: um experimento inicial com 10 g/L de cada açúcar; um segundo onde foram utilizados todos os açúcares no meio, cada um na concentração de 2,5 g/L e finalmente foi simulada a composição de quatro tipos de biomassa hidrolisada, as concentrações dos açúcares são apresentadas na tabela 7.1. O volume e a composição da solução de elementos traços utilizados foram os mesmos descritos no item anterior.

Tabela 7.1 Concentração da fonte de carbono dos meios de cultivo simulando a composição de biomassa hidrolisada. Baseado em Hood et al. (2012).

TIPO DE BIOMASSA	CONCENTRAÇÃO DOS AÇÚCARES (g/L)			
	Arabinose	Glicose	Manose	Xilose
Resíduo da agricultura (bagaço de cana de açúcar) (ra)	0,92	0,55	N/A	8,51
Cultivo energético (<i>Mischantus</i>) (ce)	0,20	7,50	N/A	2,30
Cultivo de madeira (abeto) (cm)	N/A	7,20	2,2	0,60

N/A: não aplica

7.2.3 Condições de cultivo

7.2.3.1 Preparo do Inoculo

O micro-organismo foi cultivado em frascos Erlenmeyer de 100 ml contendo 10 mL de meio LB. A incubação foi realizada em mesa agitadora, durante 24 horas à 30°C e 180 rpm. Em seguida foram transferidos 1 mL do pré-inóculo para frascos de 500 ml com 50 mL de SupM e incubado por 24 horas à 30°C e 200 rpm.

7.2.3.2 Produção de Ramnolipídios em frasco

Foram conduzidos experimentos em frascos Erlenmeyer de 1 L para avaliar a cinética de crescimento, produção de ramnolipídios e consumo da fonte de carbono por parte dos micro-organismos. Do inoculo crescido em SupM foi medida a densidade óptica (D.O) à 600nm, sendo a densidade óptica inicial do inoculo padronizada para 0,1. O inóculo foi transferido para os frascos de 1L, contendo 100 mL de meio ModR. O cultivo foi mantido em mesa agitadora à 200 rpm, 37°C durante 96 horas. Cada cultivo foi feito em triplicata.

7.2.4 Métodos Analíticos

7.2.4.1 Processamento das amostras

Foram retiradas amostras de 5 mL, das quais 1 mL foi utilizado para avaliar o crescimento microbiano medindo a D.O. à 600 nm, 3 mL restantes foram centrifugados à 4700 rpm, 4°C e 20 min para que ocorresse separação das 2 fases: células / fase aquosa, destinados para a quantificação de ramnolipídios e fonte de carbono. E 1 mL foi utilizado para quantificar alginato, como descrito a seguir.

7.2.4.2 Avaliação da produção de ramnolipídios

Extração de ramnolipídios

À uma alíquota de 2 ml da fase aquosa adicionou-se 20 µL de H₃PO₄ 85% (v/v) (1:100), foram adicionados 2,5 mL de acetato de etila (1,25:1) e centrifugou-se à 4700 rpm, 4°C e 15 min. Das duas fases obtidas, 1,5 mL da fase superior foi separada e o procedimento de extração foi repetido com a fase inferior. Após a extração o solvente foi evaporado em uma centrifuga à vácuo por 40 min, à 40°C e 10 mbar. O ramnolipídio foi ressuspenso em acetonitrila.

Derivatização dos ramnolipídios

Para a derivatização foi utilizado 90 µL de amostra, foi adicionado 40 µL de uma solução 1:1 de brometo de 4-bromofenacil 135 mM e trietilamina 67,5 mM, ambos em acetonitrila e foi adicionado 270 µL com acetonitrila. A diluição apropriada da amostra foi realizada em acetonitrila. A derivatização foi feita durante 1,5 h à 60°C e 1400 rpm, em um aquecedor de bloco seco (Thermomixer comfort, Eppendorf AG).

Determinação da produção de Ramnolipídios – Cromatografia em Camada Delgada de Alta eficiência (HPTLC)

A HPTLC foi realizada utilizando placas de sílica-gel 60 com indicador de fluorescência 254 nm. A amostra foi aplicada nas placas utilizando o aplicador automático de TLC (ATS 4). Em cada placa foi aplicado: 0,5 µL; 1 µL; 5 µL; 10 µL do padrão de di-ramnolipídio (RL3) para realizar a curva padrão de 0,125 - 3,75 µg de ramnolipídio, 5 µL de mono-ramnolipídio (RL1) como controle e 0,5-8 µL das amostras a serem analisadas. Para o desenvolvimento da cromatografia foi utilizada uma cuba de desenvolvimento automático (ADC2), utilizando 35 mL de fase móvel: Isopropilacetato, etanol, água, ácido acético glacial (32:5:2,5:1), sendo 25 mL para

saturação, e 10 mL para desenvolvimento da cromatografia. Para a avaliação e análise dos resultados por utilizado o documentador TLC Visualizer 2 a 245 nm. E a varredura dos picos foi realizada a 263 nm utilizando o TLC Scanner 4.

7.2.4.3 Quantificação da fonte de carbono

O consumo dos açúcares foi determinado por método enzimático, utilizando os kit da Megazyme. Para arabinose foi utilizado o kit K-ARAB, para glicose e manose o kit utilizado foi K-MANGL e para quantificação de xilose foi utilizado K-XYLOSE. O procedimento foi realizado de acordo com as instruções do manual do fabricante para análise em microplaca.

7.2.4.4 Quantificação de alginato

O alginato foi extraído como descrito por Limoli et al. (2017). A amostra foi misturada com o mesmo volume de 0,85% de solução salina e centrifugada a 12000 rpm x 10 min. O sobrenadante foi misturado com 2% de cloreto de cetilpiridínio (1:1), agitado por 5 min e o alginato precipitado foi coletado por centrifugação (12.000 rpm durante 10 min à temperatura ambiente). O pellet obtido foi ressuspensionado em NaCl 1M e precipitado novamente com isopropanol. O alginato foi recuperado por centrifugação e ressuspensionado em NaCl 0,85% à temperatura ambiente.

A quantificação foi realizada utilizando o método do carbazol, (KNUSTON & JEANES, 1968; CESARETTI et al., 2003), com pequenas modificações. 50 µl da solução de alginato em NaCl 0,85% foram adicionada à 200 µl de H₃BO₃ 10 mM (em H₂SO₄ concentrado) e 50 µl de reagente de carbazol 0,1% (em etanol). A mistura foi incubada a 100°C durante 10 min, e a absorbância a 550 nm foi determinada espectrofotometricamente. A concentração de alginato foi determinada por extrapolação a partir de uma curva padrão (0 a 10 mg/ml) de ácido algínico.

7.2.5 Análise estatística

Foi analisada a normalidade dos dados com a prova Shapiro wilk ($\alpha = 0,05$). Aplicou-se uma prova paramétrica (ANOVA, $\alpha = 0,05$) para avaliar se existem diferenças entre as médias dos tratamentos. Por fim, para comparar entre quais tratamento existem diferenças, foi aplicada o test de Tukey-Kramer (Key-Kr). Foi utilizado o software R (versão 3.2.0).

7.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.3.1 Produção de ramnolipídios empregando hexoses e pentoses presentes em biomassa da indústria da bioenergia

Pseudomonas fluorescens foi cultivada em meios de cultivo com diferentes monossacarídeos relacionados à lignocelulose, duas hexoses (glicose e manose) e duas pentoses (arabinose e xilose). A cinética de crescimento do micro-organismo nas diferentes condições de cultivo é apresentada nas figuras 7.1 e 7.2, respectivamente.

Tanto com as hexoses quanto com as pentoses foi evidenciado crescimento, indicando a capacidade do micro-organismo de consumir os açúcares avaliados. Houve uma fase de adaptação curta, entre 0 – 12 h e foram observadas fases exponenciais até às 60 h no meio com glicose e até às 72 h no caso dos meios com manose, arabinose e xilose. O maior crescimento foi atingido usando glicose com uma $D.O_{600nm}$ máxima de $6,60 \pm 0,25$, depois ao entrar na fase estacionária ocorreu a produção máxima de ramnolipídio e de alginato. O micro-organismo consumiu 89,5 % da glicose presente no meio.

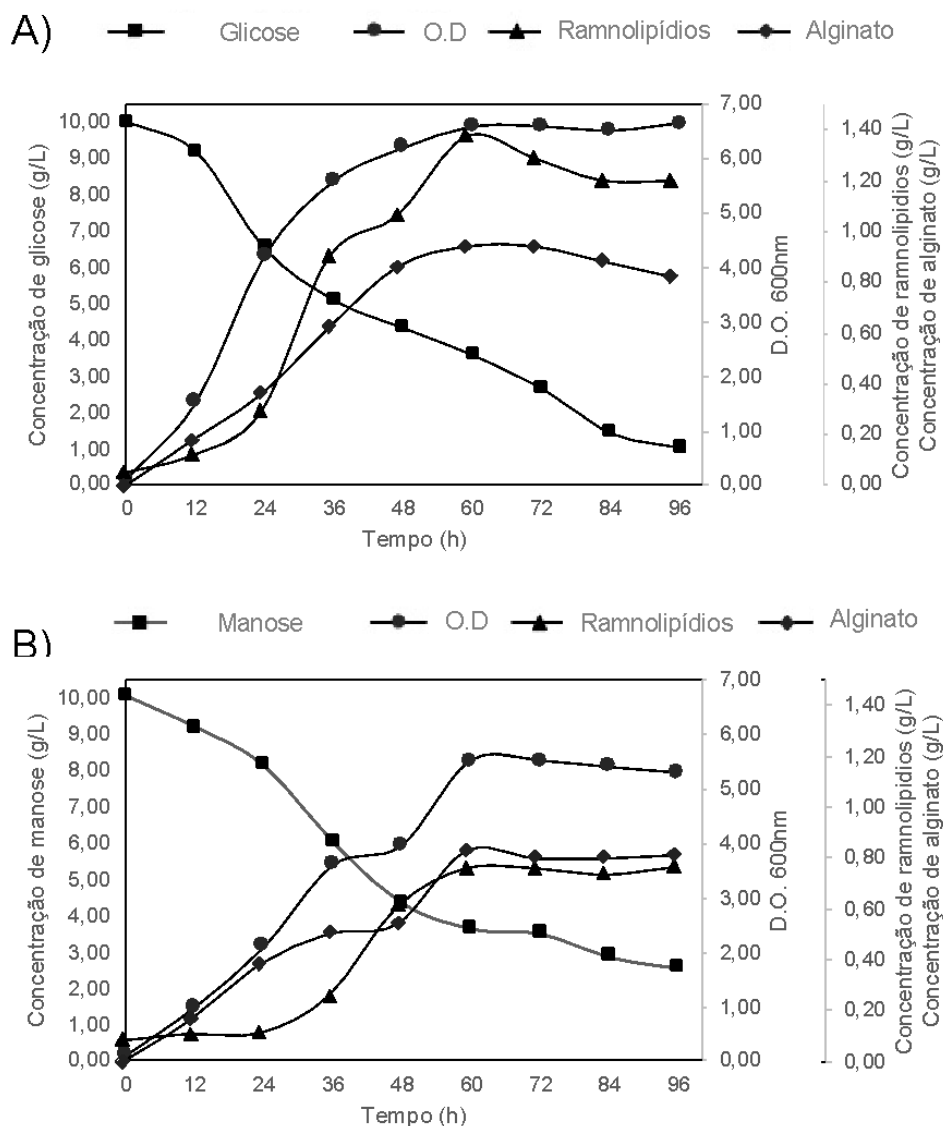


Figura 7.1 Cinética do cultivo de *P. fluorescens* utilizando as hexoses A) Glicose; B) Manose como fonte de carbono. (30 °C, 200 rpm, pH inicial 6,8)

No cultivo com manose a fase estacionária foi atingida após 72 h e uma $D.O_{600nm}$ de $5,52 \pm 0,35$, com 48 h de cultivo a produção máxima de alginato e ramnolipídio coincidiu também com o início da fase estacionária de crescimento e ao final do bioprocesso, *P. fluorescens* consumiu 79,5 % do açúcar. Houve uma diferença significativa ($p \leq 0,05$) na produção de ramnolipídio e alginato utilizando cada hexose como fonte de carbono. Com glicose, *P. fluorescens* produziu 1,76 e 1,10 vezes mais ramnolipídios e alginato, respectivamente.

Os rendimentos de conversão produto-substrato (para ramnolipídio: $Y_{PRL/S}$ e para alginato: $Y_{PALG/S}$) apresentaram diferença entre as fontes de carbono, com glicose

o rendimento de conversão do açúcar para ramnolipídio foi maior ($Y_{\text{PRL/S}}=0,20$), já o rendimento de conversão de substrato para alginato foi maior utilizando manose como fonte de carbono ($Y_{\text{PALG/S}}=0,20$). *P. fluorescens* é capaz de utilizar hexoses como frutose e glicose para produzir alginato, e os melhores rendimentos de conversão foram obtidos com frutose (CONTI et al., 1994).

Neste estudo, nos cultivos com manose, onde foi obtida uma produção maior de alginato com respeito ao ramnolipídio e cujo rendimento de conversão produto-substrato ($Y_{\text{PALG/S}}$) foi maior em comparação com os outros açúcares avaliados, é provável que o carbono seja direcionado para a síntese de alginato. Devido à falta de anotação de genes associados ao metabolismo da manose, uma hipótese, para *P. protegens* Pf-5 (anteriormente conhecida como *P. fluorescens*) é que esse açúcar sofre o mesmo processo catabólico que a frutose, pois sofre uma isomerização para frutose (WILKES et al., 2018) o que implicaria uma assimilação com menos passos enzimáticos para a síntese da GDP-M, precursor principal do alginato, em comparação com os outros açúcares.

Utilizando pentoses, o micro-organismo apresentou um comportamento parecido em ambas condições, atingiu a fase estacionária às 72 h de cultivo, com D.O_{600nm} de $3,00 \pm 0,02$ e $2,70 \pm 0,14$, em arabinose e xilose respectivamente. A produção máxima de ramnolipídio (0,38 e 1,22 g/L) e de alginato (0,60 e 0,18 g/L) aconteceu antes de entrar na fase estacionária e o micro-organismo consumiu 80% da fonte de carbono, em ambos casos.

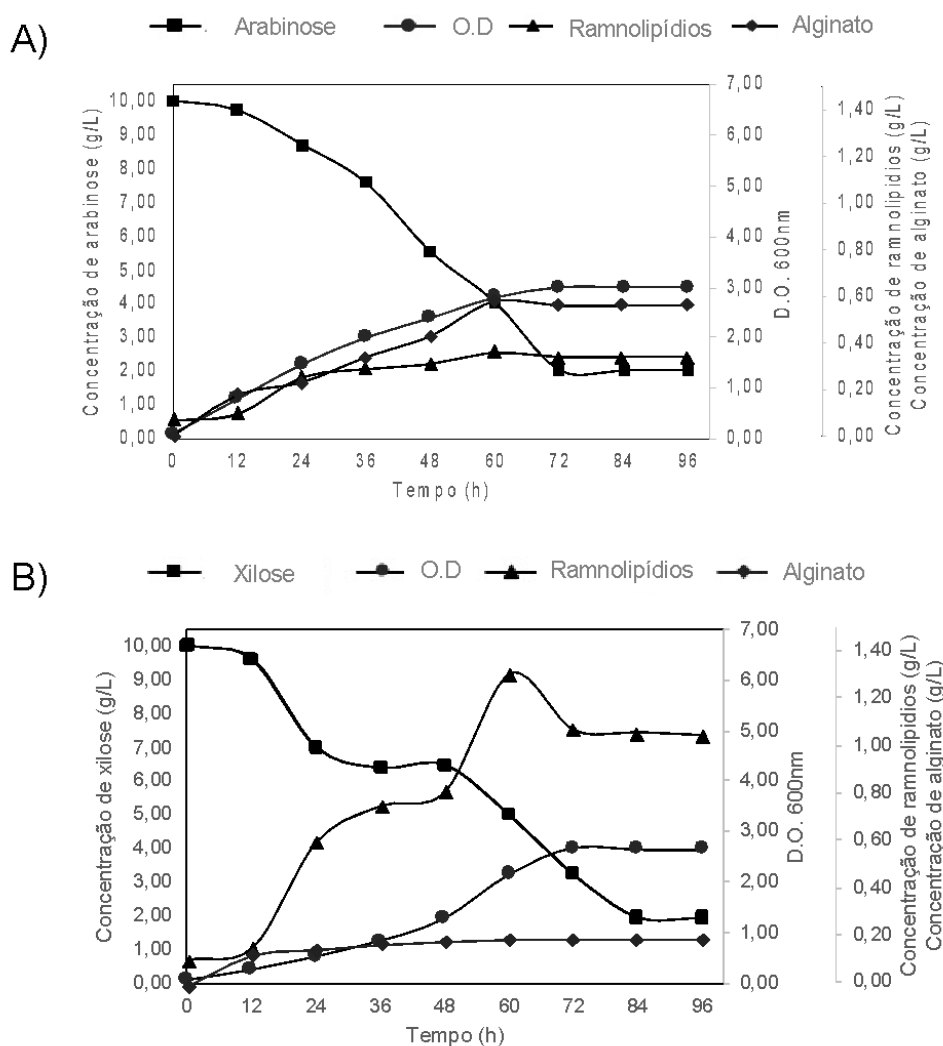


Figura 7.2 Cinética do cultivo de *P. fluorescens* utilizando as pentoses A) Arabinose; B) Xilose como fonte de carbono. (30 °C, 200 rpm, pH inicial 6,8)

Os açúcares, tanto pentoses quanto hexoses, como os utilizados neste estudo foram avaliados em *P. fluorescens* e estimularam a produção de exopolissacarídeo associado a biofilme (KAMALI e tal., 2011), várias das vias metabólicas que envolvem a síntese de alginato, servem como vias precursoras para a síntese de ramnolipídio.

O alginato é um polissacarídeo composto de proporções variáveis de ácido β -d-mannurônico (M) e α -l-ácido gulurônico (G). Dois gêneros de bactérias, *Pseudomonas* e *Azotobacter*, são capazes de produzir alginato (LIEN et al., 2013; MALEKI et al., 2017). *P. fluorescens* é um dos micro-organismos melhor caracterizados na produção de alginato (GACESO, 1998; MALEKI et al., 2017).

A biossíntese de alginato usa frutose-6-fosfato (F6P) como precursor para gerar o ácido GDP-mannurônico. A F6P é convertida em manose-6-fosfato (M6P) por AlgA, antes da conversão adicional em manose-1-fosfato (M1P) por AlgC. A M1P é então convertida pela enzima bifuncional AlgA em GDP-manose (GDP-M), antes de GDP-M ser ainda oxidado por AlgD para GDP ácido manurônico (GDP-Mu), o precursor direto da polimerização (LIEN et al., 2013).

Em *P. aeruginosa*, AlgC é uma enzima chave que fornece precursores de açúcar para a síntese de alginato, de lipopolissacarídeos (LPS), no caso dos ramnolipídios é também exigida tanto para a produção de Psl como para a produção de Pel, sendo que há uma competição entre as vias metabólicas da síntese destes produtos. (RASAMIRAKA et al., 2015; COYNE et al., 1994). Ao aumentar a produção de Psl e Pel a produção de alginato diminuiu (MA et al., 2012), o que também foi observado nos resultados aqui apresentados no caso da produção heteróloga de ramnolipídios versus a produção de alginato.

Os micro-organismos do gênero *Pseudomonas* são encontrados em vários ambientes nutricionais e têm forte potencial catalítico devido à suas diversas capacidades metabólicas (WILKES et al., 2018). Para estudar a capacidade de *P. fluorescens* para co-utilização de diferentes açúcares, foi avaliado um cultivo com glicose, manose, arabinose e xilose, todos na mesma concentração. Foi atingida uma D.O_{600nm} máxima de $5,25 \pm 0,36$; o micro-organismo entrou na fase estacionária depois de 60 h de cultivo. A produção máxima de alginato e ramnolipídios foi atingida depois de 48 h, conseguindo títulos de $0,38 \pm 0,11$ g/L do biossurfactante e $0,31 \pm 0,05$ g/L do exopolissacarídeo.

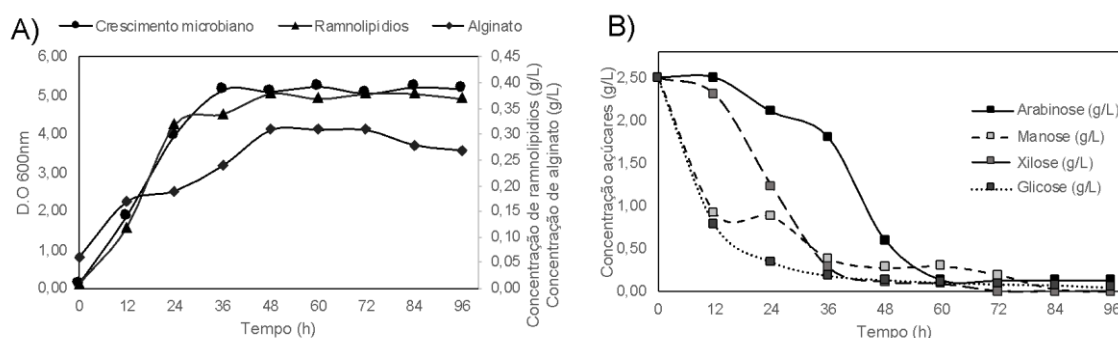


Figura 7.3 Cinética do cultivo de *P. fluorescens* realizado utilizando os quatro açúcares juntos: arabinose, glicose, manose e xilose (2,5 g/L, cada um). A) Crescimento, produção de ramnolipídios e produção de alginato; B) Consumo da fonte de carbono. (30 °C, 200 rpm, pH inicial 6,8)

A glicose e manose foram consumidas de forma mais rápida nas primeiras 12 h de cultivo. Entre 12 – 24 h do bioprocesso o consumo de manose apresentou uma desaceleração, evidenciando uma preferência de *P. fluorescens* na utilização da glicose (Figura 7.3). Depois das 24 h de cultivo o micro-organismo começou a aproveitar os outros açúcares presentes no meio, sendo que após 36 h, 98% da glicose tinha sido consumida, e *P. fluorescens* atingiu a fase estacionária.

Nas primeiras horas, a velocidade específica de consumo das pentoses foi menor em comparação com as hexoses, depois a xilose começou a ser consumida de forma mais rápida entre 24 – 36 h de cultivo, depois desse tempo a velocidade específica de consumo da arabinose aumentou (Figura 7.4). A xilose, embora sendo um açúcar abundante na natureza; em geral quando utilizada como fonte de carbono apresenta um crescimento microbiano relativamente lento. Portanto, faz sentido que a expressão dos genes *xut*, que codificam para a assimilação e metabolismo deste açúcar, esteja sujeita à repressão pela presença de outras fontes de carbono no mesmo meio (LIU et al., 2015).

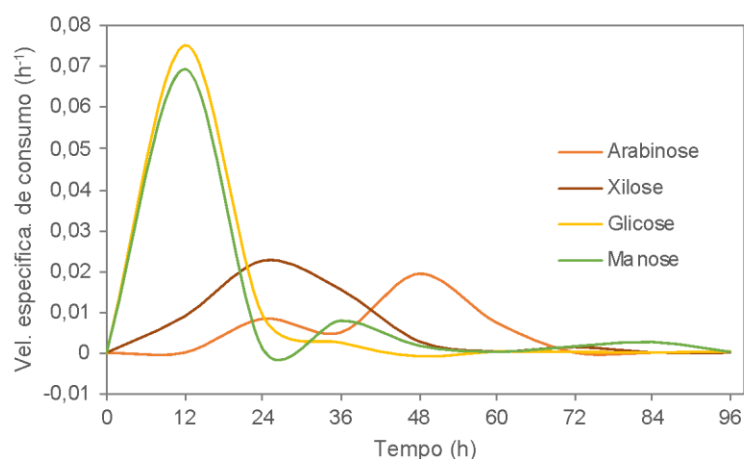


Figura 7.4 Velocidade específica de consumo os quatro açúcares juntos: arabinose, glicose, manose e xilose (2,5 g/L, cada um). (30 °C, 200 rpm, pH inicial 6,8)

7.3.2 Produção de ramnolipídios simulando a composição de açúcares de três tipos de biomassa hidrolisada

Nos meios onde as hexoses predominaram, CE e CM, foi obtido um crescimento maior, com densidades ópticas (600nm) de $5,27 \pm 0,24$ e $5,17 \pm 0,11$, respectivamente (Figura 7.5 C e E) e em ambos os meios, o micro-organismo atingiu a fase estacionária depois de 48 h de cultivo (Figura 7.5 D e F). Já no meio RA, onde a xilose foi o açúcar predominante, foi obtida uma $D.O_{600nm}$ de $4,89 \pm 0,14$, e a fase estacionária foi atingida depois de 60 h (Figura 7.5 A e B).

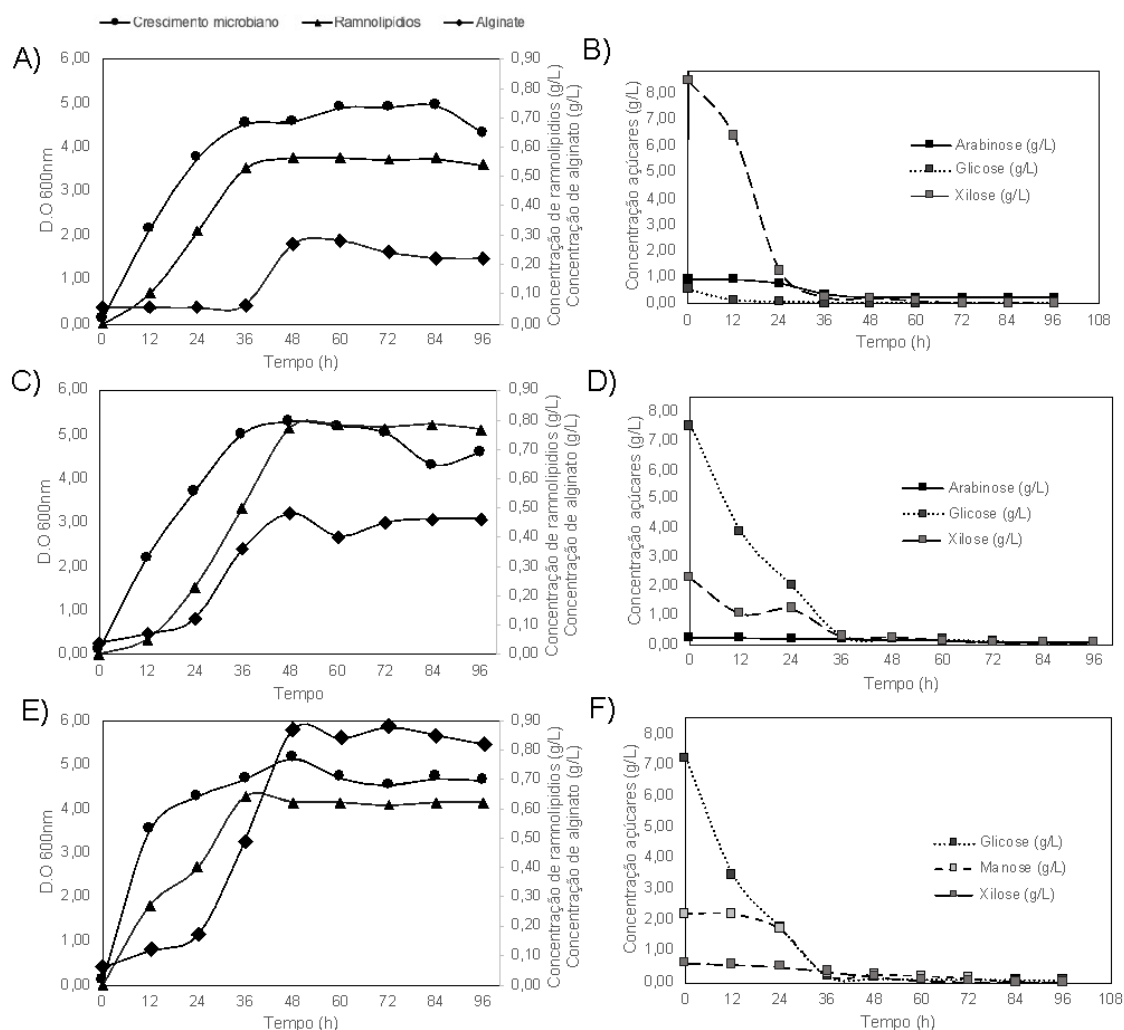


Figura 7.5 Cinética dos cultivos de *P. fluorescens* simulando a composição de açúcares de hidrolisado de resíduo da agricultura (bagaço de cana) – meio RA (A,B); biomassa de cultivos energéticos (*Mischanthus*) – meio CE (C,D); biomassa de madeira (Abeto) – meio CM (E,F). (30 °C, 200 rpm, pH inicial 6,8)

A produção de rhamnolipídios foi influenciada pela presença de hexoses nos meios onde havia maior concentração de glicose, títulos mais altos de rhamnolipídios foram atingidos, $0,77 \pm 0,20$ g/L e $0,64 \pm 0,17$ g/L nos meios CE e CM, respectivamente (Figura 7.5 C e E). O mesmo padrão foi observado na produção de alginato, apesar do rhamnolipídio ter sido produzido em menor quantidade. Contudo, no meio RA, que tinha uma concentração mais alta de xilose inicial, a produção de alginato foi significativamente ($p \leq 0,05$) menor.

Como mencionado anteriormente, a via metabólica que leva a biossíntese de precursor hidrofílico do rhamnolipídio compete com à via de síntese de LPS (COYNE

et al., 1994). Foi evidenciado que diferentes concentrações de fontes de carbono no mesmo meio afetam a produção de LPS (SMITH, 1973). A partir desses resultados foi observado que a concentração de glicose tem um efeito maior na produção de LPS do que outras fontes de carbono, e o LPS obtido apresentou o dobro de unidades de ramnose (SMITH, 1973). Esta evidência poderia explicar a diferença na produção de ramnolipídio entre os meios CE e CM com respeito ao meio RA, que tinha um menor conteúdo de glicose.

Nas 3 condições estudadas, a glicose foi consumida mais rapidamente nas primeiras 12 h de cultivo contribuindo com o rápido crescimento do micro-organismo (Figura 7.6). Uma mudança diáuxica foi observada em todos os cultivos, somente após o esgotamento da glicose é que as pentoses foram consumidas. Quando da presença de xilose e arabinose, além de glicose, as pentoses foram utilizadas quase de forma simultânea, comportamento já descrito em *P. putida* S12 engenherada para a utilização eficiente de xilose e arabinose (MEIJNEN et al., 2008).

No meio RA, nas primeiras 12 h de cultivo foi consumido o 80% da glicose, nesse período de tempo o consumo de arabinose e xilose aconteceu de forma mais lenta. A partir de 24 h de cultivo a velocidade específica de consumo aumentou para a xilose que era o açúcar predominante, e em 36 h só restava 2% do açúcar no meio. O último pico de consumo foi observado para arabinose que aconteceu às 36 h de cultivo, foi consumido 78 % do açúcar (Figura 7.6 A). A assimilação preferencial da glicose em presença de xilose, arabinose, ou galactose foi descrita em *P. fluorescens*, todavia, quando a glicose era alimentada simultaneamente com frutose ou manose, a co-absorção destas hexoses era evidente, mas a glicose era preferível à frutose (3 para 1) e à manose (4 para 1), o que sugere um sistema de repressão catabólica (WILKES et al., 2018) e uso hierárquico das fontes de carbono (LA ROSA et al., 2015)

Foi observado um padrão parecido no consumo dos açúcares presentes no meio CE, primeiro foi consumida a glicose, sendo que após 36 h de cultivo 96% deste açúcar tinha sido consumido. Depois de 12 h, a velocidade específica de consumo da xilose aumentou, sendo que com 48 h de cultivo restava 10% da pentose. E por último observou-se em 60 h de cultivo a maior velocidade específica para a arabinose, sendo que o consumo desta pentose ficou em 75% (Figura 7.6B).

No caso do meio CM, onde havia duas hexoses e uma pentose, o micro-organismo consumiu as hexoses nas primeiras horas, começando pela glicose, depois a manose e finalmente a velocidade específica de consumo para a xilose aumentou entre 36 e 48 h de cultivo (Figura 7.6C).

A glicose é metabolizada através da via Entner-Doudoroff, e pentoses como xilose e arabinose podem ser metabolizadas através da via de pentose fosfato ou também pela via não fosforilativa (Weimberg) (WEIMBERG, 1961; GONZALES & ANTONIEWICZ, 2017). A mudança entre estas duas vias metabólicas depende da fonte de carbono disponível (WILKES et al., 2019; MALEKI et al., 2015), sendo uma razão para explicar as curvas de crescimento. Em presença de hexoses há uma priorização para produção de energia e biomassa e após consumo das mesmas, as pentoses são metabolizadas e convertidas em precursores para a biossíntese de ramnolipídios.

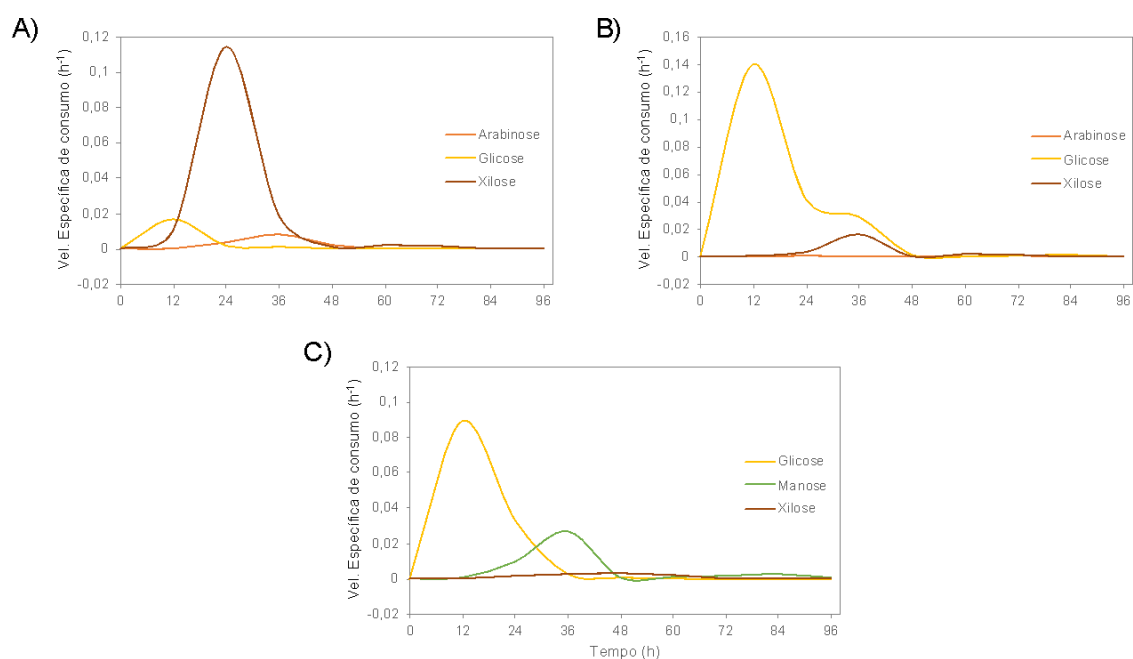


Figura 7.6 Velocidade específica de consumo da fonte de carbono. A) meio RA; B) Meio CE; C) Meio CM. (30 °C, 200 rpm, pH inicial 6,8)

Além disso, podem ocorrer extensas mudanças nos níveis de expressão dos genes envolvidos nas vias envolvidas no metabolismo destes açúcares, que são possivelmente responsáveis pelas diferenças na utilização da xilose e arabinose (MEIJNEN et al., 2008), como evidenciado na Figura 7.6a e 7.6b ao ocorrer aumento da velocidade específica primeiro da xilose e subsequentemente da arabinose.

Estudos utilizando *P. putida* KT2440 engenherada para assimilar xilose e arabinose junto com outros açúcares como glicose ou celobiose (BERTRAND et al., 1990; WANG et al., 2019; BATOR et al., 2020; DVOŘÁK et al., 2018) demonstram a plasticidade genética do gênero *Pseudomonas* na co-utilização de diferentes substratos de forma eficiente. Horlamus et al. (2018), observaram que dentre as hexoses que avaliaram a glicose foi a fonte de carbono com melhores resultados para o crescimento e observaram o mesmo comportamento com xilose, em concordância com os resultados aqui obtidos a partir dos meios simulados, onde predominaram esses dois açúcares.

7.4 CONCLUSÕES

Neste estudo, foi avaliado o potencial da bactéria não patogênica *Pseudomonas fluorescens* como uma cepa hospedeira para a bioconversão de açúcares presentes em diferentes tipos de biomassa em ramnolipídios. As concentrações alcançadas de ramnolipídios de 1,37 e 0,77 g/L ao utilizar glicose como única fonte de carbono e ao simular a proporção de açúcares presentes em biomassa de cultivo energético, como relatado neste estudo, ainda são comparativamente baixas, o que mostra que, como uma possível cepa hospedeira para a bioeconomia, muitos desafios ainda precisam ser superados. No entanto, este estudo sugere o alto potencial de *P. fluorescens* e fornece uma prova de conceito inicial para a produção de ramnolipídios a partir de açúcares presentes em diferentes tipos de biomassa hidrolisada.

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.; WITTEGENS, 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 *Pandoraea* 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) alkanolate (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., LENSKI, 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-butyrylhomoserine 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). **Dirhamnolipid 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 of 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.