

Universidade Federal do Rio de Janeiro

PRODUÇÃO DE RAMINOLIPÍDEOS POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*-ESTA, SUAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, TOXICIDADE E SIMULAÇÃO EM VAZAMENTOS DE PETRÓLEO.

Leticia Dobler

Tese de Doutorado em Ciências apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica, IQ, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências em Bioquímica.

Orientadores: Rodrigo Volcan Almeida Denise Maria Guimaraes Freire

Rio de Janeiro Agosto de 2018

PRODUÇÃO DE RAMINOLIPÍDEOS POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*-ESTA, SUAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, TOXICIDADE E SIMULAÇÃO EM VAZAMENTOS DE PETRÓLEO.

Leticia Dobler

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA (PPGBq), DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS - BIOQUÍMICA.

Examinada por:

Prof. Nome do Primeiro Examinador Sobrenome, D.Sc.

Prof. Nome do Segundo Examinador Sobrenome, Ph.D.

Prof. Nome do Terceiro Examinador Sobrenome, D.Sc.

Prof. Nome do Quarto Examinador Sobrenome, Ph.D.

Prof. Nome do Quinto Examinador Sobrenome, Ph.D.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL AGOSTO DE 2018

Dobler, Leticia

Produção de raminolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa*-estA, suas características físico-químicas, toxicidade e simulação em vazamentos de petróleo./Leticia Dobler. – Rio de Janeiro: UFRJ/IQ, 2018.

XVI, 149 p.: il.; 29, 7cm.

Orientadores: Rodrigo Volcan Almeida

Denise Maria Guimaraes Freire

Tese (doutorado em ciências) – UFRJ/IQ/Programa de Bioquímica, 2018.

Referências Bibliográficas: p. 96 – 116.

1.Raminolipídeo.2.Biosurfactante.3.Pseudomonas.I.Volcan Almeida, Rodrigo et al.II.Universidade Federal do Rio de Janeiro, IQ, Programa deBioquímica.III.

Dedicatória.

Agradecimentos

Agradecimentos.

Resumo da Tese apresentada ao PPGBq/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências em Bioquímica (D. Sc..)

PRODUÇÃO DE RAMINOLIPÍDEOS POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*-ESTA, SUAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, TOXICIDADE E SIMULAÇÃO EM VAZAMENTOS DE PETRÓLEO.

Leticia Dobler

Agosto/2018

Orientadores: Rodrigo Volcan Almeida Denise Maria Guimaraes Freire

Programa: Bioquímica

Os ramnolipídeos são biossurfactantes com enorme potencial de aplicação devido à sua alta capacidade de diminuir a tensão interfacial. Diversas estratégias são adotadas com o objetivo de reduzir os custos de produção destas moléculas, mas raramente essas estratégias são utilizadas no mesmo processo ou trabalho científico. Nesta tese foram reunidas várias dessas estratégias, como o uso de uma cepa geneticamente modificada, o uso de um co-produto industrial como fonte de carbono, o uso de um meio de baixo custo e um processo simples de *downstream*. O bioprocesso utilizando glicerina P.A. e inóculo celular 1,28 g/L de célula seca, resultou em uma concentração final de 18,1 g/L de RML, um dos maiores títulos já reportado por uma cepa modificada. As maiores taxas de produção se deram em razão C/N =83,2. Entre seis fontes de carbono, a glicerina P.A. apresentou maior produção e produtividade. O processo manteve alta produtividade, mesmo quando substituído por glicerina bruta, oriunda da indústria de biodiesel. O uso do sobrenadante livre de células (SLC) não se mostrou tóxico quando testados sobre Artemia salina e algumas linhagens de células animais, dando indicações de que ele pode ser aplicado diretamente no meio ambiente sem a necessidade de etapas de purificação custosas. Além disso, foi mostrado que o SLC apresenta excelente papel dispersivo, emulsificante e tensoativo. Em uma simulação de derrame de petróleo em água do mar, o SLC foi capaz de diminuir a tensão interfacial mesmo nas diferentes condições de salinidade e pressão (coluna d'água). Já a temperatura, se mostrou como significativa para petróleos de °API alto. Os resultados sugerem que o RML produzido neste trabalho pode ser aplicadas em remediação de petróleo em águas brasileiras.

Abstract of Thesis presented to PPGBq/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Science of Biochemistry (D. Sc..)

PRODUCTION OF RHAMINOLIPIDS BY *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*-ESTA, ITS PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTICS, TOXICITY AND SIMULATION IN OIL SPILLS.

Leticia Dobler

August/2018

Advisors: Rodrigo Volcan Almeida Denise Maria Guimaraes Freire

Department: Chemistry Department

Rhamnolipids are biosurfactants with enormous application potential due to their high ability to reduce interfacial tension. Several strategies are adopted with the objective of reducing the production costs of these molecules, but rarely are these strategies used in the same process or scientific work. In this thesis were gathered several of these strategies, such as the use of a genetically modified strain, the use of an industrial co-product as carbon source, the use of a low-cost medium and a simple downstream process. The bioprocess using *P. aeruginosa*, glycerin and 1.28 g/L of dry cell to inoculum resulted in a final concentration of 18.1 g/L RML, one of the highest titers ever reported by a modified strain. The highest production rates were found at C/N = 83.2. Among six carbon sources, 95 % glycerin presented higher yield and productivity. The process maintained high productivity, even when replaced by crude glycerin, co-product from the biodiesel industry. The use of the cell free supernatant (SLC) did not prove to be toxic when tested on Artemia salina and some animal cell lines, indicating that it can be applied directly into the environment without the need for costly purification steps. In addition, it has been shown that SLC exhibits excellent dispersive, emulsifying and surfactant role. In a simulation of oil spill in seawater, the SLC was able to decrease interfacial tension even under different conditions of salinity, temperature and pressure (depth of water column) to medium density petroleum. In other hand, were seen linear significant interference for low density (hight API grade) petroleum. The results suggest that the RML produced in this work can be applied in oil remediation in Brazilian waters.

Sumário

Li	sta d	le Figu	iras	xi
Li	sta d	le Tab	elas	xiv
1	Inti	roduçã	0	1
2	\mathbf{Pro}	blemá	tica e Método Proposto	4
	2.1	Objet	ivo Geral	4
	2.2	Objet	ivos Específicos	4
3	Rev	visão E	Bibliográfica	6
	3.1	Ramin	nolipídeos	6
		3.1.1	Diversidade estrututal e síntese	6
		3.1.2	Interesse tecnológico e acadêmico	9
		3.1.3	Interesse tecnológico e comercial	12
	3.2	Poten	cial uso de raminolipídeos em ambientes impactados \ldots	19
	3.3	Enger	nharia metabólica para produção de raminolipídeos \ldots	21
		3.3.1	Expressão heteróloga	22
		3.3.2	Modificações diretas	30
		3.3.3	Modificações indiretas	32
	3.4	Deter	minação da produção de raminolipídeos e as falhas nos funda-	
		mento	os da área	34
		3.4.1	Quantificação clássica	38
		3.4.2	Quantificação moderna	41
		3.4.3	Complementação	42
4	Ma	terias	e Métodos	45
	4.1	Produ	ıção de raminolipídeos	45
		4.1.1	Manutenção das cepas, reativação e pré inóculo $\ldots \ldots \ldots$	45
		4.1.2	Comparação de cultivos aplicando diferentes fontes de carbono	
			e nitrogênio	45

		4.1.3	Comparação de cultivos aplicando diferentes razões Car-	
			bono/Nitrogênio	. 46
		4.1.4	Comparação de cultivos aplicando diferentes inóculos $\ .\ .$.	. 47
		4.1.5	Estudo da produção a partir de fonte alternativa de glicerina	. 48
	4.2	Métod	los Analíticos	. 48
		4.2.1	Quantificação da concentração celular	. 48
		4.2.2	Quantificação de raminolipídeo e glicerina	. 49
		4.2.3	Cromatografia de camada delgada (CCD) $\hfill \ldots \ldots \ldots$. 50
		4.2.4	Indice de emulsificação	. 50
		4.2.5	Dispersão de petróleo	. 51
		4.2.6	Tensão superficial (TS), Tensão Interfacial (TI), concentração	
			micelar crítica (CMC) e diluição micelar crítica (DMC)	. 51
	4.3	Uso de	o sobrenadante livre de células em simulação de vazamento de	
		óleo		. 52
	4.4	Toxici	dade do sobrenadante livre de células	. 53
		4.4.1	Cultivo de Artemia salina	. 53
		4.4.2	Cultivo de células de mamífero	. 54
	4.5	Antibi	iograma	. 55
5	Bos	ultado		56
J	5 1	Comp	aração do cultivos aplicando diferentes fontos do carbono o ni	50
	0.1	trogôn	io	56
	59	Comp	aração do cultivos om diferentos razãos Carbono/Nitrogânio	. 50
	5.2 5.3	Indica	cão da presença de BML	. 01
	5.0 5.4	Comp	aração do cultivos om diferentos ináculos	. 11
	5.5	Produ	aração de cultivos em diferences moculos	. 75
	5.6	A nálie	çao des propriedados físico químicas do SLC	. 70
	5.0	Simul	ação do uso do SLC om águas impactadas com potróleo	. 00
	5.8	Toxici		. 87
6	Cor	nclusõe	25	92
-				-
7	Per	spectiv	vas	94
R	eferê	ncias I	Bibliográficas	96
\mathbf{A}	nexo	A - D	ados suplementares	117
	.1	Valore	es de Tensão Interfacial encontrados para um sistema	
		petról	eo:AMS, em diversas condições de temperatura, pressão e sali-	
		nidade	2	. 118

.2	Valores de Tensão Interfacial encontrados para um sistema petróleo:	
	hexano, em diversas condições de temperatura, pressão e salinidade.	. 119
.3	ANOVA do planejamento experimental utilizando petróleo de média	
	densidade	. 120
.4	ANOVA do planejamento experimental utilizando petróleo de alta	
	densidade	. 121
.5	ANOVA do planejamento experimental utilizando hexano $.$. 122
Anexo	B -Produção acadêmica	123
Anexo	C -Reprodução de trabalhos publicados	124

Lista de Figuras

1.1	Estrutura cristalográfica da EstA de <i>P. aeruginosa</i> com α -hélices em vermelho, folhas- β em verde, e alças em cinza. Provável disposição da membrana externa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> é apresentada, para referência de posicionamento. Tríade catalítica é composta de G-D-S-X-S (glicina, aspartato, serina, x, serina) Estrutura foi depositada no PDB (Protein Data Bank) sob código de acesso 3KVN. (adaptado de VAN DEN BERG, 2010).	2
3.1	Figura sumariza os quatro principais grupos de RMLs: contendo uma raminose e dois (Rha- C_n - C_n) ou um (Rha- C_m) β -hidroxiácidos e con- tendo duas raminoses e dois (Rha-Rha- C_n - C_n) ou um (Rha-Rha- C_m)	
	β -hidroxiácidos. Onde n = 4 - 12 e m = 4 - 10	7
3.2	Via metabólica da biossíntese de RML em <i>P. aeruginosa</i> . O diagrama mostra as reações sequenciais envolvidas na produção de Mono e Di- RMLs, assim como a biossíntese dos percursores L-raminose e ácido	
	$\operatorname{graxos}[2]$	8
3.3	Distribuição anual de novos documentos envolvendo a produção de RML por <i>Pseudomonas</i> . A literatura de não-patentes foi aces- sada pela plataforma 'Web of Science' e de patentes na plataforma 'Derwent Innovations Index'. Na figura menor, destacam-se os valores	
3.4	acumulados de patentes Distribuição de documentos de patentes ao longo dos anos (agrupadas em triênios), para os principais depositantes: Japão (JP), Alemanha+ República Democrática da Alemanha (DE + DD), Estados Unidos	9
	(US), Coréia do Sul (KR), China (CN) e Brasil (BR)	10
3.5	Moléculas produzidas pela empresa Glycosurf, USA. (Reprodução de GLYCOSURF, (2018).)	16
3.6	O sabonete líquido para mãos da empresa AGAE Technologies [4] é	
- -	único produto conhecido com RML em sua fórmula	17
3.7	Distribuição de reservas comprovadas de petróleo em 1996, 2006 e 2016.	21

- 3.8 Figura esquemática do método mais comumente utilizado pela literatura para purificação de RML: a extração por solvente. O método considera que ao misturar SLC com um solvente orgânico (como o acetato de etila) é capaz de extrair todo o RML da fase aquosa (polar) para a fase orgânica (apolar). Esse método também considera que toda a raminose livre se manterá solúvel na fase polar.
- 3.9 Exemplo de dois congêneres de RML: Rha-Rha-C8, um dos RML mais hidrofílicos já reportado [5] e Rha-C14-C16, um dos RML mais hidrofóbicos já reportado. Desenho das moléculas foram realizadas utilizando o programa GChem Paint Chemical Stuctures Editor. Cálculo do momento dipolo estimado (MDE) foi realizado utilizando o programa Advogadro.

36

37

- 3.10 Figura esquemática: Proposta de separação das moléculas entre as fases, durante extração de RML por solventes. O esquema sugere como devem se distribuir as moléculas presentes no SLC ao se adicionar um solvente orgânico (como o acetato de etila): RMLs podem ser encontrados na interface nos líquidos, na interface ar-fase apolar, nas paredes do recipiente e no seio dos líquidos. Mono e Di-RML podem estar presentes em ambas as fases, especialmente quando em altas concentrações. Ainda, RML podem formar diversos tipos de micelas.

xii

5.3	Figura mostra cromatografia de camada fina realizada para analisar	
	a relação Mono:Di-RML. Da esquerda para a direita: <i>P. aeruginosa</i>	
	PAO1, razão C/N = 17,5; P. aeruginosa PAO1, razão C/N = 83,2;	
	P. aeruginosa-estA, razão C/N = 17,5; $P. aeruginosa$ -estA, razão	
	$\mathrm{C/N}$ = 83,2; e uma solução padrão de 5 g/mL de ram nose. Foram	
	aplicados $2\mu L$ das amostras	72
5.4	Teste de emulsificação: SLC foi diluído 100 vezes e vigorosamente	
	agitado em vortex com partes iguais de n-hexadecano e deixado em	
	repouso durante 24 horas. Da esquerda para a direita: $P.~aeruginosa$	
	PAO1, com razão C/N de 17,5 e 83,2, em seguida, $P.\ aeruginosa\text{-estA}$	
	em razão C/N de 17,5 e 83,2 (mol/mol), respectivamente $\ . \ . \ .$.	72
5.5	Produção de RMLs sob diferentes inóculos: 0,53, 0,85 e 1,28 g/L $$	
	de massa seca. Ensaio foi realizado em meio de cultivo MSP razão	
	C/N=83,2 contendo glicerina P.A. como fonte de carbono. \hdots	75
5.6	Produção de RMLs sob diferentes inóculos: 0,53, 0,85 e 1,28 g/L $$	
	de massa seca. Ensaio foi realizado em meio de cultivo MSP razão	
	C/N=83,2 contendo glicerina bruta como fonte de carbono	77
5.7	Emulsões, após 24 e 48 horas, de n-hexadecano com SLC ajustado a	
	diferentes pHs mostram que emulsão é estável em pHs de 5 a 11. Em	
	pH 4, parte do óleo não é emulsificado	81
5.8	Teste de deslocamento de óleo pelos surfactantes aniônicos I) dodecil	
	sulfato de sódio (SDS) e II) RML (ambos em concentrações de 1g/L).	
	Em III), halo formado pela mistura de RMLs produzidos em condições	
	de: glicerina bruta com A) 1,28 g/L e B) 0,85 g/L de inóculo; e: gli-	
	cerina PA com C) 1,28 g/L e D) 0,85 g/L de inóculo. Todos os so-	
	brenadantes foram produzidos em razão C/N=83,2. ANOVA e Teste	
	de Tukey (p<0,05) apontaram significância entre a condição C e as	
	condições A, B e D: "a"e "b"representam condições estatisticamente	
	similares	82
5.9	Superfícies de respostas para os efeitos lineares de: A) pressão e tem-	
	peratura; B) salinidade e temperatura; e C) salinidade e pressão em	
	um sistema de AMS:petróleo de alto °API. As análises e gráficos fo-	
	ram feitos usando o <i>software</i> STATISTICA trial 12.0	86
5.10	Efeito da concentração de RML na TI em um sistema de AMS: hexano.	
	Pressão foi fixada em 1,1 $\times 10^7$ Pa e temperatura em 14 °C	87

Lista de Tabelas

3.1	Relação das empresas citadas na literatura como vendedoras de RML,	
	seus respectivos endereços na internet e contato. $EUA = Estados$	
	Unidos da América, RU=Reino Unido, $ALE = Alemanha, CHN=China.$	13
3.2	Relação de cepas engenheiradas visando a produção de RML. ND -	
	Não Determinado. NI - Não Informado. NC-Não Calculável. Vf/Vm	
	- Volume do frasco/Volume do meio. L B $\operatorname{-}$ Luria-Bertani. CL/ES	
	- Cromatografia Líquida/Espectroscopia de Massas. CLAE-UV/vis	
	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. MALDI-TOF - Matrix-	
	Assisted Laser Desorption. Ionization – Time of Flight. CL/MS	
	- Cromatografia Líquida/Massas. UHPLC - Ultra-High Performance	
	Liquid Chromatography. *Valores aproximados - Os autores não citam	
	o valor exato de produção máxima atingida	23
3.3	Produção máxima de RML, produtividade e $Y_{p/x}$, por <i>P. aerugi</i> -	
	$nosa\text{-}\mathrm{estA},$ em fermentação de 120 horas de duração. Análise foi	
	realizada pelo método de quantificação do orcinol (Adaptado de DO-	
	BLER (2014))	34
4.1	Composição, em grama por litro, de cada componente dos meios de	
	cultivo (variações do meio MSP).	46
4.2	Concentrações (em grama por litro) das fontes de nitrogênio (nitrato	
	de sódio) e carbono (glicerina P.A.) utilizadas nos ensaios de com-	
	paração de produção em diferenets razões Carbono/Nitrogênio	46
4.3	Concentrações de inóculos testadas em ensaio comparativo para P .	
	<i>aeruginosa</i> -estA, expressas em g/L e em absorbância	48
4.4	Composição, em grama por litro, do meio de cultivo utilizando glice-	
	rina P.A. e bruta são semelhantes, a não ser pela origem do substrato.	
	Valores são dados em equivalente de glicerol e não concentração total	
	do rejeito.	48
4.5	Valores reais e codificados utilizados no planejamento experimental	
	de um sistema AMS Petróleo	52

4.6	valores reais e codificados utilizados no planejamento experimental de um sistema AMS Hexano.	53
5.1	Parâmetros cinéticos de cultivos realizados em diferentes razões C/N. PM = produção máxima, x = concentração celular, Si = concentração inicial de substrato, Q_{PM} = produtividade. Razão C/N = 17,5 têm concentração de nitrato de sódio diferente (4,75 g/L) das demais (1,4 g/L)	63
5.2	Comparação da produção de RML por <i>P. aeruginosa</i> -estA, com as obtidas por as cepas geneticamente modificadas de maior destaque da literatura. Tabela relaciona a estratégia genética, maior produção alcançada (MP), produtividade (Q_p) e condições do cultivo. E. leve- dura = Extrato de levedura, CLAE = Cromatografia líquida de alta oficiência	68
5.3	Comparação das produções realizadas em meio MSP, razão C/N 83,2 glicerina P.A. como fonte de carbono e NaNO ₃ como fonte de ni- trogênio. Valores referentes à 72 horas (3 dias) de produção e quanti- ficação utilizando CLAE. Vf/Vm = Razão volume do frasco e volume do meio do cultivo	74
5.4	Parâmetros cinéticos de cultivos carreados em razão $C/N = 83.2$,	14
	diferentes concentrações de ínóculo e fontes de glicerina	76
5.5	Rejeitos e co-produtos indústriais como substrato para produção de raminolipídeos (Adaptado de LIU <i>et al.</i> (2018) e LI (2017))	78
5.6	Tensão interfacial (mN/m) entre água ou SLC com petróleo ou he- xano. O SLC utilizado foi diluído para uma concentração de 0,5 g/L de RML em água ou água do mar sintética (AMS). O SLC utilizado foi obtido apartir de glicerina bruta e um inóculo de 1,28 g/L. *Para SLC em AMS é dado intervalo de valores encontrados (dependendo da condição de temperatura, salinidade e pressão). As outras análises foram feitas em condições ambiente de pressão e temperatura (salini-	
5.7	dade não se aplica)	83
	et al. (1982)	89

1	Ensaios realizados durante o planejamento experimental e os valores
	de TI encontrados em um sistema AMS:petróleo (de densidade média
	e alta)
2	Ensaios realizados durante o planejamento experimental e valores de
	TI encontrados em um sistema AMS: hexano
3	ANOVA referente ao planejamento experimental (simulação de der-
	ramamento de petróleo) em um sistema petróleo médio °API:AMS. $$. 120
4	ANOVA referente ao planejamento experimental (simulação de der-
	ramamento de petróleo) em um sistema petróleo alto °API:AMS. $$ 121
5	ANOVA referente ao planejamento experimental (simulação de der-
	ramamento de petróleo) em um sistema hexano:AMS

Capítulo 1

Introdução

Surfactantes são moléculas capazes de baixar a tensão superficial e interfacial. Embora biossurfactantes apresentem várias vantagens quando comparados com os surfactantes obtidos de forma não-biológica, a sua produção apresenta elevado custo e requer otimização de processos [10]. Entre os surfactantes de origem microbiana, os biosurfactantes, destacam-se os raminolipídeos (RML) e a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, como o organismo de maior produção destes. Os RML têm sido apresentados como surfactantes promissores para serem aplicados em diversas indústrias, como farmacêutica [11], de cosméticos [12], de alimentos [13] e na Recuperação Microbiana Avançada de Petróleo (MEOR) [14–16], por conta das suas propriedades físico-químicas [17].

Apesar de sua patogenicidade, *P. aeruginosa* ainda é o micro-organismo mais utilizado na indústria para produção de RML [18]. Isso é dado especialmente pela falta de cepas não-patogênicas que alcancem as mesmas taxas de produção que as cepas do gênero *Pseudomonas* [2, 19]. Desta forma, os modelos e ferramentas de processo fermentativo são melhor descritos para *P. aeruginosa*, tornando esta cepa muitas vezes escolhida para estudos em escala de laboratório [20].

Em 1999, WILHELM *et al.*, (1999) relataram a descoberta de uma esterase ancorada na membrana externa de *P. aeruginosa* PAO1, em formato de β -barril. Desde a sua descoberta, a proteína mostrou-se interessante para ancoramento de outras proteínas em superfície celular [22–24], o que motivou a determinação da sua



Figura 1.1: Estrutura cristalográfica da EstA de *P. aeruginosa* com α -hélices em vermelho, folhas- β em verde, e alças em cinza. Provável disposição da membrana externa de *Pseudomonas aeruginosa* é apresentada, para referência de posicionamento. Tríade catalítica é composta de G-D-S-X-S (glicina, aspartato, serina, x, serina) Estrutura foi depositada no PDB (Protein Data Bank) sob código de acesso 3KVN. (adaptado de VAN DEN BERG, 2010).

estrutura [1] (Figura 1.1). Além disso, a esterase A (EstA) parece ser uma proteína auto-transportadora, e tem sido estudada a fim de elucidar como proteínas deste grupo se auto-translocam para a membrana externa [25, 26].

Em 2007, o mesmo grupo que relatou a existência de EstA [21] mostrou que, de alguma forma, esta enzima está envolvida com a motilidade celular, a formação de biofilme e produção de RML por *P. aeruginosa* PAO1. O grupo mostrou que o aumento na expressão do gene codificante desta enzima aumenta a produção de RML, enquanto sua deleção quase cessa a produção [27]. Além disso, a atividade catálitica é essencial para a observação deste fenômeno visto que a produção não foi reestabelecida com a complementação por um gene com mutação sítio-dirigida. O mecanismo envolvido neste fenômeno, entretando, ainda requer elucidação. Além disso, a produção de RML como produto de interesse industrial não foi explorada neste trabalho, que realizou apenas pequenos volumes (50 mL) e obteve uma produção máxima de 1,5 g/L de RML.

Na literatura, existe uma grande quantidade de trabalhos com o objetivo a cons-

trução de cepas visando o aumento da produção de RML [2]. A maior parte deles estão focados em modificações nos genes que fazem parte da via de síntese de RML, como *rhlA*, *rhlB* e *rhlC*. Raros trabalhos investiram em modificações em genes não diretamente ligados à via sintética de RML [2]. Os que as fizeram, porém, obtiveram bons resultados, como será exposto à frente.

Inspirado nestes trabalhos, uma nova cepa de *Pseudomonas aeruginosa* foi construída por nosso grupo [6]. Nesta, o gene *estA* foi super expresso, de forma epissomal, na cepa selvagem *P. aeruginosa* PAO1, gerando a cepa *Pseudomonas aeruginosa*estA e foi demostrado que o micro-organismo foi capaz de produzir 37 % a mais de RML por grama de células que o micro-organismo selvagem [6].

Capítulo 2

Problemática e Método Proposto

Os biossurfactantes são conhecidos por sua alta capacidade de baixar tensão interfacial e superficial, emulsificar e dispersar óleo e seu potencial na remediação de petróleo. Os custos de produção destas moléculas e o ainda escasso conhecimento da interação destes com petróleo, não permite que as mesmas sejam amplamente utilizadas. Várias estratégias são adotadas com o objetivo de reduzir os custos de produção desses surfactantes, como o uso de cepas modificadas, rejeitos ou coprodutos industriais como fonte de carbono e processo simplificado de *downstream*.

2.1 Objetivo Geral

Desse modo, este trabalho objetiva analisar a combinação de diferentes estratégias para diminuição dos cutos de produção de RML, assim como a análise fisico-química e toxicologica do produto obtido.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a capacidade de produção de RML pela cepa geneticamente modificada *P. aeruginosa*-estA a partir de diferentes substratos;
- Descrever e comparar a cinética de produção de RML, por *P. aeruginosa*-estA com a cepa selvagem que lhe deu origem (*P. aeruginosa* PAO1);

- Analisar a produção de RML por *P. aeruginosa*-estA a partir do co-produto industrial glicerina;
- Caracterizar as propriedades fisico-químicas tensão superficial, indice de emulsificação, deslocamento de petróleo e concentração micelar crítica do produto (sobrenadante livre de células) gerado;
- Analisar o potencial do sobrenadante livre de células em acidentes envolvendo petróleo em água do mar a partir de uma simulação: análise da tensão interfacial entre o sistema, em diferentes salinidades, temperatura e pressão;
- Analisar a toxicidade do produto (sobrenadante livre de células) nos sistemas modelo: *Artemia salina* e linhagens de células animais.

Capítulo 3

Revisão Bibliográfica

3.1 Raminolipídeos

Os biossurfactantes surgiram como uma alternativa promissora aos surfactantes de síntese não-biológica, por serem ambientalmente amigáveis e apresentarem notáveis propriedades físico-químicas [28–30]. Comumente obtidos a partir de fontes renováveis, estes compostos são normalmente produzidos por micro-organismos e são classificados de acordo com as suas estruturas químicas, como glicolipídeos, fosfolipídeos, lipoproteinas e polímeros [5].

A maioria destes compostos são surfactantes aniônicos ou neutros [20] e os mais extensivamente estudados são os glicolipídeos [10]. Estes apresentam vantagens em termos de biodegradabilidade, toxicidade, diversidade estrutural, atividade surfactante e estabilidade em condições extremas de temperatura, pH e força iônica [10].

Nesse contexto se destacam os RML por conta da sua alta atividade em superfícies, e seu papel como tensoativo, emulsificante e dispersante [17].

3.1.1 Diversidade estrututal e síntese

Biossurfactantes do tipo RML compreendem uma categoria de biossurfactantes que tem sido o foco de diversos grupos de pesquisa [2]. Eles compreendem um grupo de moléculas anfipáticas que são compostas de uma ou duas raminoses (porção hidrofílica) ligadas a uma ou duas moléculas de β -hidroxiácidos, que variam de C8



Figura 3.1: Figura sumariza os quatro principais grupos de RMLs: contendo uma raminose e dois (Rha- C_n - C_n) ou um (Rha- C_m) β -hidroxiácidos e contendo duas raminoses e dois (Rha-Rha- C_n - C_n) ou um (Rha-Rha- C_m) β -hidroxiácidos. Onde n = 4 - 12 e m = 4 - 10.

a C14 ou C8 a C10 (grupo hidrofóbica) (Figura 3.1) [5].

Já foram identificados mais de 60 congêneres de RML produzidos por diversos micro-organismos. Os maiores produtores são micro-organismos pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, em especial a patógena oportunista *Pseudomonas aeruginosa*, que pode produzir até 28 congêneres [5].

Cada micro-organismo produz uma mistura destes compostos que varia conforme as condições do meio. A mistura resultante da produção irá determinar as propriedades físico-químicas do produto final, e até mesmo ligeiras diferenças na composição podem ter consequências importantes nestes parâmetros [31].

A composição de RML produzidos por *Pseudomonas* está relacionada com diversos parâmetros, sendo os mais importantes: cepa, composição dos meios, condições de culivo, e idade da cultura. Entre os mais abundantes, estão Rha-C10-C10 e Rha2-C10-C10, sendo muitas vezes chamados de mono e Di-RMLs, respectivamente.

A nomenclatura Mono e Di-RMLs também é utilizada para o grupo de qualquer RML formado por apenas uma ou duas raminoses, respectivamente, independentemente do tamanho da cadeia de β -hidroxiácido [5, 31].

O papel do RML na fisiologia da célula bacteriana ainda não é conhecido, em-



Figura 3.2: Via metabólica da biossíntese de RML em *P. aeruginosa*. O diagrama mostra as reações sequenciais envolvidas na produção de Mono e Di-RMLs, assim como a biossíntese dos percursores L-raminose e ácido graxos [2].

bora muitos estudos sugiram que estes podem atuar como fatores de virulência das infecções por *P. aeruginosa* [32]. Estes também estão relacionados à formação de biofilme [27, 33, 34] e a mobilidade celular [27, 35, 36].

A biossíntese de RML inclui três etapas principais (Figura 3.2), além de ser controlada por sinais ambientais e sistemas de *quorum sensing* (Qs) [37]. Primeiro, a enzima RhlA (codificada pelo gene *rhl*A) catalisa a formação de uma ligação éster entre os intermediários de ácidos graxos, 3-hidroxialcil-ACP, formando o 3-(3hidroxialcanoiloxi)-alcanoato (HAA).

Então, os precursores HAA e dTDP-L-raminose reagem pela ação da enzima RhlB (codificada pelo gene rhlB), formando moléculas de Mono-RML. Estes pode ser substrato de mais uma etapa onde mais uma molécula de dTDP-L-raminose é catalisada pela enzima RhlC (do gene rhlC), gerando Di-RMLs [38].



Figura 3.3: Distribuição anual de novos documentos envolvendo a produção de RML por *Pseudomonas*. A literatura de não-patentes foi acessada pela plataforma 'Web of Science' e de patentes na plataforma 'Derwent Innovations Index'. Na figura menor, destacam-se os valores acumulados de patentes..

3.1.2 Interesse tecnológico e acadêmico

Durante o início deste doutoramento e com o objetivo de se obter uma visão global dos principais desenvolvimentos na produção de RML, foi feita uma pesquisa de patentes usando o banco de dados "Derwent Innovations Index" e de trabalhos científicos, no acervo principal da base de dados "Web of Science". O foco foi no gênero *Pseudomonas* e os resultados foram publicados por DOBLER *et al.*, (2016) [2].

O primeiro artigo de patente encontrado data de 1986, e o segundo de 1987 e posteriormente existe uma lacuna de cinco anos sem publicações (Figura 3.3). Ou seja, apenas em 1993, a produção de RML volta a ser reportada novamente, seguida de mais uma publicação em 1994. OCHSNER *et al.*, (1995) iniciaram neste ano, o estudo da produção de RML por cepas recombinantes e o interesse na produção heteróloga de RML [39].

O interesse na produção de RML cresceu notavelmente ao longo dos anos, especialmente na última década, quando o número de patentes mais do que dobrou,



Figura 3.4: Distribuição de documentos de patentes ao longo dos anos (agrupadas em triênios), para os principais depositantes: Japão (JP), Alemanha+ República Democrática da Alemanha (DE + DD), Estados Unidos (US), Coréia do Sul (KR), China (CN) e Brasil (BR).

de 2006 para 2007. Parte substancial dos registros foram encontrados nos EUA (18,8%), seguido pelo Brasil (13,1%) e Alemanha (10,6%).

Levando em consideração a literatura de patentes como um indicativo para uma projeção tecnológica, seria possível afirmar que a tecnologia para produção de RML está crescendo, ainda na fase exponencial e o tempo de maturação ainda não pode ser calculado com precisão para a mesma tecnologia. Além disso, observando diferenças entre a literatura de patentes e não patentes é possível sugerir que a pesquisa científica representa a maior parte da contribuição para o crescimento tecnológico na área.

No que se refere às patentes, os principais países depositantes foram: China (com 16 documentos), Alemanha (10), Estados Unidos (7), Coréia do Sul (5), Japão (3) e Brasil (3). Outros países somam sete documentos (Figura 3.4).

De acordo com essa literatura, a produção tecnológica de RML usando microorganismos, especificamente usando *Pseudomonas*, parece ter emergido em 1975, quando o primeiro documento foi publicado, pela Agência Japonesa de Ciência indústrial e Tecnologia (Japanese Agency of indústrial Science & Technology) atualmente chamada de Instituto Nacional de Ciência indústrial e Tecnologia Avançadas (National Institute of Advanced indústrial Science and Technology, AIST). A patente reivindica proteção no que se refere às condições de cultivo de *Pseudomonas* para a produção de RML, e sua recuperação por cromatografia de coluna em sílica gel. Os autores também reportaram a estrutura dos dois glicolipídeos principais, e relataram que suas concentrações relativas podem diferir dependendo da fonte de nitrogênio (uréia ou nitrato de sódio) [40].

Apesar de o Japão ser o país que inicialmente se dedicou a esse tipo de tecnologia, sua produção de patentes na área foi dispersa, com apenas dois depósitos, em 1996 e 2001. Alemanha foi o principal país durante os anos 80 e 90, e os Estados Unidos e a Coréia do Sul se envolveram mais recentemente, a partir dos anos 2000. China, por sua vez, apesar de ser o país com maior número de documentos, tem emergência relativamente recente, uma vez que seu primeiro depósito ocorreu apenas há onze anos (2005). Brasil tem três documentos, igualando com o Japão, apesar das patentes serem bastante recentes (2007 e 2011).

Analisando os documentos, um em particular se destaca. Este documento foi depositado em 1983 na Suíça, oito anos após o primeiro depósito, reivindicando a produção de RML por cultivo contínuo, em um meio com composição diferente quando comparado com o primeiro depósito [41]. O grupo relatou uma produção de 1,0 - 1,5 g/L, salientando a observação previamente feita na presente tese, de que em mais de 40 anos de patentes e em mais de 70 anos de estudos, pouco se avançou no que se refere às técnicas de produção desta molécula.

Durante os anos 80 e 90, os primeiros depósitos relataram o cultivo em condições anaeróbias; e os sucessivos depósitos reivindicaram apenas simples mudanças nos processos, principalmente sobre a composição do meio, as quais incluem o uso de sulfato ferroso amoniacal com o objetivo de aumentar a taxa de crescimento [42], óleos vegetais como fonte de carbono [43] e ácidos glicéricos de éteres lipídicos como indutores [44].

Neste período, são relatados os primeiros processos empregando a técnica de

colheita de células (*cell harvest*) [42] e cuidados com a problemática da formação de espuma e baixa oxigenação [45]. A técnica de colheita se baseia na separaração total de células do meio de cultivo [42].

O documento WO2012079138-A1 [46], reivindicado pela PETROBRAS e pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), inicialmente não apareceu nas buscas usando as palavras-chave "rhamnolipids*" e "Pseudomonas". Contudo, faz-se aqui a referência devido a sua importância tecnológica. Nesta, os autores reivindicam uma planta piloto com um biorreator que é aerado por difusão de oxigênio por membranas e não pelo meio tradicional de dispersão do gás, que forma bolhas, aumentando o volume de espuma. Usando membranas, o ar é difundido até o meio de cultivo de uma forma controlada, e o problema típico de formação de espuma e baixa oxigenação na produção de RML é parcialmente ou totalmente eliminado.

A patente BR200701366-A2 [47], da Universidade Federal do Paraná (UFPR), foi o único documento encontrado que reivindica a produção de RML por fermentação em estado sólido. Os autores usaram diversas fontes de carbono como soja, canola, farelo de semente de algodão e bagaço de cana-de-açúcar.

Os documentos que reinvindicam a propriedade intelectual sobre cepas modificadas geneticamente, serão expostos e discutidos mais detalhadamente à frente.

3.1.3 Interesse tecnológico e comercial

A literatura reporta pelo menos 10 empresas comercializando RML [18, 48, 49]. Ao desenvolver desta tese, todas estas empresas foram contactadas e nem sempre houve resposta. A tabela 3.1 lista as empresas citadas na literatura e descreve os produtos que já são comercializados por aquelas que responderam ou que foi possível obter as informações da internet.

= Estados Unidos da Améric	ca, RU=	=Reino Unido, ALE = I	Alemanha, CHN=China.		
$\operatorname{Empresas}$	País	Website/Contato	Produtos	Quantidade	Outras informações
				10, 50 ou 100g,	
AGAE Technologies LLC	EUA	agaetech.com	90% RML	1 ou 100 Kg	Contato confirmado.
				ou acima de 1000 Kg.	
		tjones@agaetech.com	95% RML sendo Di-RML pre-	10mg ou 1Kg	Envio para Brasil confir-
			dominante		mado.
			95% RML sendo Mono-RML	10mg ou 1Kg	Possibilidade de compra
			predominante		pela revendedora
			95% RML sendo 90% Di-RML	10mg ou 1Kg	Sigma Aldrich.
			95% RML sendo $90%$ Mono-	10mg ou 1Kg	
			RML		
			Sabonete líquido para as		
		mayluclean.com/	mãos. Cinco opões de	326 mL	Contato e envio confir-
			fragrâncias.		mados.
GlycoSurf®	EUA	glycosurf.com	98% Rha-C10C10 (4 estereo-	10, 100, 500 ou $1000 mg$	Contato confirmado
			isómeros)		
		boxley@glycosurf.com	98% Rha-C12C12 (4 estereo-	10, 100, 500 ou 1000 mg $$	Envio para Brasil confir-
			isómeros)		mado.
			-		

Tabela 3.1: Relação das empresas citadas na literatura como vendedoras de RML, seus respectivos endereços na internet e contato. EUA = Fist

Empresas	País	Website/Contato	Produtos	Quantidade	Outras informações
TeeGeneBiotech	RU	teegene.co.uk/	Não foi encontrada nenhuma	1	Tentativa de contato sem
			informação		êxito 09.Mai.2018
		rahman@teegene.co.uk		1	
TensioGreen	USA	tensiogreen.com	RML 35-45 g/L (líquido ou	Não informado	Tentativa de contato em
			sólido a ser ressuspendido)),		27.05.2018
			RML 0-10 % 90% de pu-		
			reza (líquido ou sólido a ser res-		
			suspendido), Mono-RML sólido		
			90% puro, Di-RML $90%$ puro		
AliBahá	CHN	alibaba com	Diversos	Diversos	Não enviam ao
2000TH17		TTOO DOOD	CONTAIL		Brasil.
					Tentativa
Jeneil Biosurfactant Co. LLC	EUA	jeneilbiotech.com/	Não foi encontrada nenhuma	I	de contato sem êxito
			informação		06.Set.2017
	ALE	sales@jeneilbiotech.com		1	
		info@ieneilhionroducts de			Nova tentativa de con-
					tato em $09.$ Mai. 2018

Empresas	País	Website/Contato	Produtos	Quantidade	Outras informações
Rhamnolipid Inc	EUA	rhamnolipid.com	Não foi encontrada nenhuma		Página fora do ar.
			ıntormaçao		
		hgzx.com/Shop/41063732			Tentativa de contato
Huzhou Zijin Biotech	CHN	-Paste-rhamnolipid.html	90% RML em pasta	Diversos	sem êxito em
		1030512170@qq.com			23.Mai.2018.
Paradigm	EITA	Não encontrado			Contato não
Biomedical Inc.					encontrado.
Henkel	ALE.	Não encontrado			Contato não
					encontrado.
IImmai IInite Rio-Technolowy	CHN	Não encontrado			Contato não
Pointing our same thinks					encontrado.
Framhofer IGB	AL.F.	Não encontrado		-	Contato não
					encontrado.



Figura 3.5: Moléculas produzidas pela empresa Glycosurf, USA. (Reprodução de GLYCOSURF, (2018).)

Entre as dez empresas que contactadas, apenas duas responderam: AGAE Technologies LLC, com sede em Oregon, e a Glycosurf, sediada em Utah; ambas nos Estados Unidos da América. As duas empresas confirmaram possibilidade de envio de seus produtos para o Brasil.

A Glycosurf, promete dois produtos: Rha-C10-C10 e Rha-C12-C12. Segundo a empresa, a síntese não é realizada utilizando o micro-organismo vivo, mas sim por vias sintéticas não enzimáticas, gerando então apenas 1 congere, porém 4 esteroisomeros: R,R; R,S; S,S e S,R (Figura 3.5). Este é o produto com maior purificação que foi obtido orçamento.

A AGAE Technology possui 10 produtos: 5 deles são misturas de RML que se diferem nas suas composições e pureza (Tabela 3.1). O produto com menor preço por massa, é um solido granular com 90% RML. Neste, a empresa não informa a porcentagem Di:Mono-RML e fica sub-entendido que esta razão pode variar conforme o lote. Já os outros produtos da linha, a empresa garante uma pureza de 95% e predominância, acima de 90% de Mono ou de Di-RML. As quantidades comercializadas são descritas na Tablea 3.1. Estes produtos podem ainda ser obtidos no Brasil pela revendedora Sigma Aldrich (Merk), em pequenas quantidades [50].

Os outros 5 produtos, são variações de fragância de um sabonete líquido para



Figura 3.6: O sabonete líquido para mãos da empresa AGAE Technologies [4] é único produto conhecido com RML em sua fórmula.

as mãos (Figura 3.6). O produto é comercializado em embalagens de 326 mL sob o nome comercial MayLu. Apesar da empresa se descrever como comercializante de produtos para limpeza de casa e indústrias, nenhum produto relacionado foi encontrado [4].

LOURITH e KANLAYAVATTANAKUL, (2009) afirmam que RML têm sido aplicados nas formulações de produtos como repelente de insetos, lenços para limpeza de pele anti-acne (acne pads, sem tradução para o português), produtos anticaspa, soluções para lentes de contato, desodorantes, produtos para unhas e cremes dentais. Porém, não foram encontrados estes produtos, nem em trabalhos científicos ou em páginas na internet que os descrevam. Os trabalhos citados por LOURITH e KANLAYAVATTANAKUL (2009) são revisões da literatura ou pedidos de patente. Dessa forma, a linha de sabonetes da MaryLu, lançada em 2017 pela AGAE Technologies, parece ser o primeiro produto usando efetivamente RML em sua composição.

O potencial de aplicação na indústria de cosméticos se dá especialmente por conta de suas propriedades antifúngicas e antibiofilme [11, 51, 52]. A L'Oréal é uma empresa multinacional francesa de cosméticos, reconhecida como líder global em cosméticos [53], e parece ser o único grupo além da MayLu a acusar o uso de RML como ingrediente na formulação de cosméticos. Porém, em sua página na internet, o grupo dá a entender que utiliza raminose de origem vegetal como substrato para formação de RML, e não RML de fonte microbiológica [54].

Apesar da marca acusar o uso da molécula, não foi encontrado nenhum produto apresentando a palavra 'raminolipídeo' ou '*rhamnolipid*' nas embalagens e discrição da composição.

Alguns trabalhos apresentam RMLs como promissores repelentes de insetos. Foi mostrado o poder destes compostos contra *Rhyzopertha dominica*, uma espécie de besouro que ataca grãos [55]; e contra afídeos, que se alimentam da seiva de plantas, muitas vezes transmitindo vírus que causam danos às colheitas [56].

Recentemente, SILVA *et al.*, (2015) testaram os efeitos de RML como larvicida, inseticida e repelente para o mosquito *Aedes aegypti*, principal vetor dos vírus causadores das doenças dengue, zika, febre amarela e chikungunya. Devido à tentativa de controle destas doenças, diversas formas de combate foram empregadas, permitindo que o mosquito desenvolvesse resistência aos inseticidas comumente empregados, o que mostra a importância de se encontrar novas fontes de repelentes. Os autores mostraram que concentrações acima de 0,8 g/L deste composto é o suficiente para matar todas as larvas em 18 horas. Concentrações de 0,6 e 0,7 g/L também foram eficientes em matar todas as larvas após 48 horas de inoculação. Além disso, soluções de 1 g/L aplicadas em camundongos, foram capazes de repelir e matar os mosquitos [57].

Ainda no controle de patologias, recentemente o grupo de pesquisa comandado pelo Professor Banat reportou o uso de RMLs de *Burkholderia* no tratamento de patógenos orais. O grupo mostrou resultados eficazes sobre *Streptococcus oralis*, *Actinomyces naeslundii*, *Neisseria mucosa* e *Streptococcus sanguinis*, reduzindo sua vialibidade entre 3 e 4 unidades de log (número de células por mL), dependendo da concentração de RML utilizada. Ao combinar esse surfactante com o surfactante mais utilizado na composição de cosméticos (lauril sulfato de sódio), o crescimento celular foi abaixo do concentração inibitória minima (CIM) [11].

3.2 Potencial uso de raminolipídeos em ambientes impactados

Uma segunda área de interesse para RML inclui a remediação de águas e solos impactados com petróleo, metais pesados e outros constituintes orgânicos e inorgânicos. São exemplos, a biroremediação de sistemas impactados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), como o fenantreno; compostos organoclorados, como o inseticida hexaclorocicloexano; e metais pesados como As, Cu, Zn, Cd, Pb e Ni; e de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) [30].

Em um trabalho em particular, PEI *et al.*, (2010), ao utilizarem *Sphingomonas* sp. GF2B para degradação de fenantrenos, observaram uma redução de 83,6% do composto quando nenhum surfactante foi adicionado ao ensaio. Já com RML, a remoção do composto passou a 99,5%. O mesmo não foi observado quando um surfactante sintético (Tween 80) foi adicionado. Este teve efeito contrário, reduzindo a remoção do composto para 33,5% [58].

Na remoção de metais pesados, DAHRAZMA e MULLIGAN (2007) reportaram remoções de Cu, Zn, e Ni de 37%, 13%, e 27%, respectivamente, em sedimentos [59]. Já JUWARKAR *et al.*, (2007) avaliaram a capacidade de remoção de Cd e Pb e obtiveram remoções de 92% e 88%, respectivamente. Além disso, os autores observaram que a microbiota do solo aumentou naturalmente quando RML foi adicionado, mostrando que este não causou danos à diversidade da flora no solo testado [60].

Na remoção de petróleo, RML mostrou melhores resultados do que outros biossurfactantes, como a surfactina e surfactantes comerciais como o Tween 80 e Triton X-100. Em ensaios *in vitro*, estes compostos tiveram eficiência na remoção de petróleo de 23%, 14%, 6% e 4%, respectivamente. A eficácia foi observada tanto para hidrocarbonetos de cadeia curta como para cadeia longa [61].

Um dos usos mais promissores de RML vai além da remoção do petróleo de solos. Estas moléculas são potentes atuadoras na promoção da biodegradação destes, a partir de quatro fatores: (i) emulsificação; (ii) adesão/dessorção de micro-organismos nas interfaces com hidrocarbonetos (iii)formaçãod e micelas; e (iv) dessorção de contaminantes. É esperado que estes fatores aumentem as taxas de biorremediação a partir do aumento da biodisponibilidade destes compostos aos micro-organismos que irão biodegradar estes compostos [14, 62].

O uso de RML como potenciais agentes na Recuperação Microbiana Avançada de Petróleo (MEOR) também é bem citada na literatura [14–16, 49], porém poucos experimentos são efetivamente realizados com amostras de petróleo cru.

Experimentos simulando condições de MEOR foram realizadas por ZHAO *et al.*, (2014) para avaliar a eficiência de recuperação de óleo utilizando RML produzido pelo micro-organismo *P. stutzeri* Rhl. A recuperação de óleo foi de 63,4 % contra 53,3 % recuperado pelo controle positivo, realizado com água de injeção (já utilizada na indústria). Os resultados são preliminares e confirmam o potencial uso de RML em MEOR. Os autores ainda afirmam que os resultados não foram mais discrepantes devido às limitações do experimento e também devido à baixa quantidade de RML presente na amostra (1,6 g/L).

Recentemente VARJANI e UPASANI (2016) realizaram estudos a partir do mesmo método de ZHAO *et al.*, (2014) e observaram resultados similares: foi observado o aumento de 8,82% de recuperação de óleo quando RML foi adicionado. Os autores estudaram ainda a estabilidade do RML nas condições de MEOR e observaram estabilidade em temperaturas de (4 °C, 30-100 °C), pH (2,0-10,0) e concentrações de NaCl (0-18% p/v).

A investigação do uso do papel dos RML em MEOR e da remediação de ambientes impactados com petróleo torna-se mais importante em um cenário onde novas reservas de petróleo continuam sendo constatadas. No período de 2006 a 2016 mais de 318 milhões de barris de petróleo foram comprovadas na America Central e do Sul [64] (Figura3.7).

Grande parte deste aumento nas reservas mundiais está relacionada às descobertas do pré-sal brasileiro [64]. Estas descobertas, junto com as ocorridas no território da Venezuela, elevou a America Latina à segunda maior reserva de petróleo, dentro de uma perspectiva mundial [64].


Figura 3.7: Distribuição de reservas comprovadas de petróleo em 1996, 2006 e 2016.

Entretanto, o aumento de reservas exploradas resulta no aumento de litros de óleo cru transportados [65]. Este transporte ainda é deficiente por conta da falta de oleodutos no país [66], gerando um alto número de acidentes envolvendo derramaneto de petróleo no mar. Nos últimos 30 anos, mais de 60 acidentes envolvendo navios superpetroleiros (navios de carga com capacidade de transporte de petróleo na ordem de grandeza de centenas de milhares de toneladas) foram relatados [65]. Dessa forma, é necessário tecnologias de contenção e remediação de ambientes impactados. Os RML entram nesse contexto como surfactantes obtidos de fontes degradáveis e que possuem baixa toxicidade e alta biodegradabilidade [10, 18].

3.3 Engenharia metabólica para produção de raminolipídeos

O desenvolvimento de cepas capazes de gerar altas concentração final de RML é um importante alvo para minimizar os custos de produção dos RML, e torná-los em produtos competitivos. Neste contexto, a engenharia metabólica tem sido amplamente utilizada para gerar um grande número de cepas modificadas, com especial destaque para modificações nos níveis de expressão das enzimas biossintéticas e/ou proteínas reguladoras envolvidas na expressão destes genes [10, 18].

Durante os últimos anos, diversos trabalhos objetivaram a construção de no-

vas cepas que produzissem maiores quantidades de RML. A plataforma escolhida, quando não são bactérias pertencentes ao próprio gênero *Pseudomonas*; são outras bactérias Gram-negativas, utilizadas como plataformas para a expressão heteróloga de genes de *P. aeruginosa*.

A Tabela 3.3.1 destaca os principais estudos em que modificações genéticas foram realizadas a fim de se aumentar a produção de RML, seja em *Pseudomonas* ou outras espécies bacterianas, usando expressão heteróloga de genes de *Pseudomonas*. Um resumo das estratégias de manipulação molecular, produção máxima, produtividade, fontes de carbono, volume de trabalho e método para quantificação de raminose utilizados nesses trabalhos estão apresentados na Tabela. A alguns trabalhos serão apresentados e discutidos nAS PRÓXIMAS SEÇÕESs.

3.3.1 Expressão heteróloga

Recentemente, uma *Pseudomonas* anaeróbia facultativa foi construída e sua produção de RML reportada. A engenharia metabólica envolveu o grupo de genes *rhl*ABRI de *P. aeruginosa*, que foram introduzidos na cepa anaeróbia facultativa *Pseudomonas stutzeri* DQ1, gerando a cepa de *P. stutzeri* RHL [16]. Usando glicerina como única fonte de carbono, foi alcançada uma produção de 1,6 g/L de RML. A produção de RML sob condições anaeróbias é uma estratégia interessante, porém pouco explorada. O objetivo é contornar os gastos da produção ex situ de RML ao tentar implementar uma produção *in situ*, ou seja, nas plataformas de petróleo [16].

Tabela 3.2: Relaçé Calculável. Vf/Vm CLAE-UV/vis - Cr CL/MS - Cromatog não citam o valor e	io de cepas engenheiradas visando - Volume do frasco/Volume do mei omatografia Líquida de Alta Eficiên grafia Líquida/Massas. UHPLC - <i>U</i> xato de produção máxima atingida.	a produç. o. LB - Lu cia. MALI <i>ltra-High I</i>	ão de RML. I rria-Bertani. C DI-TOF - <i>Mati</i> ⁹ erformance L	ND - Não Determinado. L/ES - Cromatografia L ix-Assisted Laser Desorp iquid Chromatography. *	NI - Não íquida/Espec <i>ition. Ioniza</i> Valores apro	Informado. ctroscopia de <i>tion – Time</i> ximados - Os	NC-Não Massas. <i>of Flight</i> . s autores
Micro-organismo	Peculiaridade	Produção	Produtividad	e Fonte(s) de Carbono	Vf/Vm	Método	Referência
		máxima	(mg/L.h)				
		(g/L)					
$P.\ aeruginosa-est A$	Valores para referência: cepa	9,81	102,27	Glicerina P.A.	1L/	Orcinol	[6]
	construída anteriormente pelo			(42 g/L)	300 mL		
	grupo e utilizada na presente tese						
P. aeruginosa DSM	Mutação química pelo uso de N-metil-	IN	IN	IN	NI	IN	[67]
7107	N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG)	(70-120)					
P. chlororaphis	Expressão de <i>rhl</i> C de <i>P. aeruginosa</i>	0,242	1,44	Glicose	$1\mathrm{L}/$	CL-ES	[68]
pBS29-P2- rhlC	em P . chloraphis sob promotor P . sy -	×		$(20 \mathrm{~g/L})$	$200 \mathrm{mL}$		۲ ـ

[69]

Orcinol

 $250 \mathrm{mL}/$

Glicose (4 g/L)

+ LB

ю

Expressão de rhlB e rhlC em E. coli 0,12

E. coli ETRABC

sob promotor $\mathrm{T7}$

ring a e

 $25 \mathrm{mL}$

23

Micro-organismo	Peculiaridade	Produção	Produtividade	Fonte(s) de Carbono	Vf/Vm	Método	Referência
		máxima	(mg/L.h)				
		(g/L)					
P. aeruainasa	Transnosicão de <i>rhl</i> AB em <i>P. aeruai-</i>	1.819	18.95	Óleo de soja	$250\mathrm{mL}/$	Orcinol	[02]
PEER02	nosa rhlA-			$(20 { m ~g/L})$	$25 \mathrm{mL}$		
P. aeruginosa	Transposição de <i>rhl</i> AB em <i>P. aerugi-</i>	0,784	8,17	Glicose (20 g/L)	$250 \mathrm{mL}/$	Orcinol	[02]
PEER02	nosa rhlA-				25mL		
				Glicerina (35 g/L)	950mT /		
$P. \ stutzeri$ Rhl	Expressão de $rhlABRI$ em P . $stutzeri$	1,61	16,1	+ Extrato de Levedura		Orcinol	[16]
	em fermentação anaeróbica			$(1,5 { m g/L})$	7001111		
D acminimora 10	Evnneecão do <i>ab</i> h	13 3	187 787	Rejeito de indústria	$250\mathrm{mL}/$	Fenol	[71]
Or neonada ton . I		10,01	DOT .	de queijo (500 g/L)	$50 \mathrm{mL}$	sulfúrico	[+ 1]
E = coli nF1hR4	Expressão de <i>rhl</i> ABem <i>E_coli</i> sob pro-	(IN	ON	Extrato de	NI	MALDI-	[64]
	motor lac)	Levedura (5 g/L)	4	TOF	- -
B. kururiensis	Expressão de $rhlAB em B. kururiensis$	7,4	30,83	Glicerina (30 g/L)	1L/	Orcinol	[73]
LMM21					$500 \mathrm{mL}$		

Micro-organismo	Peculiaridade	Produção	Produtividade	Fonte(s) de Carbono	Vf/Vm	Método	Referência
		máxima	(mg/L.h)				
		(g/L)					
				Glicose $(10 \text{ g/L})+$	1 E.OT /	[] [] []	
P. aeruginosa JC	Expressão de vhb	8,373	349	Extrato de Levedura	1.001111/	-1011-	[74]
				(5 g/L)	TUDe	sulturico	
				Glicose $(10 \text{ g/L})+$	E00T /		
P. putida KT42C1	Clonagem de $rhlAB$ em P . $putida$, de	1,5	62, 5	Extrato de Levedura		Orcinol	[19]
pVLT31 rhlAB	forma induzível			(5 g/L)	TmDe		
- C-		0	IN	Extrato de Levedura	D: .f1		ר בי
r. aeruguuosa pp. BLCH	Ouper-expression de <i>lup</i> .	U, 9	IN	$(1,6~{ m g/L})$	DIOIIIIIG	Ofcilio	[07]
P. putida KCTC 1067	Co-expressão de <i>rhl</i> A e <i>rhl</i> B em ope-	7,3	101,39	Óleo de Soja	IN	Orcinol	[02]
(pNE2)	ron, agrupado com $rhl { m R}$ e $rhl { m I}$			(20 g/L)			
P. aeruginosa	Superexpressão de <i>estA</i>	$1,75^{*}$	37*	Glicose (5 g/L)	$2\mathrm{L}/$	Orcinol	[27]
pBBX+					$200 \mathrm{mL}$		
				Glicose (4 g/L)	950mT /		
$E. \ coli$ TnERAB	Expressão de $rhlAB$ em $E. coli$	0,175	7,3	+ Extrato de Levedura		Orcinol	[92]
				(5 g/L)	701117		

Micro-organismo	Peculiaridade	Produção	Produtividade	Fonte(s) de Carbono	Vf/Vm	Método	Referência
		máxima	$(\mathrm{mg/L.h})$				
		(g/L)					
<i>ு</i> !் பD101				Ácido Oleico (15 mM)			
TOTALI NOU T	Expressão dos genes $rhlAB$ e ope-	0,052	4,3	+ Extrato de Levedura	IN	Orcinol	[22]
(puO94, pKLM4)	ron $rmlBDAC$ em E . $coli$ por dois			(IN)			
	plasmídeos diferentes						
$E. \ coli$ W3110	Expressão dos genes <i>rhl</i> AB e ope-	0,121	2,94	M9	IN	Orcinol	[22]
(pINC94, pNC46)	ron $rmlBDAC$ em E . $coli$ por dois			+Glicose (5 g/L)			- -
	plasmídeos diferentes						
				Glicose (10 g/L)			1
P. putida KT2442	Expressão de $rhlAB$ em P . $putida$ de	0, 6	24	+ Extrato de Levedura	IN	Orcinol	[39]
(pUO98)	forma induzida (sob promotor tac)			(5 g/L)			
P. aeruginosa PG201	rhlABRI gene cluster no plasmid	2,2	13,1	Glicerina (2 g/L)	IN	Orcinol	[71]
(fuluit)	pU0101						
P. fluorescences	Expressão de $rhlAB$ em P . fluorescens	0,25	1,49	Glicose (5 g/L)	IN	Orcinol	[39]
(pUO101)							
P. chlororaphis	Expressão de $rhlC$ epissomal de P . ae -	0,242	1,44	Glucose (2 g/L)	1L/	CL-MS	[68]
	ruginosa em P. chloraphis				200mL		

Micro-organismo	Peculiaridade	Produção	$\mathbf{Produtividade}$	e Fonte(s) de Carbono	$\rm Vf/Vm$	Método	Referênci
		máxima	(mg/L.h)				
		(g/L)					
D mutide \vec{K} T9140	Dwidinaño um Biofilmo. Ewmonaño do	0 75*	ע שא ד	Citrato de	Biofilme		[70]
OFFLAIN unund . 1	I IOUUÇAO EIII DIOIIIIE. LAPIESSAO UE	0,10	10,01	$s \delta d i \alpha (1 m M)$	(mm0hwhw)		[01]
	rhlABI de P . aeruginosa em P . putida			TATTT T) OTDOS		HRMS	

A fim de contornar as implicações negativas do uso de uma cepa não GRAS, e desvencilhar a produção de RML da regulação por *quorum sensing*, alguns grupos de pesquisa estão investindo na expressão heteróloga de genes de *P. aeruginosa* em outros micro-organismos. Os principais alvos são cepas universais ou não patógenas, tal como *Escherichia coli*, *Burkholderia* spp., ou cepas de outras espécies do gênero *Pseudomonas* que não sejam reconhecidos como patógeno [19, 73].

Neste âmbito, uma cepa *P. chlororaphis* foi modificada a partir da inserção do plasmídeo pBS29-P2-RHLC, que expressa o gene da raminosiltransferase C (*rhlC*) de *P. aeruginosa*, sob o controle de um promotor de *Pseudomonas syringae* [68]. Os autores relataram que a cepa *P. chlororaphis* modificada foi capaz de produzir 2,4 vezes mais Di-RMLs que Mono-RMLs [68].

No que diz respeito à produtividade, pouco mudou ao longo dos anos. Vinte anos atrás, algumas *Pseudomonas* não patogênicas foram modificadas com o operon *rhl*AB de *P. aeruginosa*. Foram utilizadas como hospedeiros heterólogos: *P. fluorescens*, *P. oleovorans* e *P. putida*. Observou-se uma produção de 0,25 g/L para a cepa de *P. fluorescens*, quando cultivada sob condições limitantes de nitrogênio. Os rendimentos mais elevados (0,6 g/L) e produtividade (24 mg/L.h) mais elevadas foram obtidos pela recombinante de *P. putida* KT2442 (pUO98), enquanto as variantes de *P. olevorans* e *P. fluorescens* não apresentaram produtividade relevante [39].

Mais recentemente, uma cepa de *P. putida* foi modificada de forma a conter genes da raminosil transferase rhlA e rhlB, e os genes do sistema quorum sensing rhlR e rhlI. Uma concentração máxima de RML de 7,3 g/L foi alcançada quando óleo de soja foi usado como fonte de carbono [70].

Uma terceira construção utilizando *P. putida* como uma plataforma também foi obtido pela clonagem de *rhl*AB sob o controle de um promotor induzível [19]. A produção de RML se manteve inferior ao do estudo anterior [70], com a *P. putida* KCTC 1067 (pNE2) atingindo uma concentração máxima de 1,5 g/L em um tempo mais curto (72 horas) do que o trabalho anterior, além de concentração de células inferior [19]. Desta forma, o trabalho de CHA *et al.* (2008) apresenta a maior produção de RML utilizando P. putida como micro-organismo.

Até agora, a maior concentração de RML alcançada por uma cepa não patógena, foi conseguida por clonagem de genes *rhl*A e *rhl*B em *Brukholderia kururiensis*. A cepa resultante, *B. kururiensis* LMM21, atingiu uma média de 7,4 g/L de RML em 10 dias de fermentação [73], um valor semelhante aos encontrados para *P. putida* KCTC 1067 (pNE2) em 7 dias de fermentação [70]. Embora *P. putida* KCTC 1067 (pNE2) possa atingir a mesma produção em um menor período de tempo, óleo de soja foi utilizado como fonte de carbono, enquanto que com *B. kururiensis* LMM21, a glicerina era a única fonte de carbono, reduzindo os custos de produção.

Também não patógena, e não pertencente ao gênero *Pseudomonas, Ralstonia eutropha* foi utilizada como plataforma de expressão heteróloga para os genes *rhlA, rhlB* e *rhlC* de *P. aeruginosa.* Para isso, o micro-organismo foi transformado com um plasmídeo contendo os genes *xylA, xylB, xylF, xylG* e *xylH* de *Pseudomonas fluorescens* PF01. A construção foi capaz de atingir uma produção máxima de 9,2 mg/L de RML. Este trabalho foi depositado em pedido de patente com número WO2014039940-A1 [79].

Escherichia coli é um organismo modelo amplamente usado para a expressão de proteínas heterólogamente, devido à grande quantidade de informação disponível sobre a regulação de seus genes, seu crescimento fácil em substratos de baixo custo e por conta das grandes opções de vetores plasmidiais disponíveis. Alguns esforços foram realizados para usar *E. coli* como uma plataforma para a produção de RML.

O primeiro ensaio de expressão heteróloga em *E. coli* visando à produção de RML encontrado data do ano de 1995. Neste trabalho, os genes *rhl*AB de *P. aeruginosa* PG201 foram clonados com sucesso em *E. coli* DH5 α , porém nenhuma produção de RML significativa foi observada, provavelmente devido a uma disponibilidade limitada de dTDP-L-raminose [39].

Posteriormente, outra construção em *E. coli* uniu as estratégias de clonagem de *rhlAB*, com um operon *rmlBDAC*, a fim de aumentar o fornecimento de precursor de dTDPL- raminose. O resultado apresentou pouca melhora na produção, atingindo 0,121 g/L de RML [77]. Este trabalho parece ter sido o primeiro a produzir RML a partir de *E. coli*, e os autores relacionaram a produção com a presença do operon *rml*BDAC.

Um segundo trabalho bem sucedido utilizou *E. coli* BL21 (DE3) para a inserção de um transposão contendo apenas rhlAB, obtendo 0,175 g/L de RML [76]. Desta forma, pode-se concluir que a expressão do operon rmlBDAC não é essencial para a produção heteróloga de RML em *E. coli*, mas alguma característica observada na cepa comercial BL21 que não está presente na cepa DH5 α .

Para além do âmbito de rhlAB nativa, outro grupo investiu na construção de uma biblioteca de cepas recombinantes de *E. coli*, contendo diversas construções plasmidiais, que variavam nas combinações dos genes rhlA, rhlB, rhlC e diferentes mutações em rhlB. A produção máxima de 0,120 g/L foi obtida com um clone abrigando rhlAB e rhlC, sem mutações, sob o controle do promotor T7, e inoculadas em meio LB suplementado com glicose a 0,4%. Este trabalho reafirma ainda que a co-expressão de um cluster rmlBDAC recombinante não é essencial para a síntese heteróloga de RML em *E. coli*, e depende essencialmente de um bom desenho plasmidial e escolha de cepa hospedeira [69].

3.3.2 Modificações diretas

A primeira modificação óbvia, para aumentar a produção de um composto, seria o aumento dos níveis de expressão das proteínas que fazem parte da sua via biossintética e/ou vias regulatórias. Neste âmbito, várias construções foram feitas, as quais incluem a super expressão dos genes rhlA, rhlB e rhlC, que codificam as enzimas bem conhecidas da via biossintética de RML por *P. aeruginosa*. Em geral, as estratégias têm basicamente desenvolvido novos desenhos de plasmídeos ou de sistemas de expressão contendo estes genes, enquanto alguns trabalhos investem na mutagênese aleatória destes [2].

Em um trabalho em particular, um clone com boa produção foi construído a partir da integração em cromossomo de um operon contendo *rhlAB*, em *P. aeruginosa* PAO1. A quantificação relativa dos RML por CLAE/MS demonstrou com composição estrutural semelhante ao de outras cepas de *P. aeruginosa*, embora com diferente percentagem dos vários congêneres estruturais [76]. Um máximo de 1,819 g/L RML foi alcançada quando a cepa foi cultivada com óleo de soja, atingindo uma produtividade de 18,95 mg/L.h. Quando glicose foi utilizada como única fonte de carbono, o rendimento máximo obtido foi 0,784 g/L, e a produtividade foi 8,19 mg/L.h. Apesar da redução da produtividade, a utilização de glicose como fonte de carbono é interessante devido ao seu custo mais baixo, quando comparado com o óleo de soja [39].

Os autores da patente DE102010032484 [80] super expressaram os genes rhlA, rhlB, rhlC e pa1131 em P. putida KT2440 (tipo selvagem) e GPp104 (com inibição de formação de polihidroxibutirato, P3HB). Eles observaram a importância da inativação da biossíntese de P3HB e do gene pa1131. Em um aperfeiçoamento dessa inovação, a mesma empresa descreveu a manipulação da biossíntese de ácidos graxos [81]. Mais uma vez os autores super expressaram os genes rhlA, rhlB, rhlC e pa1131 em P. putida KT2440 e GPp104 e, adicionalmente, super expressaram rhlG. A fim de melhorar a biossíntese de ácidos graxos eles tentaram aumentar a quantidade de NADPH através da expressão heteróloga de gapC (gene codificante para gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase) de Clostridium acetobutilycum, assim como os genes udhA e pntAB (genes codificantes para transidrogenase solúvel e ligada à membrana, respectivamente) de Escherichia coli. Os melhores resultados foram obtidos com P. putida GPp104, com expressão heteróloga simultânea de rhlA, rhlB, rhlC, pa1131 e pntAB [80, 81].

Outra inovação usando engenharia metabólica para aumentar a produção de RML, e para contornar o problema de patogenicidade de *P. aeruginosa*, foi reivindicado em EP2573172 [82]. Os autores expressaram os genes *rhl*A e *rhl*B da *P. aeruginosa* em *P. putida* KT42C1 (DphaC1::Kmr) sob o controle do promotor PTac. A produção informada foi de pelo menos 0,16 mol de C do RML por mol de C do substrato [82].

3.3.3 Modificações indiretas

A engenharia metabólica tem sido amplamente utilizada para melhorar os níveis de produção de uma variedade de bioprodutos. Nos últimos cinco anos, a coexpressão de hemoglobina de Vitreoscilla (VHb) tem sido uma estratégia de escolha em alguns estudos. A presença desta proteína permite uma maior acessibilidade ao oxigênio pelas células bacterianas, que por sua vez aumentam a biossíntese e níveis de produção de genes de interesse [74, 83].

Esta estratégia foi utilizada para produzir RML com P. aeruginosa NRRL B-771, uma cepa contendo um plasmídeo com a construção de gene de vhb. Esta cepa de P. aeruginosa alcançou uma produção de 8,4 g/L em biorreator. Um trabalho posterior descreve uma produção de 13,3 g/L, usando a mesma cepa recombinante, em meio de cultivo contendo efluentes de indústria de queijo e azeite como fontes de carbono. Estes trabalhos reportam uma das maiores produções alcançada por uma cepa modificada, tendo alcançado um rendimento de 185 mg/L.h [71, 74].

Outra enzima, LipC, foi investigada no que se refere à sua influência sobre a síntese de RML [75, 84]. No entanto, dois grupos independentes mostraram resultados relativamente diferentes: enquanto ROSENAU *et al.*, (2010) mostraram que a super expressão de LipC aumentava a produção de RML, TIELEN *et al.*, (2010) Tielen mostraram que a produção de RML não foi afetada quando LipC foi super expressa [75, 84].

Dentre os documentos encontrados nas buscas da primeira parte desta tese (item 2.1.2), o primeiro documento descrevendo proteção sobre uma linhagem de *Pseudo-monas* mutante foi depositado por GIANI *et al.*, (1994). Este entrou com pedido de proteção para cepas de *P. aeruginosa* modificadas por mutação química pelo uso de N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), para o processo no qual ela foi usada. O processo reivindicado resultaria em produção de L-raminose e RML na faixa de concentração de 70–120 g/L. Apesar de serem o trabalho a reportar a maior concentração final de RML da literatura, o documento é pouco descritivo, o que dificulta sua reprodução.

O caso especial da Esterase A de Pseudomonas aeruginosa PAO1

Explorando a relação entre a proteína da membrana externa de P. aeruginosa, EstA, e a produção de RML, WILHELM *et al.*, (2007) estudou a influência desta proteína e a sua atividade catalítica sobre a produção de RML [27]. O grupo demonstrou que uma cepa incapaz de produzir EstA (*estA*-), teve uma produção de RML severamente reduzida (próximo à 1 mg/mL), assim como uma cepa mutante, com EstA modificada em seu sítio catalítico (sem atividade esterásica). Quando a complementação desta cepa foi realizada a partir da expressão epissomal de *estA*, o fenótipo foi reestabelecido. Por outro lado, a expressão desse mesmo plasmídeo na cepa selvagem gerou um aumento de aproximadamente 4 vezes na concentração de RML de 0,5 para 1,75 g/L aproximadamente) [27].

Também focando em alterações em EstA, um grupo analisou o impacto desta proteína na produção de RML por *P. aeruginosa* SG81, uma cepa mucoide [84]. Foi mostrado que a super expressão do gene *estA* também afetou a produção de RML, aumentando o seu nível extracelular. O clone *P. aeruginosa* SG81estA + apresentou uma produção de RML de 18,90 g/10⁹ células, enquanto a cepa do tipo selvagem produzia 14,94 g/10⁹ células.

Curiosamente, ambas cepas que sofreram alterações na expressão de *estA* mostraram que a sua super-expressão resultou em alterações significativas na razão de Mono- e Di-RML produzidos. Para TIELEN *et al.*, (2010) foi observado, por cromatografia em camada fina, o aparecimento de Mono-RML, não presentes na cepa selvagem [84]. Para WILHELM *et al.*, (2007) é observada uma banda extra, que provavelmente se refere à Di-Ramino-Di-lipídeos [27].

Apesar das cepas construídas nos trabalhos apresentarem uma elevada produção de RML, estas nunca foram utilizadas em estudos visando à produção indústrial de RML. Neste contexto, DOBLER, 2014 construiu a cepa *Pseudomonas aeruginosa*estA com o objetivo de melhor estudar a produção de RML [6].

A cepa foi construída a partir da inserção do plasmídeo pUCP26estA na cepa selvagem *P. aeruginosa* PAO1 e alguns ensaios foram realizados para comprovar a modificação genética e o aumento da produção de RML [6].

O plasmídeo foi construído a partir da inserção do gene *estA* de *P. aeruginosa* (número de acesso AF005091 GenBank®), no shuttle vector pUCP26 [85], sob o controle do promotor lac, juntamente com uma sequência que inclui o peptídeo sinal e o sítio de ligação ao ribossomo (Shine-Dalgarno) [6].

Uma fermentação curta (120 horas) foi realizada, com o objetivo de mostrar o aumento da produção de RML a partir da modificação genética. O cálculo de produtividade por células mostra que houve um aumento de 39% na produção de RML por grama de célula, confirmando a correta clonagem e o aumento da produção de RML pela cepa (Tabela 3.3).

Tabela 3.3: Produção máxima de RML, produtividade e $Y_{p/x}$, por *P. aeruginosa*estA, em fermentação de 120 horas de duração. Análise foi realizada pelo método de quantificação do orcinol (Adaptado de DOBLER (2014)).

Cepa	Produção máxima	Desvio Padrão	Tempo (h)	Produtividade	$\mathbf{Y}_{RML/x}$
	de RML (g/L)			$(\mathrm{mg}_{RML}/\mathrm{L.h})$	
P. aeruginosa PAO1	6,94	0,75	96	72,2	3,65
P. aeruginosa-estA	9,81	0,23	96	102,27	5,06

3.4 Determinação da produção de raminolipídeos e as falhas nos fundamentos da área

Esta seção tem como objetivo listar as técnicas de detecção de RML e discutir as falhas nos fundamentos teóricos da área. Apesar de estes compostos serem estudados há mais de 70 anos [2], não existem métodos robustos de purificação, análise de qualidade ou mesmo de quantificação destes compostos [86]. Será mostrado que apesar disto, combinadas as metodologias disponíveis, é possível aperfeiçõar os estudos e inferir suas possíveis aplicações.

A história destas moléculas começa quando, JARVIS e JOHNSON, (1949) reportaram pela primeira vez, em 1949, que *P. aeruginosa* era capaz de produzir glicolipídeos e definiu que a estrutura destes era formada pela ligação de dois grupos de glicídio com um grupo de ácido graxo (com uma cadeia de dez carbonos).

Posteriormente, HAUSER e KARNOVSKY, (1954) descreveram detalhadamente

a cinética de produção deste composto, e o definiu como um metabólito secundário de *P. aeruginosa*.

O interesse dessas moléculas como composto capaz de baixar tensão superficial, só foi ser reportada na década de 80 [89].

Atualmente, a literatura reporta a crição de micro-organismos geneticamente modificados, onde a manipulação genética é realizada com o intuito de aumentar a produção de RML [2]. Nesse contexto, chega a ser possível notar uma competição por maiores concentrações finaia de RML [2, 20, 90]. Porém, essa comparação (especialmente o comparo quantitativo) é falha.

São diversos os problemas que prejudicam essa comparação. Entre estes problemas, se realçam: a falta de métodos específicos de quatificação, a falta de métodos de purificação e a falta de padrões. Na maioria dos casos, essas falhas resultam na superestimação do valores de concentração de RML.

Em etapa anterior à quantificação, os autores se restringem a uma etapa única de purificação, que consiste na extração do SLC utilizando um solvente orgânico de hidrofobicidade intermediária. A idéia por trás é que o RML, por se tratar de uma molécula anfipática, se solubilizaria totalmente em uma fase orgânica de polaridade moderada, como mostra a figura 3.8. Esta posteriormente é separada da fase aquosa e ainda depois, é deixada evaporar, restando-se apenas o RML [63].

Porém, o método parte de algumas premissas, que podem ser listadas:

- Todas moléculas de RML migrarão para a fase apolar;
- Nenhum açúcar livre migrará para a fase apolar;
- Haverá separação total da fase apolar da polar;
- Não haverá formação de micelas.

Porém, nenhuma das situações acima é provável de acontecer. Um metaboloma de *E. coli*, mostra que um sobrenadante pode ser composto de mais de 231 moléculas de polaridades e estruturas mais diversas [91]. Além disso, são raros os sistemas bifásicos com solubilização quase completa de soluto. Por exemplo, um sistema



Figura 3.8: Figura esquemática do método mais comumente utilizado pela literatura para purificação de RML: a extração por solvente. O método considera que ao misturar SLC com um solvente orgânico (como o acetato de etila) é capaz de extrair todo o RML da fase aquosa (polar) para a fase orgânica (apolar). Esse método também considera que toda a raminose livre se manterá solúvel na fase polar.

água: acetato de etila, terá água solubilizada na fase referente ao acetato de etila e acetato de etila solubilizado na fase majoritariamente água.

Ainda, é importante lembrar que a diversidade de congêneres gera uma diversidade de momento dipolo, o que fará com que a seleção de RMLs em cada uma das fases seja diferente. A Figura 3.9 exemplifica dois congêneres de RML com diferentes momentos dipolo e seu cálculo estimado.

Nos sistemas de purificação de RML descritos na literatura, o provável é que um mistura de SLC com um solvente de apolaridade média, gere um sistema composto de duas fases, sendo a primeira composta majoritariamente de solvente, com os solutos (em ordem aproximada de concentração): RMLs, metabólitos apolares (em relação ao solvente), metabólitos polares (em relação ao solvente), água, sais e ar. A segunda é composta majoritariamente de água, com os solutos (em ordem aproximada de concentração): RMLs, metabólitos polares (em relação ao solvente), sais, solvente, metabólitos apolares (em relação ao solvente), e ar (Figura 3.10).

É provável que apenas uma parte das moléculas se solubilizem na fase apolar,



Figura 3.9: Exemplo de dois congêneres de RML: Rha-Rha-C8, um dos RML mais hidrofílicos já reportado [5] e Rha-C14-C16, um dos RML mais hidrofóbicos já reportado. Desenho das moléculas foram realizadas utilizando o programa GChem Paint Chemical Stuctures Editor. Cálculo do momento dipolo estimado (MDE) foi realizado utilizando o programa Advogadro.

fazendo-se necessária lavagens extras para que estas moléculas sejam (quase que) totalmente removidas da fase aquosa. A maior parte dos trabalhos fazem uma [92, 93] ou três [94, 95] lavagens, com volumes equivalentes entre as fases. Apenas SMYTH *et al.*, (2014) sugere que a lavagem deva ser feita até que o meio deixe de apresentar coloração amarelada.

Em hora, ainda é importante lembrar que muitos autores optam por utilizar óleos vegetais na composição de seus meios de cultivo, implicando ainda mais na questão do balanço de solubilidades.

Dessa forma, é importante a crítica sobre metodologias de purificação do SLC. Concluindo, a metodologia apresenta potenciais problemas:

- Não é considerado que outros compostos serão carreados e detectados juntamente com os RMLs (especialmente no caso das quantificações colorimétricas e gravimétrica, como discutiremos a seguir);
- Não é realizado uma purificação propriamente dita. É provável que, na maior parte das vezes, é extraído parte das moléculas de RML.



Figura 3.10: Figura esquemática: Proposta de separação das moléculas entre as fases, durante extração de RML por solventes. O esquema sugere como devem se distribuir as moléculas presentes no SLC ao se adicionar um solvente orgânico (como o acetato de etila): RMLs podem ser encontrados na interface nos líquidos, na interface ar-fase apolar, nas paredes do recipiente e no seio dos líquidos. Mono e Di-RML podem estar presentes em ambas as fases, especialmente quando em altas concentrações. Ainda, RML podem formar diversos tipos de micelas.

3.4.1 Quantificação clássica

A quantificação é realizada frequentemente por meios indiretos, em especial pela mensuração de açúcares por espectroscopia. Os métodos mais utilizados (método do orcinol e método da antrona), se baseiam na mensuração de composto colorimétrico derivado do furfural. Este, por sua vez, é oriundo da hidrólise ácida da molécula de RML, e posteriormente do grupo raminose.

No método do orcinol, também chamado de método de Koch (por conta da publicação KOCH *et al.*, (1991)) ou método de Chandrasekaran e BeMiller (por conta da publicação CHANDRASEKARAN e BEMILLER, (1980)); é utilizado 1,3dihidroxi-5-metilbenzeno para derivatizar o furfural em um composto capaz de absorver em 421 nm.

Semelhantemente, o método da antrona (9,10-dihidro-9-oxoantraceno) se baseia na geração de um composto colorido que é medido à 625 nm) [98].

Porém, os métodos do orcinol e da antrona partem de algumas premissas:

- Haverá hidrólise total das moléculas de RML presente;
- Haverá conversão de 100 % das moléculas de raminose em furfural, e de furfural para o composto cromóforo;
- Não há contaminação de outros açúcares (monômeros ou polímeros) na amostra;
- Uma razão molar de raminose pode ser relacionada a uma razão molar de RML a partir de um fator de conversão pré definido para aquela amostra.

A hidrólise total e conversão até o cromóforo (item 1 e 2) é provável devido ao excesso de ácido sulfúrico (10 M) em altas temperaturas (80 °C). Porém, o item três é improvável de ocorrer, devido a dependência de uma etapa prévia e robusta de purificação. Dessa forma, outros açúcares são quantificandos junto à raminose, fazendo com que o método do orcinol superestime a concentração de RMLs [20]. O quarto item também é inválido devido a diferente distribuição de congêneres de RML nos diferentes métodos de produção.

Para quantificação apenas da raminose é possível usar cromatografia líquida [6]. Neste caso, uma coluna Aminex HPX-87H (Biorad) foi utilizada para separação de açúcares por exclusão de tamanho e troca iônica. O método resolve parte dos problemas relacionados à questão dos contaminantes. Apesar de não quantificar outros açúcares, toda raminose será quantificada, incluindo raminose livre ou raminose pertecente ao lipopolissacarídeo bacteriano.

A partir do momento que este método quantifica apenas a raminose e não o RML, é necessário um fator de conversão raminose-RML. Em geral, é considerado que 1 unidade de razão molar de raminose equivale a uma unidade de razão molar fixa de RMLs, independentemente das condições de cultivo onde aqueles RML foram produzidos. É importante lembrar que tais alterações nas condições de cultivo geram um conjunto de congêneres diferentes. Estes são alterados, ainda, conforme o tempo de cultivo. Dessa forma não existe um fator comum para qualquer amostra.

Enquanto não há métodos que permitam um cálculo mais adequado do fator a ser utilizado, é sugerido que ocorra uma uniformização entre aos autores, a respeito



Figura 3.11: Exemplo de dois congêneres de RML: Rha-C8:2, um dos menores (em massa) RML já reportado e Rha-Rha-C16-C16, um dos maiores (em massa) RML já reportado. Desenho das moléculas cálculo ma massa molecular foram realizados utilizando o programa GChem Paint Chemical Structures Editor.

do fator a ser utilizado. Porém, podem ser observados trabalhos variando o fator de 2,5 [27, 99] a até 3,4 (massa/massa) [100]. A alteração do fator conforme o trabalho é ideal, porém deve estar relacionada a resultados do espectro de massas, que pudessem indicar quais os congêneres estão presentes naquela amostra específica. A figura 3.11 expôe um dos maiores RML já relatados na literatura, e o menor (em massa) e exemplifica o perigo de se utilizar um fator fixo para cada amostra.

Outros autores, como MÜLLER *et al.*, (2010) utilizam uma técnica adaptada de SCHENK *et al.*, (1995). Neste, o autor realiza uma derivatização do RML em RMLl-p-bromophenocil éster, e após a separação das moléculas detecta, por UV, dois picos que atribuiu a Rha-C10-C10 de Rha-Rha-C10-C10. O autor não leva em consideração, porém, que poderiam haver outros congêneres presentes na amostra. Mais uma vez, a técnica leva em consideração que ocorrerá a derivatização total dos RMLs e parte de uma pré-purificação com solventes orgânicos.

Dessa forma, dentre os métodos onde se está presente a cromatografia líquida, muitos ainda tem como base a mensuração indireta, a partir da quantificação da raminose. Nestes métodos, após a técnica de separação de moléculas por cromatografia líquida, a amostra é mensurada em detectores de UV ou RID [20, 99].

Estes métodos resolvem o problema da mensuração de outros açúcares, porém mantêm o problema do fator de conversão raminose-RML, gerando um valor próximo, mas não exato da massa presente na amostra. É importante lembrar que outros compostos podem estar saindo da coluna junto com a raminose, alterando o tamanho do pico nos cromatogramas (detectores RID e UV) e que, mais uma vez, é necessário considerar total derivatização das amostras.

Alguns autores realizam a quantificação por gravimetria [102]. Para isso, é realizada uma purificação por lavagem com solventes apolares (conforme discutido acima) e após a separação e secagem das fases, estas são mensuradas gravimetricamente com o auxílio de uma balança analítica. Apesar de resolver o problema do fator de conversão raminose-RML, a problemática da quantificação se mantêm por conta da superestimação da massa de RMLs, visto que a purificação falha mantem uma grande quantidade de contaminantes.

Apesar dos métdos do orcinol, da antrona e o método gravimétrico já serem considerados ultrapassados quando comparado às tecnologias atuais, estes métodos continuam sendo os mais utilizados devido à falta de acesso às novas tecnolgicas pela maior parte dos pesquisadores envolvidos na causa. Atualmente métodos de quantificação tem sido propostos com base nas técnicas de cromatografia líquida.

3.4.2 Quantificação moderna

A técnica de cromatografia líquida acoplada em um detector de *evaporative light* scattering detector (ELSD) permite a detecção de glicolípidos sem a necessidade de derivatização. O mecanismo de detecção do ELS é baseado na medição de fótons (luz) que são espalhados por partículas de compostos que foram evaporados da fase móvel. [86].

Dentre suas desvantagens, porém, estão a não separação de isômeros estrutural, a baixa sensibilidade para compostos de baixo peso molecular, e novamente a falta de padrões [86].

Finalmente, o método mais robusto de quantificação é aquele onde a técnica de cromatografia líquida é sucedida de uma análise em espectroscopia de massas (HPLC-MS-MS). Neste, após a semi-separação dos congêneres por cromatografia líquida, as amostras são injetadas em espectro massas massas (MS-MS). Dessa forma, é possível identificar glicolipídios sem a necessidade de separação completa, identificar alguns isômeros por fragmentação, e analisar uma ampla gama de glicolipídios [73, 86, 103].

Apesar de ser a melhor técnica para descrição dos congêneres presentes, não resolve todos os problemas. Entre as desvantagens da técnica podem ser citadas:

- A necessidade de purificação prévia (ao menos remoção de sais e agua, para injeção no massas);
- Método muito sensível para ser utilizado em misturas complexas (gera muito ruído);
- Falta de padrões internos.

3.4.3 Complementação

Existe ainda uma necessidade de métodos mais robustos para quantificação de RML e ainda não é possível basear-se exclusivamente nas técnicas de quantificação de RML disponíveis na literatura. Dessa forma, é sugerido que sempre sejam realizados ensaios qualitativos em paralelo àos quantitativos.

Entre os possíveis ensaios a serem executados estão a cromatografia de camada delgada, a mensuração da tensão interfacial, a análise da capacidade de emulsão e de espalhamento.

Cromatografia de camada delgada (CCD)

A técnica se baseia no separo das moléculas por seu tamanho e polaridade a partir da migração diferenciada das moléculas de em placa geralmente de sílica em alumínio. Após a aplicação da amostra contendo RML próximo à base da placa, esta a placa é inserida em um meio apolar (somente a base) que é geralmente composta de uma mistura de clorofórmio, metanol e ácido acético [73].

Após o fronte do solvente se estabelecer, adiciona-se à placa uma mistura de ácido sulfúrico com orcinol, que irão hidrolisar o RML e derivatizar a raminose em um composto colorimétrico, respectivamente. Dessa forma, aparecem "manchas" de coloração marrom na superfície da placa, em alturas onde anteriormente havia raminolipídeo [73].

Por conta da migração ser induzida por compostos apolares, a técnica é capaz de separar monômeros e polímeros de açúcares de açúcares ligados à cadeias apolares. Dessa forma, é possível analisar a presença de glicolipídeos na amostra sem a interferência de contaminantes.

Tensão interfacial

A partir do momento que RML tem seu principal interesse indústrial baseado na sua capacidade de baixar tensão interfacial, esta é uma das medidas mais interessantes para complementação dos dados obtidos pelos métodos disponíveis de quantificação. A tensão interfacial é geralmente medida pelo método da gota pendente, onde o formato da gota é capturado por uma câmera ligada à um computador com software capaz de codificar a curvatura em valores de força [104].

A técnica, porém tem suas limitações visto que outras moléculas presentes no SLC contribuem para a tensão. As fontes de carbono mais utilizadas como substrato em especial afetam esta mensuração, especialmente a glicerina (um poliálcool) e os óleos vegetais (lipídeos) [2, 89, 105].

Indice de Emulsificação

Esta técnica é uma das mais simples e econômicas baseia-se na análise da capacidade de emulsificação de um óleo em água, quando na presença daquele RML. Após agitação vigorosa, pode ser formada ou não uma emulsão entre água e óleo. A altura da emulsão é então mensurada com o auxílio de um paquímetro após 24 ou 48 horas de repouso [106].

A desvantagem, mais uma vez é a possível presença de outros compostos que poderiam estar auxiliando na emulsificação [99].

Teste de dispersão de óleo

O ensaio de dispersão é também uma técnica de baixo custo e de rápido resultado, e pode ser utilizada para complementar os resultados de quantificação. Para a realização desta adiciona-se óleo cru sobre água (com salinidade semelhante a do mar ou pura) em uma placa de Petri, simulando o derramamento de petróleo em ambiente aquático. Após a adição de alguns microlitros do surfactante ao centro do sistema, o petróleo é disperso formando um halo, que é quantificado [107, 108].

Capítulo 4

Materias e Métodos

4.1 Produção de raminolipídeos

4.1.1 Manutenção das cepas, reativação e pré inóculo

Ambas as cepas utilizadas neste trabalho, *P. aeruginosa*-estA [6], e *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (banco de cepas do Laboratório de Microbiologia Molecular e Proteínas - LaMMP) foram armazenadas a -80 °C em soluções estéreis de 30 a 50% de glicerina P.A.. Todos os experimentos partiram de uma reativação do microorganismo, que foi realizada pela adição de parte da solução de armazenamento em 10 mL de meio Luria-Bertani (LB) (Sigma Aldrich), em tubos de fundo cônico de 50 mL, com 5 a 10 mL de meio. Todos os ensaios deste trabalho foram realizados em condições de rotação de 170 rpm e 30 °C. Para os ensaios em que *P. aeruginosa estA*-foi utilizada, tetraciclina foi adicionada ao meio sob uma concentração final de 100 μ g/mL.

4.1.2 Comparação de cultivos aplicando diferentes fontes de carbono e nitrogênio

A análise comparativa da produção de RML por *P. aeruginosa*-estA foi realizada em sete variações de meio MSP, constituído por: tampão fosfato de potássio (pH =7), uma fonte de magnésio e uma combinação de fonte de carbono e de nitrogênio,

Meio	Fonte de C		Fontes de N		K_2HPO_4	$\mathrm{KH}_2\mathrm{PO}_4$	$MgSO_4.7H_20$
1	Glicerina P.A.	42,00	Nitrato de Sódio	1,40	7,00	3,00	0,20
2	Glicerina P.A.	42,00	Sulfato de Amônio	$1,\!09$	7,00	3,00	0,20
3	Óleo de oliva	$21,\!53$	Nitrato de Sódio	$1,\!40$	7,00	3,00	0,20
4	Óleo de soja	$21,\!50$	Nitrato de Sódio	$1,\!40$	7,00	$3,\!00$	0,20
5	Ácido oleico	$21,\!45$	Nitrato de Sódio	$1,\!40$	7,00	3,00	0,20
6	Etanol	$31,\!50$	Nitrato de Sódio	$1,\!40$	7,00	3,00	0,20
7	Glicose	$41,\!05$	Nitrato de Sódio	$1,\!40$	7,00	$3,\!00$	0,20

Tabela 4.1: Composição, em grama por litro, de cada componente dos meios de cultivo (variações do meio MSP).

como pode ser visto na Tabela 4.1.

As massas de fonte de carbono e de nitrogênio foram calculadas para atingir uma relação C/N de 83 (mol/mol). Todas as fermentações foram realizadas em duplicata, em 100 mL da variante de meio MSP, em Erlenmeyer de capacidade máxima de 250 mL. Todas as fermentações foram realizadas a 30 °C, agitação orbital de 170 rpm e com tetraciclina a uma concentração final de 100 μ g/mL. Para este experimento (preliminar), os inóculos foram de 0,42 g/L de célula (peso seco).

4.1.3 Comparação de cultivos aplicando diferentes razões Carbono/Nitrogênio

Quatro condições de razão C/N foram estudadas para produção de RML por *P. aeruginosa*-estA (Tabela 4.2). Devido às características interessantes deste meio de cultivo, como a simplicidade, baixo custo de produção e o uso de glicerina como fonte de carbono. Também foram realizadas, em paralelo, fermentações utilizando-se *P. aeruginosa* PAO1.

Tabela 4.2: Concentrações (em grama por litro) das fontes de nitrogênio (nitrato de sódio) e carbono (glicerina P.A.) utilizadas nos ensaios de comparação de produção em diferenets razões Carbono/Nitrogênio.

Razão C/N	Fontes de C		Fonte de C		K_2HPO_4	$\mathrm{KH}_{2}\mathrm{PO}_{4}$	$MgSO_4.7H_20$
17,5	Glicerina PA.	30,0	Nitrato de Sódio	4,75	7,00	3,00	0,20
50,4	Glicerina P.A.	$25,\!4$	Nitrato de Sódio	1,40	7,00	3,00	0,20
83,2	Glicerina P.A.	42,0	Nitrato de Sódio	1,40	7,00	3,00	0,20
116,0	Glicerina P.A.	$58,\!9$	Nitrato de Sódio	1,40	7,00	3,00	0,20

A partir da solução de reativação (vide tópico 'Manutenção de cepas'), as cepas foram pré-inoculadas em frascos Erlenmeyer de 1 L, contendo 300 mL de meio de crescimento MSPI (constituída por 30,0 g/L de glicerina P.A., 1,4 g/L de NaNO₃, 7,0 g/L de K₂HPO₄, 3,0 g/L de KH₂PO₄, 0,2 g/L de MgSO₂.7H₂O, 5 g/L de peptona de soja e 5 g/L de extrato de levedura).

As células foram colhidas em fase exponencial (após 40 horas do inóculo) e reinoculadas em uma concentração definida de células inicial de 0,85 g/L (massa de célula seca), em Erlenmeyer de 1L contendo 300 mL de cada uma das variantes de meio de fermentação.

As fermentações foram conduzidas até a exaustão de glicerina e foram retiradas amostras para quantificação de biomassa, de glicerina e de RML, e mensuração da tensão superficial. As razões C/N foram escolhidas baseando-se nos trabalhos de TAVARES (2012) e SANTA ANNA *et al.*, (2001) [98, 109].

Todas as fermentações foram realizadas em duplicata, a 30 °C, agitação orbital de 170 rpm. Para os cálculos dos parâmetros de produção, foram utilizadas as seguintes definições:

- Y_{RML/X} Diferença, em gramas por litro, de RML (t=0 até tempo de maior produção); sobre a diferença, em gramas por litro, de células (t=0 até tempo de maior produção).
- Y_{RML/S} Diferença, em gramas por litro, de RML (t=0 até tempo de maior produção); sobre a Diferença, em gramas por litro, de substrato (t=0 até tempo de maior produção).
- Y_{X/S} Diferença, em gramas por litro, de células (t=0 até tempo de maior produção); sobre a diferença, em gramas por litro, de substrato (t=0 até tempo de maior produção).

4.1.4 Comparação de cultivos aplicando diferentes inóculos

Três concentrações diferentes de inóculos foram estudadas para a cepa *P. aeruginosa*-estA. A metodogia seguida foi a mesma informada no tópico anterior (razão C/N 83,2), exceto pelas concentrações de inóculo que se deram pelas que seguem (4.3):

Tabela 4.3: Concentrações de inóculos testadas em ensaio comparativo para P. *aeruginosa*-estA, expressas em g/L e em absorbância.

ABS_{600nm}	Concentração
	(g/L)
1,0	0,53
1,6	0,85
2,4	1,28

4.1.5 Estudo da produção a partir de fonte alternativa de glicerina

Além disso, estes ensaios foram realizados também em meios de cultivo utilizando glicerina bruta como única modificação na composição do meio de cultivo (Tabela 4.4). A glicerina bruta, proveniente da produção de biodiesel (soja) utilizada, foi doação de PETROBRAS.

A empresa informou que uma pureza de 84 % (v/v), uma concentração de NaCl de 7 g/L e uma concentração de metanol menor que 1000 ppm.

Tabela 4.4: Composição, em grama por litro, do meio de cultivo utilizando glicerina P.A. e bruta são semelhantes, a não ser pela origem do substrato. Valores são dados em equivalente de glicerol e não concentração total do rejeito.

Razão C/N	Fonte de C		Fonte de N		K ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄	$MgSO_4.7H_20$
83,2	Glicerina P.A.	42,0	Nitrato de Sódio	1,40	7,00	3,00	0,20
83,2	Glicerina bruta	$42,\!0$	Nitrato de Sódio	$1,\!40$	7,00	3,00	0,20

4.2 Métodos Analíticos

4.2.1 Quantificação da concentração celular

A concentração celular foi acompanhada por espectrofotômetro (Abs_{600nm}) e a concentração em peso seco (g/L) calculada a partir de uma curva padrão de ab-

sorvância versus peso seco.

$$Abs_{600nm} = \frac{[C]}{0,533} \tag{4.1}$$

Onde Abs_{600nm} é a absorbancia a 600nm e [C] é a concentração de células em grama por litro.

4.2.2 Quantificação de raminolipídeo e glicerina

A quantificação da RML foi avaliada de forma indireta, a partir da quantificação de raminose, conforme realizado em ALMEIDA, (2011) [110]. Para isso, o RML foi hidrolisado em ácido graxo e raminose, por meio da adição de 100 μ L de uma solução de ácido sulfúrico 10 M, a um mililitro de sobrenadante (meio de cultivo livre de células), em temperatura acima de 80 °C, por 4 horas em banho-maria. Em seguida, a mistura foi neutralizada com NaOH a 10 M, filtrada com um filtro de 0,22 μ m e a concentração de raminose foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Para a CLAE, foi utilizada coluna Aminex HPX-87H, BioRad®, com 5 mM de ácido sulfúrico como fase móvel a uma taxa de 0,6 mL/min, e temperatura de forno de 42 °C, em um HPLC Shimadzu LC-20AP.

Para melhor comparação com a literatura, algumas amostras foram quantificadas, usando-se o método tradicional de quantificação de RML, do orcinol [96, 97]. O procedimento foi seguido como descrito em KOCH *et al.*, (1991) [96] com algumas modificações: Amostras de 200 μ L de sobrenadante foram misturados com 1,8 mL de reagente de orcinol contendo 53% de ácido sulfúrico e 0,19 % de orcinol. A mistura foi incubada a temperaturas acima de 80 °C durante meia hora e a absorbância a 421 nm (raminose) foi medida em espectrofotómetro e comparada a uma curva padrão.

Para a conversão de raminose para RML foi utilizado um fator de 2,5, no pressuposto de que 1 g de raminose corresponde a 2,5 g de RML [27, 84].

Para a quantificação da glicerina, as mesmas condições de CLAE foram realizadas; porém sem nenhum pré-preparo da amostra, a não ser pela diluição (10x) em água deionizada.

4.2.3 Cromatografia de camada delgada (CCD)

Para análise de uma possível alteração da proporção Mono/Di-RML, a mistura de RML produzida foi analisada por cromatografia delgada. Esta foi realizada como em WILHELM *et al.*, (2007), com algumas modificações [27]: Dois microlitros do SLC de cada fermentação foram aplicados a um centímetro da borda da folha de cromatografia (folhas de alumínio do tipo sílica gel 60, Merck®, Alemanha).

Após aplicação e secagem da amostra (temperatura ambiente), a folha de alumínio foi disposta verticalmente em uma cuba, e uma fase móvel constituída de clorofórmio : metanol : ácido acético glacial (65:15:02) foi adicionada até alcançar 0,8 cm da borda da folha (e 0,2 mm do local de aplicação da amostra).

Após 40 minutos de corrida, a folha foi deixada em posição horizontal para evaporação da fase móvel. Posteriormente, a folha foi borrifada com solução contendo 75 g de orcinol, 4,2 mL de ácido sulfúrico e 21 mL de água deionizada [84]. Então a folha foi incubada em estufa a 90 °C, onde permaneceu por 10 minutos (quando as bandas começaram a ser visíveis). O experimento foi realizado em duplicata

4.2.4 Indice de emulsificação

O teste de emulsão foi realizado como SRIRAM *et al.*, (2011) e RIZZO *et al.*, (2014) [108, 111]. Para isso, 1mL de SLC da produção de glicerina bruta (1,28 g/L de inóculo) foi coletado e misturado com 1 mL de diferentes óleos (girassol, soja, canola, mineral, milho e tributirina) em um tubo de vidro de 10 mL, misturando bem com o vortex por 2 min. A mistura foi deixada em repouso durante as próximas 24 horas à temperatura ambiente. A atividade emulsionante foi expressa como a percentagem da altura da camada de emulsão (cm) dividida pelo total da altura da coluna de líquido após 24 horas. Cada óleo foi avaliado em triplicata. A equação (4.2) foi usada para determinar o índice de emulsificação (IE₂₄).

$$IE_{24} = \frac{H_e}{H_t} * 100 \tag{4.2}$$

Onde IE IE_{24} é indice de emulsificação após 24 horas, H_e é altura de emulsão e H_t é altura toral.

4.2.5 Dispersão de petróleo

A capacidade de dispersão do óleo na água foi medida de acordo com MORI-KAWA *et al.*, (2000) [107]. Em uma placa de Petri de 15 cm foram adicionados 45 mL de água destilada e 20 mL de óleo médio °API. Então, 15 μ L do SLC da produção de glicerina bruta (inóculo de 1,28 g/L) foram adicionados à superfície do óleo. O diâmetro do halo foi medido após 1 minuto e foi utilizado SDS (dodecilsulfato de sódio) como um controle positivo. Os resultados foram expressos como diâmetro (cm) de halos obtidos após 1 minuto. Cada teste foi realizado em triplicata.

4.2.6 Tensão superficial (TS), Tensão Interfacial (TI), concentração micelar crítica (CMC) e diluição micelar crítica (DMC)

As medidas de TS foram analisadas pelo método da gota pendente [104] utilizando o equipamento Drop Shape Analyzer - DSA100 da Krüss, em condições ambientes de temperatura e pressão.

As medidas de TI em sistemas líquido: líquido (óleo água, óleo água do mar sintética (AMS), óleo AMS + SLC), também foram medidas pelo método de gota pendente [104] e pelo goniômetro Krüss DSA100 (Modelo: OF 3210). Porém, para os ensaios de TI o goniômetro foi acoplado ao acessório PD-E1700-LL (Eurotechnika), que permite a realização de análises de tensão superficial e interfacial sob condições controladas de pressão e temperatura.

Os resultados foram expressos como uma média de pelo menos 3 gotas através de um sistema de processamento de imagem (goniômetro acoplado ao computador), onde cada gota pendurada na ponta de uma agulha foi analisada usando a curvatura do perfil de gota para determinar a TS e TI de um líquido.

Para a concentração micelar crítica (CMC) e diluição micelar crítica (DMC), diversas diluições de sobrenadante, que variaram de 0 a 1000, foram realizadas e suas TS mensuradas. Todas as análises de TS foram realizadas utilizando sobrenadante (meio de cultivo livre de células) do último dia de fermentação, onde toda glicerina havia sido consumida, visto que estes interferem na TS e TI.

4.3 Uso do sobrenadante livre de células em simulação de vazamento de óleo

Com o intuito de analisar a possibilidade de uso do SLC em ambientes marítimos impactados com petróleo, foram simuladas condições (salinidade, pressão e temperatura) de coluna d'água onde comumente ocorrem acidentes envolvendo petróleo no Brasil.

A tensão interfacial de um sistema petróleo água do mar sintética (AMS) foi estudada sob luz de um planejamento experimental do tipo DCCR com três repetições no ponto central. A fase aquosa foi preparada a partir da solubilização de SLC obtido a partir de fermentação realizada com glicerina bruta (inóculo 1,28 g/L) em AMS. As variáveis estudadas (temperatura, pressão e salinidade) e seus respectivos valores codificados são detalhados na Tabela 4.5. Os ensaios foram repetidos para dois petróleos de densidade (°API - American Petroleum Institute) diferentes. Posteriormente, estudou-se o sistema água hexano, onde as variáveis controladas foram concentração de RML, temperatura, pressão e salinidade (Tabela 4.6). As análises estatísticas foram feitas utilizando o software STATISTICA trial 12.0.

Tabela 4.5:	Valores re	eais e codifi	cados utiliz	zados no pl	lanejamento (experimental de
um sistema	AMS Petr	róleo.				

Nível	-1,68	-1	0	1	1,68
Temperatura (°C)	4	8	14	20	24
Salinidade (g/L)	34,0	34,6	35,5	36,4	37,0
Pressão (Pa)	$1,0 \times 10^5$	4.5×10^{6}	$1,1 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$	$2,2 \times 10^7$

Nível	-2	-1	0	1	2
Temperatura (°C)	4	9	14	19	24
Salinidade (g/L)	34,0	34,8	35,5	36,3	37,0
Pressão (Pa)	$1,0 \times 10^5$	$5,6 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$	$2,2 \times 10^7$
RML Conc. $(\mu g/L)$	50	100	225	366	500

Tabela 4.6: valores reais e codificados utilizados no planejamento experimental de um sistema AMS Hexano.

4.4 Toxicidade do sobrenadante livre de células

4.4.1 Cultivo de Artemia salina

Para analisar a toxicidade do surfactante produzido, o teste de toxicidade aguda foi realizado usando Artemia salina como modelo, seguindo os métodos descritos por PERSOONE e WELLS (1987), PIMENTEL et al., (2011) e NUNES et al., (2006). O teste usando A. salina como modelo consiste na exposição de náuplios de fase II ou III por 24 h em concentrações crescentes da amostra a ser testada, e a análise subsequente do número de organismos mortos ao final do tempo de exposição.

Foi dissolvido 33 g de água do mar sintética em pós (comprado em loja especializada para aquaristas, marca Red Sea Water) em 1 L de água destilada, o pH foi ajustado com 1 M H₂SO₄ a 7 < pH < 8, e a solução transferido para um funil de separação. 0,1 g de cistos *Artemia salina* foram então adicionados ao funil.

Para oxigenação e agitação, uma mangueira, contendo uma pedra pome, foi introduzida até sua extremidade tocar o fundo do funil. A outra extremidade estava conectada a uma bomba de ar. O sistema foi mantido à temperatura ambiente e luz intensa por 24 horas. Posteriormente, o borbulhamento de ar foi parado e o sistema deixado em repouso durante 15 minutos, com luz incidente perto da boca do funil.

Os cistos eclodidos (embriões nadadores) foram então concentrados perto da boca do funil a partir da iluminação desta região. O funil foi aberto e cerca de 200 mL foram recolhidos. A partir desta solução concentrada, os embriões foram separados dos cistos não eclodidos com a ajuda de uma pipeta Pasteur. Os embriões foram então adicionados a um novo funil, sob as mesmas condições, por 24 horas. Para melhor nutrição dos embriões, 0,1 g de maltodrexina foi adicionado à AMS.

Após 24 horas, os embriões que atingiram a fase larval foram transferidos para placas de seis poços contendo 6 mL de RML em várias diluições. As placas foram deixadas durante 24 horas sob luz intensa e a percentagem de animais em movimento foi contabilizada. A toxicidade aguda foi calculada por meio da avaliação ID $_{50}$ (dose inibitória de 50 % da população) de 24 horas e seus limites de confiança (95 %) calculados pela análise de regressão por óbitos a partir de 24 h usando o programa STATISTCA trial 12.0 [115].

4.4.2 Cultivo de células de mamífero

Os ensaios de toxicidade em células de mamífero foram relizadas pelo pesquisador Leandro Stefano Sangenito, do Laboratório de Investigação de Peptidases, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

As linhagens de célula de mamífero A549 (células epiteliais alveolares humanas adenocarcinômicas), LLC-MK2 (células epiteliais de rim de macaco) e RAW 264.7 (macrófagos murinos) foram mantidas em meio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) com suplemento de 10 % de soro bovino fetal (FBS), a 37 °C e em uma atmosfera contendo 5 % CO₂.

O efeito de vários SLC na viabilidade de células A549, LLC-MK2 e RAW foi avaliado por ensaio MTT [116]. Primeiro, as células de mamíferos $(10^5/\text{mL})$ foram aderidas em placas de 96 poços por 12h, a 37 °C, em uma atmosfera com 5 % CO₂. As células não aderentes foram removidas por lavagens com DMEM estéril e os poços foram novamente enchidos com meio DMEM suplementado com 10 % FBS. Depois disso, cada linhagem celular foi incubada ou não (controle) com concentrações crescentes dos compostos de teste (2 a 1000 μ g/ml) e depois incubada por mais 24 horas a 37 °C, em uma atmosfera de 5 % CO₂. Subsequentemente, o meio de cultura foi removido e a formação de formazan foi medida pela adição de MTT (5 mg/mL em PBS) (Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, EUA) e incubação dos poços por mais 3 horas no escuro, e a 37 °C. As placas foram então centrifugadas a 500 g durante 8 minutos, o sobrenadante foi cuidadosamente removido, o sedimento dissolvido em 200 μ L de DMSO e a absorvância medida num leitor de ELISA a 570 nm (SpectraMax Gemini 190, Molecular Devices, CA, EUA). A concentração onde há morte de 50 % das células (CC₅₀) foi determinada por análise de regressão linear.

4.5 Antibiograma

Foi realizado de acordo com a norma padrão definida pelo *Clinical and Labo*ratory Standards Institute (CLSI) [117]. Módulos individuais contendo 15 discos com antibacterianos foram adquiridos da SENSIFAR E MULTIFAR-CEFAR. Os antibióticos do *kit* Multifar 15 Gram-Negative Series foram: cefepima, cefoxitina, cefotaxima, ceftriaxona, amoxicilina + ácido clavulânico, aztreonam, amicacina, ampicilina, ceftazidima, ciprofloxacina, cotrimoxazol, cloranfenicol, gentamicina, tetraciclina, tobramicina.

Capítulo 5

Resultados e Discussão

5.1 Comparação de cultivos aplicando diferentes fontes de carbono e nitrogênio

A fim de abordar a produção em diferentes fontes de carbono, uma análise comparativa da produção de RML por *P. aeruginosa*-estA foi realizada em variações do meio de cultivo MSP. A variação foi realizada em relação à composição da fonte de carbono ou fonte de nitrogênio, com manutenção do tamponamento em pH=7 e fonte de Mg. A razão C/N de 83,2 foi mantida entre as condições e os resultados estão apresentados na Figura 5.1.

Melhor substrato para produção de raminolipídeos

A fermentação usando nitrato de sódio como fonte de nitrogênio e glicerina P.A. como fonte de carbono apresentou maior valor de concentração final de produto, chegando a 5,16 g/L de RML em 72 horas de cultivo. A produção observada em óleo de oliva (4,14 g/L) óleo de soja (4,14g/L) e ácido graxo (3,68 g/L), foram estatisticamente semelhantes (Tukey e ANOVA; p<0,05). Dessa forma, são tão importantes quanto a glicerina, quando o objetivo está relacionado à altas concentrações finais de RML.

A glicerina é considerada um problema no contexto da produção de biodiesel, visto que é um co-produto em quantidades muito acima do que o mercado é capaz


Figura 5.1: Produção de RML por *P. aeruginosa*-estA em 24h e 72 horas de produção, em diferentes fontes de carbono ou nitrogênio. Em todos ensaios foi mantida a razão Carbono/Nitrogênio de 83,2 mol/mol e inóculo de 0,42 g/L de células (massa seca). Razão volume do frasco/volume de meio de cultivo (Vf/Vm) foi de 250mL/100mL. Letras referenciam diferentes condições segundo análise de variância (*one-way* ANOVA, p<0,05).

de absorver [118–121]. Dessa forma, para que o biodiesel se mantenha como uma alternativa ambientavelmente amigável, é necessário buscar novas aplicações para este co-produto. Com o intuito de colaborar nesta área, a glicerina foi escolhida como fonte de carbono para os próximos ensaios.

Além disso, visto que, em geral, são utilizados solventes apolares para extração e purificação de RML [20, 86], o uso de óleos poderia aumentar o número de etapas e custo do processo de *downstream*. O glicerina, por outro lado, pode ser consumido totalmente em poucos dias [109, 122].

Etanol como fonte de carbono

A produção utilizando etanol como fonte de carbono gerou uma produção próxima à zero, diferentemente do observado por MATSUFUJI *et al.* (1997). Estes relataram produção a partir de etanol, utilizando *Pseudomonas aeruginosa* IFO 3924 (uma cepa não modificada) [123]. O cultivo de duração de 7 dias, em batelada alimentada, gerou uma produção de até 32 g/L, sendo assim, uma das mais altas concentrações finais de RML relatadas na literatura.

A concentração de etanol inicial utilizada foi similar à utilizada pelo grupo: 31 e 30 g/L, respectivamente. Porém, a cepa *P. aeruginosa*-estA, não foi capaz de crescer nesta fonte de carbono, resultando na não-detecção de RML nas primeiras 24 horas . Após 72 horas, há detecção de RML que pode ser justificada pela lise celular do inóculo e consequente liberação de material intracelular.

Glicose como fonte de carbono

Da mesma maneira, a glicose, um substrato comumente utilizado para a produção de RML [2], não gerou grandes quantidades de RML neste trabalho. Enquanto que o presente trabalho utilizou 41 g/L de glicose, a fim de manter a mesma relação C/N das outras variações do meio de cultivo, WITTGENS *et al.* (2011) utilizaram uma concentração de 5-10 g/L [19]. Dessa forma, a baixa produção de RML poderia ser explicada pela alta quantidade do açúcar no meio, que levou à uma inibição das vias metabólicas do micro-organismo.

Ácido graxo como fonte de carbono

Como já discutido, fermentações utilizando óleos vegetais como fonte de carbono são bem estudadas e, em geral, são as fontes de carbono utilizadas nas fermentações com maiores rendimentos reportadas na literatura [2, 90]. Por outro lado, apenas um trabalho relata a produção utilizando uma fonte de carbono majoritariamente composta de uma mistura de ácidos graxos [100]. O grupo estudou a produção em batelada de RML por *Pseudomonas aeruginosa* LBI, utilizando co-produto de refinaria de óleo de girassol como única fonte de carbono. A mistura, composta principalmente de ácido linoleico (50%) e ácido oleico (25%), promoveu uma concentração máxima de RML de 15,9 g/L, em 54h de fermentação (e produtividade de 29,4 mgRML/L.h). A produção foi atingida utilizando a fonte de carbono em uma concentração inicial de 2,5% [100]. A quantificação de RML pelo grupo foi realizada a partir do método do orcinol [100]. Até onde foi pesquisado, o presente trabaljo é o primeiro a relatar apenas um ácido graxo como única fonte de carbono. Os dados aqui apresentados são importantes não apenas no contexto de fontes de carbono para produção de RML, mas também para o estudo da função da enzima EstA.

Nitrato de sódio *versus* sulfato de amônio como fonte de nitrogênio

Enquanto em meio de cultivo contendo glicerina P.A. e nitrato de sódio, *P. aeruginosa*-estA, gerou uma concentração final de 5,16 g/L de RML (em 72 horas); no meio de cultivo contendo glicerina P.A. e sulfato de amônio, este micro-organismo gerou uma concentração final de apenas 2,38 g/L de RML. Entende-se que o N do grupamento amônio é mais rapidamente assimilado pelas células que o N de nitrato, visto que o primeiro sofre redução à amônio, passando por mais etapas metabólicas. Apesar disso, o cultivo contendo sulfato de amônio não levou à uma maior produção. Esse resultado vai ao encontro do reportado por SANTOS *et al.* (2002). O grupo propõe que o uso de nitrato pode ser visto pela célula como uma simulação de condições limitadas de nitrogênio, onde se sabe que a produção de RML é acentuada [122].

Análise de um possível papel de EstA na captação de fontes de carbono

A partir da construção de um mutante contendo *estA* cromossomal interrompido por um cassete e sua complementação por plasmídeo contendo uma variação de *estA*- (sem atividade catalítica), WILHELM *et al.* (2007) mostraram que a atividade esterásica é essencial para uma maior produção de RML e não só a presença da proteína (com modificação sítio-dirigida em seu sítio catalítico). Como as melhores taxas de produção de RML da literatura envolve óleos vegetais [2, 90], foi elaborada a hipótese de que esta enzima poderia agir sobre esses triglicerídeos, provendo ácidos graxos à via de oxidação ou síntese *denovo* de ácidos graxos, que povêm 3(3-hidroxialcanoiloxi) alcanoatos à via de síntese de RML (Figura 3.2).

Dessa forma, foi realizada a comparação da produção de RML em óleo vegetal, em ácido graxo, e em glicerina (estes dois últimos, produtos da hidrólise de um óleo por uma esterase), para assim obter as primeiras evidências que esclarecessem esta hipótese. Para completa análise desta hipótese, é necessário controles que envolveriam cepas estA-, estAmut (com sítio catalítico modificado a partir de uma mutação sítio-dirigida) e a cepa selvagem.

Para que a hipótese fosse verdadeira, era esperado que no início da cinética fosse observada uma maior produção de RML para a condição contendo ácido graxo como única fonte de carbono. Já em um segundo tempo, era esperado que todo óleo já estivesse hidrolisado e então a disponibilidade de mols de carbono seria similar à todas as três condições (glicerina, óleo e ácido graxo como únicas fontes de carbono), resultando em uma produção similar de RML.

O observado, porém, foi uma produção de 1,0 g/L para as condições utilizando óleo de oliva e glicerina, de 0,5 g/L para a condição utilizando óleo de soja, e de 0,1 g/L para a condição com ácido oleico em 24 horas.

Com estes dados, a hipótese de que EstA estaria envolvida no aumento de RML a partir do aumento da oferta de ácidos graxos à via de síntese de RML (e por consequência aumentando a velocidade da cascata de reações) é falsa.

Por outro lado, a produção de RML em óleo de oliva foi similar para a condição contendo apenas glicerina, podendo ser proposto então que a enzima estaria relacionada à disposição de glicerina, e não de ácidos graxos. A diferença entre os óleos vegetais pode estar ligada à pureza dos óleos utilizados.

Já para o tempo de 72 horas, era esperado que o excesso de atividade esterásica provida pela modificação genética permitisse uma mesma produção de RML para as três condições, o que foi confirmado por uma análise de variância (*One-way* ANOVA; p<0.05) (Figura 5.1).

Pode ser sugerido então que a disponibilidade do glicerina é um importante alvo de estudos para o entendimento da síntese de RML e estratégia de aumento da produção destes, assim como para a elucidação do papel de EstA. Nesse contexto, o estudo da produção em diversas razões C/N é um ponto a ser estudado para obtenção de altas concentrações finais de RML.

Por outro lado, para elucidação do papel de EstA na via de síntese de RML, estudos devem ser feitos comparado a variante selvagem, *P. aeruginosa*-estA e uma variante *estA*-. Para continuação dos estudos, é sugerido a construção de um mutante sem a atividade esterásica de EstA (mutação no sítio catalítico) e a análise da produção de RML nestes diferentes substratos (óleo vegetal e ácidos graxos).

Além disso, é amplamente conhecido que a fonte de carbono utilizada na fermentação reflete em diferentes congêneres de RML [5], sendo então importante que se estude também os diferentes congêneres formados a partir de produções envolvendo estes diferentes clones e fontes de carbono.

5.2 Comparação de cultivos em diferentes razões Carbono/Nitrogênio

Visto que a disponibilidade de glicerina se mostrou interessante para um início da produção de RML já nas primeiras 24 horas (Figura 5.1), foi realizada a análise comparativa da produção de RML por *P. aeruginosa*-estA e sua cepa de origem (*P. aeruginosa* PAO1), em variações de razão C/N do meio MSP: 17,5, 50,4, 83,2 e 116,1. Os meios, compostos de glicerina P.A. como exclusiva fonte de carbono, em concentrações de 30,0, 25,4 42,0 e 58,9 g/L (Tabela 4.2),respectivamente, foram utilizados para produção de RML pelas duas cepas. O ensaio foi realizado em duplicata, até exaustão do glicerina ou até o 18° dia, para as condições onde esse ainda não havia cessado. Foi utilizada uma concentração de nitrogênio de 1,40 g/L para as razões C/N = 50,4, 83,2 e 116,1 e 4,75 g/L para a razão C/N=17,5. Os resultados são apresentados graficamente na Figura 5.2 e os parâmetros da cinética na Tabela 5.1.



Figura 5.2: Produção de RML em diferentes razões Carbono/Nitrogênio (C/N), pelas cepas *P. aeruginosa*-estA e *P. aeruginosa* PAO1. Ensaios foram realizados a partir de 1,28 g/L de (massa seca) de células. Fonte de carbono utilizada foi glicerina P.A. e de nitrogênio, nitrato de sódio.Vf/Vm= 1000/300 (mL/mL).

Tabela 5.1: Parâmetros cinéticos de cultivos realizados em diferentes razões C/N. PM = produção máxima, x = concentração celular, Si = concentração inicial de substrato, Q_{PM} = produtividade. Razão C/N = 17,5 têm concentração de nitrato de sódio diferente (4,75 g/L) das demais (1,4 g/L).

Razão C/N	РМ	Tempo_{MP}	X_{PM}	\mathbf{S}_i	\mathbf{Q}_{PM}	$\mathbf{Y}_{RML/x}$	$\mathbf{Y}_{RML/s}$	$\mathbf{Y}_{x/s}$
$(\mathrm{mol}/\mathrm{mol})$	(g_{RML}/L)	(dias)	(g/L)	(g/L)	$(\mathrm{mg}_{RML}/\mathrm{h.L})$	(g_{RML}/g)	(g_{RML}/g)	(g/g)
P.aeruginoso	<i>i</i> -PAO1							
17,5	6,6	4	3,39	30,0	68,8	2,66	0,300	0,113
50,0	3,0	10	1,74	$25,\!4$	12,5	3,70	0,101	0,029
83,2	$5,\!5$	16	2,02	42,0	14,3	3,89	0,188	0,048
116,0	2,12	18	1,14	58,9	5,0	8,16	0,052	0,064
P.aeruginosa	ı-estA							
17,5	6,5	6	2,04	30,0	45,0	3,45	0,235	0,068
50,0	5,4	7	1,99	$25,\!4$	32,1	4,78	0,228	0,045
83,2	$14,\! 6$	8	3,07	42,0	76,0	$6,\!55$	0,377	$0,\!058$
116,0	14,6	16	2,09	58,9	38,0	$12,\!17$	0,248	0,020

Duração da cinética e produção celular

Conforme descrito anteriormente, os cultivos em diferentes razões C/N foram interrompidos quando houve exaustão do substrato ou no 18° dia. Este último caso ocorreu apenas para a cepa selvagem nas razões C/N = 50,0 e 116,0 (Figura 5.2 C e G). Para a condição C/N = 50,0 (Figura 5.2 C) porém, a concentração de glicenina foi basal (menor que 1,5 g/L) apartir do décimo dia, quando a cepa atingiu sua produção máxima e começou a apresentar morte celular.

Caso fosse considerado o décimo dia como tempo final para a condição cepa selvagem C/N = 50,0 (Figura 5.2 C), pode-se afirmar que o tempo total de produção está positivamente relacionado à concentração de glicerina, para ambas cepas; e que a modificação genética foi capaz de reduzir o tempo total de produção em todas as condições onde a concentração de nitrogênio foi limitante (1,41 g/L). A queda no tempo chega a 65 % para a condição C/N=83,2 (Figura 5.2 E e F), que também é a condição onde há a maior produção de RML(Figura 5.2 F),.

Dessa forma, pode-se considerar que a modificação genética não reduziu o tempo da cinética apenas para a condição C/N = 17,5 onde as duas cepas apresentaram comportamento semelhantes (Figura 5.2 A e B). A principal diferença, é que,para a cepa selvagem o consumo do substrato é mais acentuado nos primeiros dias (Figura 5.2 A e B).

Nessa condição, a cepa selvagem não chega a atingir um patamar na sua cinética de crescimento celular, enquanto que no cultivo utilizando *P. aeruginosa*-estA é observada uma fase *lag* até o primeiro dia. Após as 24 horas iniciais, esta cepa apresentou crescimento acelerado até as 48 horas, quando atingiu estabilidade em concentração celular (Figura 5.2 A e B).

Conforme já discutido, a literatura costuma reportar o RML como um metabólito secundário, que é produzido após a fase exponencial de crescimento celular [2, 124]. O fato do cultivo utilizando a cepa selvagem nesta razão C/N (17,5) não ter atingido a fase estacionária, porém não impediu a produção de RML, que chegou a um máximo de 6,6 g/L (Figura 5.2 A e B).

O alto $Y_{x/s}$ indica que houve um desvio da energia obtida da fonte de carbono, para a produção de células $(Y_{x/s})$ nas fermentações utilizando a cepa selvagem. Este cultivo atingiu um valor de $Y_{x/s} = 0,113$ (g/g) enquanto que para as outras condições foi observado um valor máximo de 0,068 (g/g) (Tabela 5.1).

Na condição C/N = 116,0, embora o crescimento celular seja menor do que na condição de razão 83,2, e similar à relação C/N = 50,0, essas células geradas foram capazes de produzir mais RML por grama de substrato (Tabela 5.1). Os resultados sugerem que, apesar da presença de mais fonte de energia para o crescimento celular, a alta concentração do mesmo pode inibir este crescimento.

Concluindo, se por um lado a C/N de 50 não oferece suficiente fonte de carbono ao micro-organismo, a alta concentração de glicerina em C/N=116 pode inibir no crescimento celular, retardando o processo. Assim, os melhores resultados de produção de RML e produtividade utilizado foram vistos pelo C/N de 83.2 (Tabela 5.1).

Esterase A pode estar relacionada à disponibilidade de nitrogênio

A Tabela 5.1 compara os parâmetros de processos para as quatro condições de fermentação. É possível afirmar que *P. aeruginosa*-estA foi capaz de produzir mais RML por biomassa $(Y_{RMl/x})$ em todas as condições, confirmando os resultados preliminares obtidos em DOBLER, (2014) e o potencial desta cepa para uso industrial.

Conforme apresentado na introdução e revisão bibliográfica desta tese, WI-LHELM *et al.*, (2007) reportou um aumento de cerca de 4 vezes na produção de RML quando o gene *estA* foi complementado por expressão episomal em uma cepa *estA*- (cepa com o gene *estA* interrompido). O trabalho de WILHELM *et al.*, (2007), porém, leva-nos a inferir que o aumento da produção de RML seria observado independentemente da condição ambiental que a cepa se encontra.

Os resultados apresentados na Tabela 5.1 e na Figura 5.2 A e B mostram que ao contrário de que poderia ser inferido pelo trabalho de WILHELM *et al.*, (2007) o aumento da expressão de *estA* não está necessariamente relacionado à um aumento da produção de RML. Na razão C/N = 17,5, por exemplo, não foi observado mudanças na concentração final deste composto.

Por outro lado, uma diferença de até 290 % na concentração máxima de RML foi observada quando a condição razão C/N foi igual à 83,2 (Figura 5.2 E e F). Sob estas condições, a cepa *P. aeruginosa*-estA foi capaz de produzir 14,6 g/L de RML com uma produtividade de 76,0 mg_{*RML*}/L.h , enquanto a cepa selvagem produziu 3,7 g/L com uma produtividade de 19,3 mg_{*RML*}/L.h **neste mesmo dia** (8° dia) (Figura 5.2 F e G, ponto tempo=8).

Nesssa condição, a super-expressão de *estA* não apenas gerou um aumento da produção em 290 % mas também gerou a redução de 65 % do tempo total de fermentação ou consumo de substrato. A consequência disso é um aumento da produtividade (Qp) de 19,3 mg/L.h para 76,0 mg/L.h para este tempo (8° dia). A concentração máxima de RML para a linhagem selvagem, nesta razão C/N, foi atingida apenas no 16° dia, quando foram obtidos 5,5 g/L de RML e uma produtividade de 14,3 mg/L.h. A modificação no perfil de crescimento celular, consumo de substrato e de produção de RML descritas nesse trabalho, acrescentam novas informações à dicussão do possível papel da EstA no metabolismo celular, que continua em aberto e precisa ser elucidado [2, 125].

A partir destes dados é possível postular uma possível participação da enzima na captação de fontes nutricionais, especialmente no metabolismo do nitrogênio, que é o que difere a condição C/N = 17,5 (Figura 5.2 A e B) das demais condições. É importante ressaltar que o RML é descrito como um metabólito secundário que, apesar de ser produzido a partir do primeiro dia de cultivo, tem suas taxas acentuadas quando esgota-se a fonte de nitrogênio [20, 109, 122, 124]. Além disso, o gene *estA* está sobre controle do fator σ 54, que é ativado em condições de estresse de nitrogênio [21, 99].

Na construção da cepa P. aeruginosa-estA o gene estA foi inserido sobre o promotor lac [2, 6], tendo sua expressão dissociada do fator $\sigma 54$ (RpoN) e consequentemente, das condições de estresse de nitrogênio. Com isso, a expressão da proteína EstA ocorreu antes do cultivo entrar em condição de estresse de nitrogênio. O observado foi que essa atecipação da presença de atividade esterásica condicionou uma antecipação também da produção de RML, como pode ser observado nos gráficos de cinética (Figura 5.2 C, D, E, F G e H). Desta forma, EstA poderia fazer parte de uma possível cascata de sinalização celular, envolvendo o metabolismo de nitrogênio, e que acarretou no aumento da produção de RML. Este resultado colabora com a discussão do papel de EstA, ainda sem elucidação.

Visto que o fator $\sigma 54$ é antagonista dos fatores σ RpoS[126], este poderia então ser alvo de engenharia genética para a construção de novos clones super-produtores de RML.

Razão C/N=83,2 se destacou no contexto de uma possível produção industrial

Vislumbrando uma possível aplicação industrial da cepa construída neste trabalho, os parâmetros cinéticos foram avaliados e a razão C/N mais interessante para esta aplicação foi analisada. É importante lembrar que dentre os parâmetros de maior interesse na indústria de RML, o alto título (concentração) final de RML e alta conversão de substrato em produto ($Y_{RML/s}$) se destacam [5, 10].

Neste trabalho, as condições que permitiram o título máximo de RML foram as razões C/N de 83,2 e 116,0 (Tabela 5.1). Para *P. aeuginosa*-estA, ambas condições possibilitaram um título final de 14,6 g/L de RML. Porém, estas concentrações foram obtidas em tempos diferentes. Enquanto que na razão C/N=83,2 esta concentração foi obtida em 8 dias, na razão C/N = 116,0, a concentração foi obtida no dobro do tempo, resultando em uma diferença de 1,5. $Y_{RML/s}$ e de 2.Qp.

Dessa forma, a condição C/N=83,2 foi escolhida para dar continuidade ao trabalho.

Comparação com outras cepas modificadas

Visto que a maior parte dos autores reportam construções genéticas que utilizam métodos colorimétricos para quantificação do RML [99], há uma discrepância na comparação com dados obtidos por CLAE. Para contornar este problema e permitir uma padronização, o SLC de maior produtividade (83,2) também foi mensurado pelo método orcinol. Ambos os resultados são mostrados na Tabela 5.2, que compara os resultados obtidos com os resultados de maior destaque na literatura (para outras cepas geneticamente modificadas).

Comparando-se *P. aeruginosa*-estA com os outros micro-organismos geneticamente modificados, observa-se que a produtividade de *P. aeruginosa*-estA foi a maior, mesmo na análise por CLAE. Esta, conforme apresentado nas seções anteriores, atingiu um máximo de 76,0 mg_{RML}/L.h RLM quando a raminose foi avaliada por CLAE e 114,6mg_{RML}/L.h quando o ensaio tradicional de orcinol foi realizado (Tablela 5.2).

Micro-organismo	Modificação	MP	Qp	Substrato e	$\mathbf{V}_f/\mathbf{V}_m$	Método de	Referência
	$gen \acute{e}tica$	(g/L)	(g/L.h)	concentração		quantificação	
P. aeuginosa-estA	Super-expressão de <i>estA</i>	14,6	76,0	Glicerina (42,0 g/L)	1L/300 mL	CLAE	Este trabalho
P. aeuginosa-estA	Super-expressão de <i>estA</i>	22,0	114,6	Glicerina (42,0 g/L)	1L/300 mL	Orcinol	Este trabalho
P. aeuginosa JC	Co-expressão de <i>vhb</i>	8,373	346	Glicose (10 g/L) + E. de levedura (5 g/L)	$150/50 \mathrm{~mL}$	Fenol Sulfúrico	[74]
P. aeuginosa JC	Co-expressão de <i>vhb</i>	13,3	185	Rejeito de indústria de queijo (500 g/L)	$250/50~\mathrm{mL}$	Fenol Sulfúrico	[71]
P. putida KCTC 1067 (pNE2)	Expressão de <i>rhl</i> A e <i>rhl</i> B em um único óperon, "clusterizado" com <i>rhl</i> R e <i>rhl</i> l	7,3	101,39	óleo de soja (20,0 g/L)	Não informado	Orcinol	[02]
P. aeruginosa PAO1	Não há modificação	39,0	433	Óleo de girassol (250 g/L)	42/19L	CLAE	[20]

Entre os micro-organismos geneticamente modificados de maior produção da literatura, se destaca o trabalho de KAHRAMAN e ERENLER, (2012) [74]. Estes, construíram o micro-organismo *P. aeruginosa* JC, que é capaz de expressar de forma heteróloga o gene *vhb*, que codifica a hemoglobina da bactéria *Vitreoscilla*. A proposta dos autores era que a presença da hemoglobina poderia aumentar a solubilidade de O_2 no meio de cultivo, contornando parcialmente as dificuldades geradas pela oxigenação por agitação do meio, que pode gerar volumes de espuma incompatíveis com as condições de trabalho [74].

O cultivo de *P. aeruginosa* JC alcançou, uma produção máxima de 8,373 g/L e produtividade de 349 mg/L (medida pelo ensaio fenol-sulfúrico) em um meio contendo glicose e extrato de levedura como fonte de carbono (Tabela 5.2). O bioprocesso apresentado pelo grupo alcançou alta produtividade (346,0 g_{*RML*}/L.h), no entanto a concentração de RML na amostra ainda é baixa quando comparada a diversos processos encontrados na literatura utilizando cepas selvagens. Além disso, a produção foi realizada em pequeno volume (50 mL) e usando um meio relativamente caro (em comparação com rejeitos e co-produtos industriais).

Novos resultados foram reportados no trabalho de COLAK *et al.*, (2013)[71]. Até onde as buscas desta tese caminhara, esse foi o único grupo que deu continuidade aos estudos (ou publicações) utilizando uma cepa modificada [2].

O trabalho de COLAK *et al.*, (2013) utilizou o mesmo micro-organismo em meio de cultivo onde a única fonte de carbono foi um rejeito industrial, um produto rico em proteínas advindo da indústria de queijo. A maior concentração de RML reportada foi de 13,3 g/L [71], destacando-se frente aos outros micro-organismos geneticamente modificados para esse fim (Tabela 5.2).

De forma a comparar os processos, buscou-se os valores de venda do soro de leite em pó desmineralizado, no Brasil e foram encontrados produtores vendendo por R\$87,50 (BRL, reais) a saca de 25 kilogramas [127]. A glicerina comprada para os ensaios nesta tese foi de R\$136,67 (custo em 2017), o galão de 5 L. Desta forma, sem contar com valores de frete, poderia estimar-se que o custo de substrato para a produção de 1 mg de RML seria de R\$ 132 e 52 para o processo apresentado por COLAK *et al.*, (2013) e por este trabalho, respectivamente. É importante ressaltar que o cálculo foi feito apenas para o quesito substrato, sem inclusão de frete, que é apenas um dos custos que devem ser considerado apara um bioprocesso. A cepa P.a*eruginosa* JC se destaca ainda pela alta produção em um substrato onde a fonte de carbono é majoritariamente proteica.

Durante o decorrer desta tese o Professor Hikmet Geckil, do Departmento de Biologia Molecular e Genética da Inonu University, Turquia, foi contactado e enviou uma amostra da cepa. Estudos estão sendo realizados em paralelo a esta tese, a fim de se obter uma cepa hibrída: com a co-expressão de *vhb* e a super-expressão de *estA*.

Também entre os micro-organismos de maior produção relatada pela literatura, GIANI *et al.*, (1994) reivindicaram uma patente com produção máxima de 112 g/L, que é a maior produção já relatada [67]. Como a publicação falha na descrição da metodologia, nenhum outro trabalho foi publicado desde então e nenhum pesquisador ou indústria parece ter herdado o micro-organismo ou reproduzido a construção genética com sucesso. Dessa forma o modelo descrito por MÜLLER *et al.*, (2010) [20] é reconhecido como o melhor para produção de altas concentrações de RML [90, 106, 128].

MULLER *et al.*, (2010) declaram produção máxima de 39 g/L e produtividade de 433 mg/L.h utilizando *P. aeruginosa* PAO1. A produção foi obtida em um sistema já avançado de otimização em biorreator com controle de temperatura, pH, pO₂ e espuma [20]. A produção foi realizada a partir de óleo vegetal em uma concentração de 250 g/L. Visto que este resultado foi obtido com a cepa que deu origem à *P. aeruginosa*-estA, é possível postular que a aplicação desta no sistema de MÜLLER *et al.*, (2010) deve gerar títulos maiores que a reportada pelos autores (39 g/L).

Durante o decorrer desta tese, o Professor Rudolf Hausmann da universidade Hohenheim Universität foi e estamos trabalhando com a possibilidade de um projeto colaborativo.

5.3 Indicação da presença de RML

Conforme discutido anteriormente, somente a quantificação de raminose não é o suficiente para confirmação que o sobrenadante produzido contém efetivamente RML. Dessa forma, são necessárias técnicas acessórias para confirmar a presença de RML nas amostras.

A cromatografia em camada delgada corrobora para a conclusão da produção de RML, pois fraciona açúcares livres de glicolipídeo. Dessa forma, foi aplicada em uma placa de sílica amostras da do SLC da cepa selvagem, *P. aeruginosa* PAO1 e da cepa alvo de investigação, *P. aeruginosa*-estA. O resultado é apresentado na Figura 5.3.

Não foi possível observar nenhuma banda na altura do controle contendo raminose livre, garantindo que toda a raminose quantificada anteriormente está vinculada à um grupamento hidrofóbico.

Além disso, com os resultados foi possível observar que não há alteração na proporção Mono:Di-RML da cepa selvagem para a cepa modificada. Dessa forma foi mantido o uso do mesmo fator de conversão raminose-RML utilizado pela literatura para a cepa selvagem [27].

Em hora, é importante relatar que não foi observado nenhuma raminose livre no substrato não tratado (não-hidrolisado) por CLAE.

Com o objetivo de complementar a quantificação anterior, foi realizado um teste de emulsificação. O ensaio é simples, rápido e de baixo custo. Pode ser constada a capacidade do SLC de emulsificar um sistema água-óleo. Neste caso, foi testado um sistema água(SLC)-n-hexadecano.



Figura 5.3: Figura mostra cromatografia de camada fina realizada para analisar a relação Mono:Di-RML. Da esquerda para a direita: *P. aeruginosa* PAO1, razão C/N = 17,5; *P. aeruginosa* PAO1, razão C/N = 83,2; *P. aeruginosa*-estA, razão C/N = 17,5; *P. aeruginosa*-estA, razão C/N = 83,2; e uma solução padrão de 5 g/mL de ramnose. Foram aplicados 2μ L das amostras.



Figura 5.4: Teste de emulsificação: SLC foi diluído 100 vezes e vigorosamente agitado em vortex com partes iguais de n-hexadecano e deixado em repouso durante 24 horas. Da esquerda para a direita: *P. aeruginosa* PAO1, com razão C/N de 17,5 e 83,2, em seguida, *P. aeruginosa*-estA em razão C/N de 17,5 e 83,2 (mol/mol), respectivamente

Todos os SLC testados foram capazes de emulsificar totalmente o n-hexadecano e manter a emulsificação estável por mais de um mês.

Quando os sobrenadantes das razões C/N = 17,5 e 83,2 foram diluídos 100 vezes (Figura 5.4), um pequeno volume de óleo não emulsificado foi observado no topo do frasco para o tipo selvagem, mas não para a cepa modificada, o que corrobora com a maior concentração de RML encontrados para essa cepa via CLAE

Finalmente, foi mensurada a Tensão Superficial (TS) dos sobrenadantes finais dos cultivos. Conforme discutido anteriormente, RML se destaca especialmente pela sua capacidade de diminuir tensão interfacial e superficial mesmo em pequenas quantidades [12]. A atividade tensoativa do SLC foi confirmada pelo método da gota pendente [104].

Em meio de cultivo com razão C/N = 83,2, *P. aeruginosa*-estA produziu uma mistura que reduziu a tensão superficial da água de 75 mN/m para 29,33 mN/m e apresentou uma CMC (concentração micelar crítica) de 140 mg/L, e um DMC (diluição micelar crítica) de 56,02 vezes. Esses valores são compatíveis com os achados para RMLs na literatura, conforme revisado por LOURITH e KANLAYAVATTA-NAKUL, (2009) [12].

MENDES *et al.*, (2015) produziram RML sob condições semelhantes, mas utilizando a cepa *P. aeruginosa* PA1, e encontraram uma CMC de 198 mg/L no sétimo dia de fermentação. No entanto, o consumo de glicerina não foi acompanhado pelos autores. Dessa forma é possível que ainda houvesse glicerina na amostra, o que influencia diretamente na TS e CMC [129]. Os autores mostraram que, após uma etapa de extração por solventes, a CMC dos RMLs produzido foi de 25 mg/L, destacando mais uma vez seu uso promissor como biossurfactante [31].

Desta forma, apesar da falta de métodos robustos para quantificação de RML, conclui-se que foi possível confirmar a presença de RML nas amostras a partir da combinação de diferentes técnicas. Além disso, a partir da observação de que não houve grandes mudanças na razão Mono-Di-RML e nem na raminose ou açúcares livres, a estimativa da concentração de RML é confiável.

5.4 Comparação de cultivos em diferentes inóculos

Nos tópicos anteriores desta tese, foi investigado a capacidade de *P. aeruginosa*-estA de metabolizar diversas fontes de carbono, incluindo a glicerina (Figura 5.1), assim como a cinética de produção de RML em diferentes concentrações desta (diferentes razões C/N) (Figura 5.2 A-H).

Apesar do ensaio representado na Figura 5.2 F ter sido realizado de forma similar ao representado na figura 5.1-Glicerina, o objetivo são difentes e por isso foram realizados em volumes e inóculos distintos. Enquanto o primeiro objetivava a análise de quais fontes de carbono o micro-organismo era capaz de assimilar, o segundo tinha como objetivo a descrição da cinética de produção, segundo a padronização da literatura que utiliza um maior volume de cultivo e inóculo [73, 109, 122]. A Tabela 5.3 compara as duas condições e a concentração de RML encontrada no terceiro dia de cultivo.

Tabela 5.3: Comparação das produções realizadas em meio MSP, razão C/N 83,2 glicerina P.A. como fonte de carbono e NaNO₃ como fonte de nitrogênio. Valores referentes à 72 horas (3 dias) de produção e quantificação utilizando CLAE. Vf/Vm = Razão volume do frasco e volume do meio de cultivo.

Ensaio	Experimento	Inóculo	Produção	Vf/Vm
		(g/L)	(g/L)	(mL/mL)
1	Análise da produção em diferentes	0,42	5,2	250/100
	fontes de carbono			
2	Análise da produção em diferentes	0,85	6,9	1000/300
	razão C/N			

A redução da razão Vf/Vm proporciona uma maior oxigenação do meio de cultivo, o que em geral está relacionada ao aumento da produção de RML [71, 74]. Dessa forma, postulou-se que o aumento da concentração de inóculo que influenciou na geração de uma maior concentração de RML no ensaio 2 (Tabela 5.3).

Com o intuito de investigar esta hipótese, a cinética de produção para três diferentes concentrações de inóculo: 0,53, 0,85 e 1,28 g/L de massa seca foi determinada (Figura 5.5).



Figura 5.5: Produção de RMLs sob diferentes inóculos: 0,53, 0,85 e 1,28 g/L de massa seca.Ensaio foi realizado em meio de cultivo MSP razão C/N=83,2 contendo glicerina P.A. como fonte de carbono.

Assim como observado para SANTA ANNA *et al.* (2001) [109], maiores concentrações de RML foram obtidas conforme maior a quantidade de células usadas para inocular os meios de produção (Figura 5.5). O maior título (18,10 g/L) foi observado no sétimo dia para inóculo de 1,28 g/L de massa seca, o que representa 124% e 195% da produção máxima para a condição de inóculo de 0,85 e 0,53 g/L de massa seca, respectivamente. Além do produto final gerado estar 124% mais concentrado, a produtividade aqui encontrada foi 42% maior.

A baixa produção observada para a condição de menor inóculo (0,53 g/L) parece ser justificada pelo desvio da energia proveniente da metabolização do substrato, para a rota de produção celular ($Y_{x/s}$). Nesta condição, o $Y_{x/s}$ calculado foi de 0,280 g/g, enquanto que para as outras condições de inóculos foram 0,058 e 0,043 g/g (inóculos de 0,53 e 1,28 g/L respectivamente) (Tabela 5.4). Desta forma, inferese que este desvio da energia para a via de síntese celular reduziu a disponibilidade de energia para a produção de RML.

	Inóculo (g/L)	$\begin{array}{c} \operatorname{Produção} \\ \operatorname{máxima} \\ (\mathrm{g}_{RML}/\mathrm{L}) \end{array}$	Tempo (dias)	$\begin{array}{c} {\rm Qp} \\ ({\rm mg}_{RML}/{\rm h.L}) \end{array}$	$Y_{RML/}$ (g/g)	${}_{x} \operatorname{Y}_{RML/} $ (g/g)	$s \operatorname{Y}_{x/s}$ (g/g)
Glicerina	$0,\!53$	9,3	12	32,3	4,75	0,265	0,280
P.A.	$0,\!85$	$14,\! 6$	8	76,0	$6,\!55$	$0,\!377$	$0,\!058$
	$1,\!28$	18,1	7	107,7	$9,\!98$	$0,\!431$	$0,\!043$
Glicerina	$0,\!53$	$5,\!5$	12	19,1	2,81	$0,\!153$	0,320
bruta	$0,\!85$	15,9	10	66,0	$11,\!33$	$0,\!403$	0,036
	$1,\!28$	$17,\!6$	10	$73,\!5$	$14,\!67$	$0,\!444$	$0,\!030$

Tabela 5.4: Parâmetros cinéticos de cultivos carreados em razão C/N = 83.2, diferentes concentrações de ínóculo e fontes de glicerina.

5.5 Produção de raminolipídeos a partir de fonte alternativa de glicerina

A produção de biocombustíveis de primeira geração por meio da transesterificação alterou o destino do glicerina no mercado internacional. A substância, que até então era de difícil obtenção, passou a ser considerada um problema desde que a indústria de glicerina começou a produzir este co-produto em taxas maiores que o mercado é capaz de absorver [118–121]. Dessa forma, novas aplicações para a glicerina bruta são estudadas [120, 121, 130–137] com o objetivo de manter o biodiesel como produto ambientalmente amigável [118].

Com o objetivo de reduzir o custo de produção do RML e também contribuir com manutenção do biodisel como uma estratégia sustentável, foi estudado a capacidade de produção de RML por *P. aeruginosa*-estA nesta fonte alternativa de carbono. Para isso, foi utilizada glicerina bruta proveniente da indústria de biodiesel de soja. Foram testadas três condições de inóculo, as mesmas anteriormente estudadas para glicerina P.A.. Os resultados são apresentados na Tabela 5.4 e Figura 5.6.



Figura 5.6: Produção de RMLs sob diferentes inóculos: 0,53, 0,85 e 1,28 g/L de massa seca. Ensaio foi realizado em meio de cultivo MSP razão C/N=83,2 contendo glicerina bruta como fonte de carbono.

A cinética de produção foi semelhante para as condições com maior inóculo (0,85 e 1,28 g/L). A maior produção para essas condições foi alcançada no décimo dia e foi estatisticamente igual (teste de Tukey, 95%). Além disso, esses resultados são estatisticamente iguais aos encontrados para glicerina P.A., inóculo de 1,28 g/L.

MULLER e HAUSMANN (2011) calcularam o $Y_{RML/s}$ teórico, baseado no balanceamento de ATP das vias metabólicas de *P. aeruginosa* PAO1, e encontraram um valor de 0,41 g/g. No presente trabalho, foram obtidos valores de 0,431 e 0,44 para glicerina bruta e glicerina P.A. respectivamente, na concentração de inóculo de 1,28 g/L (Tabela 5.4). O valor acima do máximo teórico deve estar relacionado à falta de métodos robustos de quantificação de RML, que superestima a concentração destes compostos, conforme anteriormente discutido.

Os valores encontrados para $Y_{RML/s}$ são mais de quatro vezes maiores que osobtidos por SYLDATK *et al.* (1985), que reportaram um valor de 0,10 g/g usando glicerina pura e a linhagem DSM2874 [89]. A cepas de *P. aeruginosa* PAO1 e DSM2872 são as duas cepas de maior produção na literatura [90].

Para a produção de RML, quase sempre é utilizado o método de fermentação submersa e aeróbia. Porém, a fonte de carbono utilizada nesses processos, varia entre óleos vegetais [20, 90, 128], glicose [19, 138], glicerina [2, 99, 109, 139] e rejeitos ou co-produtos indústriais [71, 139, 140]. Estes dois últimos se destacam pelo seu baixo custo no mercado. Neste contexto, a Tabela 5.5 relaciona os principais rejeitos e co-produtos industriais utilizados para a produção de RML, método de produção e produção máxima obtida.

Tabela 5.5:	Rejeitos e	co-produtos	indústriais	como	substrato	para	produção	de
raminolipíde	os (Adapta	do de LIU et	t al., (2018)	e LI,	(2017)).			

Substrato	Método de produção	Produção máxima	Referência
		(g/L)	
Rejeito indústria de óleo de girassol	Biorreator	15,9	[100]
Rejeito indústria de algodão	Biorreator	15,9	[100]
Rejeito indústria de óleo de milho	Frascos	13,5	[94]
Soro de leite	Frascos	13,3	[71]
Farinha de peixe	Frascos	12,3	[141]
Rejeito indústria de óleo de soja	Frascos	11,7	[94]
Rejeito indústria de óleo de algodão	Frascos	10,5	[94]
Palha de trigo tratada	Frascos	9,38	[142]
Óleo de fritura usado	NI	9,3	[143]
Rejeito industria de biodiesel (glicerina loira)	Biorreator	8,0	[144]
Rejeito indústria de óleo de babassu	Frascos	8,6	[94]
Rejeito indústria de óleo de palma	Frascos	8,6	[94]
Gordura de frango	Frascos	6,8	[94]
Rejeito de indústria de azeite	Fermentador 2L	2,1	[145]
Óleo de semente de manga	Frascos	1,8	[146]
Melaço	Frascos	1,5	[147]
Glicerina bruta	Frascos	1,3	[139]

A partir da relação de produção utilizando fontes alternativas de carbono, é possível observar que as menores produções foram alcançadas por aqueles processos que optaram por substratos glicídicos (Tabela 5.5). Porém, a baixa concentração pode estar relacionada à etapa de purificação anterior à quantificação de RML, que é obrigatória para estes processos (e não para aqueles onde o meio de cultivo é predominantemente composto de lipídeos), visto que os açúcares livres do substrato poderiam alterar o resultado de quantificação. Dessa forma, a baixa quantidade de RML poderia estar relacionada à perda de RML durante o processo de purificação.

Já as maiores produções foram encontradas naqueles substratos ricos em gor-

duras (Tabela 5.5). O processo apresentado nesta tese se destaca não apenas pelo maior título final, mas também pela exaustão do substrato até a concepção do produto final, que interfere na tensão interfacial [129]. No caso especial do óleo, a interferência de remanescentes do substrato no produto final é ainda mais complexa visto que parte do RML está complexado ao óleo formando micelas. Dessa forma, nestes processos é necessária uma etapa extra de *downstream* que envolve a remoção destes óleos.

No contexto do uso de glicerina bruta como fonte de carbono, DE SOUSA *et al.* (2011) atingiram um máximo de 3,5 g/L de produção em 96 horas [139]. O valor é cinco vezes menor que o aqui obtido. Além disso, é importante notar que a quantificação do RML foi feita por um método colorimétrico (método orcinol), que é conhecido pela superestimação da quantidade de raminose presente na amostra ([20, 86]). Os autores acreditam que a baixa produção pode estar associada ao efeito inibitório de altas concentrações salinas, derivadas do processo de transesterificação e pré-tratamento do biodiesel [139]. Nno entanto, os resultados aqui obtidos mostram que é possível alcançar a mesma taxa de produção usando fonte alternativa de glicerina.

PEREIRA *et al.*, (2013) obteve produtividades (Qp) entre 22,9 e 52,6 g/L.h após um planejamento experimental utilizando a cepa *P. aeruginosa* PA1, isolada de poço de petróleo. Os maiores valores de produtividade (52,6 g/L.h) e produção (8,83 g/L) foram alcançados após otimização de processos por planejamento experimental [144]. Desta forma, os resultados encontrados nesta tese, sobrepõem o encontrado por PE-REIRA *et al.*, (2013), mesmo ainda não tendo passado por processo de otimização. O autor utilizou o método de orcinol para quantificação da raminose.

Desta forma, conclui-se que a cepa em estudo é capaz de metabolizar amostras de glicerina oriunda de indústria de biodisel de forma equivalente à glicerina purificada. Além disso, os resultados obtidos se destacam frente aos reportados anteriomente na literatura para glicerina loira e outro rejeitos indstriais.

5.6 Análise das propriedades fisico-químicas do SLC

O SLC obtido a partir da produção em glicerina bruta e maior inóculo celular (1,28 g/L) foi utilizado em vários testes qualitativos como deslocamento de óleo, índice de emulsificação e tensão interfacial com duas variações de óleo cru e hexano.

Índice de emulsificação e estabilidade de emulsão

No ensaio de emulsificação, foi observada a emulsificação total da fase referente ao óleo e parcial da fase referente a água (gerando um IE₂₄=65,5 %) para os óleos de milho, n-hexadecano, mineral e canola. E uma emulsificação parcial das duas fases foi observada para os óleos de girassol, soja e tributirina. Esses resultados coincidem com os encontrados pela literatura. DE SOUSA *et al.* (2011) encontraram valores de IE₂₄ de 59,36 a 68,8 %, dependendo da fonte de carbono usada na produção de RML. Outros valores foram reportados grupo, de 10,0 a 70,0 %, usando amostras de sobrenadante de potenciais produtores de biossurfactantes e éter de petróleo [111]. Os autores reportaram que os valores de IE₂₄ encontrados, diminuiram conforme avanço da idade do cultivo (24 e 120 horas) e para todos os micro-organismos. As amostras encontrdas nesta tese, permaneceram estáveis por quatro meses.

Ainda para o SLC utilizado nesta tese, o pH se mostrou importante. Quando este foi ajustado com NaOH 10 M ou H_2SO_4 10 M, as emulsões com n-hexadecano ficaram estáveis por pelo menos 4 meses para pH de 5 a 11. Os sistemas feitos com soluções ajustadas para pH=4, porém, não foram capazes de emulsificar toda a fase do óleo e não foram estáveis ao tempo (Figura 5.7). Isto aconteceu provavelmente porque alguns dos surfactantes não são solúveis a este pH.

Estes resultados sugerem que o SLC pode ser utilizado como emulsificante em processos de diferentes valores de pHs, incluindo neutros, básicos e ácidos.



Figura 5.7: Emulsões, após 24 e 48 horas, de n-hexadecano com SLC ajustado a diferentes pHs mostram que emulsão é estável em pHs de 5 a 11. Em pH 4, parte do óleo não é emulsificado.

Dispersão de óleo

A fim de analisar a atividade de dispersão de óleo pelo SLC, foi realizado o ensaio descrito por MORIKAWA *et al.*, (2000), que tem o propósito de simular o uso de RML em águas impactadas com petróleo [107].

Nos ensaios realizados com o SLC produzido nesta tese, foi observado uma rápida formação de halo, com raio igual ao da placa de Petri (14 cm), com o petróleo ascendendo pelas paredes da placa. Além disso, os halos formados foram estáveis apenas na escala de tempo de segundos. Esse resultado mostra a alta capacidade de deslocamento de petróleo pelo o RML oriundo de *P. aeruginosa*-estA.

O SDS é o representante mais comum dos surfactantes sintéticos, amplamente utilizado em formulações comerciais de detergentes e tem sido sugerido como promissor agente em remediação ambiental [148, 149].O surfactante comercial dodecil sulfato de sódio (SDS) não foi capaz de formar halo (Figura 5.8).

Conclui-se então que o SLC produzido tem poder de dispersão de petróleo acima do limite de detecção do método se destacando frente ao surfactante de síntese não-



Figura 5.8: Teste de deslocamento de óleo pelos surfactantes aniônicos I) dodecil sulfato de sódio (SDS) e II) RML (ambos em concentrações de 1g/L). Em III), halo formado pela mistura de RMLs produzidos em condições de: glicerina bruta com A) 1,28 g/L e B 0,85 g/L de inóculo; e: glicerina PA com C) 1,28 g/L e D) 0,85 g/L de inóculo. Todos os sobrenadantes foram produzidos em razão C/N=83,2. ANOVA e Teste de Tukey (p<0,05) apontaram significância entre a condição C e as condições A, B e D: "a"e "b"representam condições estatisticamente similares.

biológica SDS. Porém, com estes dados não é possível a comparação com a literatura.

Para facilitar o comparo, os sobrenadantes foram diluídos até 1,0 g/L. Os resultados são apresentados na Figura 5.8 todos os SLC diluídos à 1,0 g/L foram capazes de formar halos estáveis por mais de um minuto (Figura 5.8). Os valores encontrados variaram entre 9,3 e 12,8 cm.

SRIRAM *et al.* (2011) obtiveram valores de 2,0-3,0 cm ao utilizar um biossurfactante do tipo lipopeptídeo [108]. Dessa forma, os SLC produzidos nesta tese manteve sua alta capacidade de dispersão de óleo mesmo após diluição de mais de 15 vezes.

Uma ANOVA one-way (p<0,05) apontou que os valores têm significância estatística e como condição diferente das demais, o sobrenadante produzido a partir de glicerina P.A. e inóculo de 1,28 g/L de massa seca.

Dessa forma, pode-se afirmar que todos os SLC produzidos por *P. aeruginosa*estA são capazes de produzir grande dispersão quando comparado com os relatados na literatura e que o conjunto de moléculas produzidos na condição C (glicerina P.A. e inóculo de 1,28 g/L de massa seca) (Figura 5.8) é mais indicado para essa finalidade.

Análise do SLC como tensoativo

O RML foi capaz de diminuir a TS de um sistema de água ar de 72,0 mN/m para 29,3 mN/m. Enquanto a TI em um sistema água-petróleo de °API alto (American Petroleum Institute) diminuiu de 36,4 para 2,6 mN/m, um sistema água-petróleo de °API médio diminuiu de 42,3 para 5,4 mN/m. Os valores são apresentados na Tabela 5.6, juntamente com os resultados encontrados em simulações de derramamento de petróleo, a ser explorado na próxima seção. Os resultados encontrados comprovam mais uma vez, o potencial do RML como tensoativo, mesmo em condições de baixa purificação.

Interface	Ar	Petróleo °API alto	Petróleo °API médio	Hexano
Água	72,0	36,4	42,3	12,1
SLC em água	29,3	2,6	5,4	1,1
SLC em AMS*	-	0,40-0,70	0,47-1,01	0,88-7,93

Tabela 5.6: Tensão interfacial (mN/m) entre água ou SLC com petróleo ou hexano. O SLC utilizado foi diluído para uma concentração de 0,5 g/L de RML em água ou água do mar sintética (AMS). O SLC utilizado foi obtido apartir de glicerina bruta e um inóculo de 1,28 g/L. *Para SLC em AMS é dado intervalo de valores encontrados (dependendo da condição de temperatura, salinidade e pressão). As outras análises foram feitas em condições ambiente de pressão e temperatura (salinidade não se aplica).

5.7 Simulação do uso de SLC em águas impactadas com petróleo

O RML tem um enorme potencial para aplicação em biorremediação de óleo [60, 76, 140]. No entanto, pouco se sabe sobre as propriedades físico-química dessas moléculas com amostras reais de petróleo. Os poucos trabalhos que relataram estudos neste contexto, realizaram apenas testes não quantitativos, ou realizaram os ensaios usando RML purificado. Porém é importante lembrar que o processo de *downstream*, que pode custar entre 65 e 95 % dos custos de produção de uma molécula [150], não se faz necessário no caso da biorremediação que ocorre em ambiente aberto.

Dessa forma, foi medida a tensão interfacial de amostras reais de petróleo, com amostras não purificadas de RML (SLC). Este foi diluído em água do mar sintética (AMS) até concentração de 0,500 g/L. Foram utilizados dois petróleos, com médio e alto °API).

Para simular condições de derramamento de petróleo em mar, essa propriedade foi analisada à luz de um delineamento experimental, em condições de salinidades (34-37 g/L), pressão $(1-2,2 \ge 10^7 \text{ Pa})$ e temperaturas $(4-24^{\circ}\text{C})$ encontradas nas águas dos mares brasileiros.

Simulação com petróleo de médio °API

Quando RML, salinidade, temperatura e pressão foram aplicadas, foram observados valores menores de tensão interfacial entre água-petróleo, em comparação com aqueles encontrados para petróleo-água (sem surfactante) (Tabela 5.6).

Analisando o sistema AMS-petróleo (médio °API), nenhuma diferença estatística (p<0,05) foi observada (resultados brutos e ANOVA: Anexo A.1 e A.3). Estes resultados sugerem que a mistura de RML produzido a partir de glicerina bruta pode ser utilizada eficientemente em caso de derrame de petróleo de °API médio, independente da condição de temperatura, salinidade e pressão da água marinha brasileira.

Simulação com petróleo de alto °API

Da mesma forma que o observado para o petróleo de °API médio, quando as condições de salinidade, temperatura e pressão foram aplicadas, foram observados valores menores de tensão interfacial entre AMS e petróleo, em comparação com aqueles encontrados para petróleo-água (sem surfactante) (Tabela 5.6).

Por outro lado, para o sistema AMS-petróleo (alto °API) foram observadas diferenças nos valores de TI para os parâmetros temperatura, salinidade e pressão (resultados brutos e ANOVA: Anexo A.1 e A.4). Essas diferenças (p>0,05) foram observadas apenas para o efeito linear. Não foi observado diferença nos efeitos quadráticos ou para interação entre parâmetros.

Após desconsiderar os parâmetros não estatisticamente relevantes, um modelo foi construído (Equação 5.1) e as superfícies de resposta foram construídas (Figura 5.9).

$$TI = 0.55 - 0.03[P] - 0.02[S] + 0.07[Ta]$$
(5.1)

Onde TI é tensão interfacial, [P] é o valor de pressão, [S] é a salinidade da água do mar sintética e [T] é o valor da temperatura em valores codificados.

A partir dos dados obtidos pode-se afirmar que o RML, mesmo não purificado presente no SLC, pode ser indicado para o uso em vazamento de petróleos leves (°API alto) e médios (°API médio) independente da condição de temperatura, salinidade e pressão (profundidade) da água marinha brasileira. Para o caso de derramamento de petróleo rico em parafinas (°API alto), o desempenho do SLC é ainda realçado em ambientes com maior temperatura, menor salinidade e em locais mais profundos.

Simulação com hexano

Visto que petróleos são misturas complexas e que variam quanto sua composição, dependendo do local onde origem [64], foi investigada a interação do SLC com o hexano, um hidrocarboneto abundante em petróleos de baixo °API. Para os ensaios, foi aplicada a mesma faixa de salinidade, temperatura e pressão utilizada para os estudos envolvendo óleo cru. Além disso, foi adicionada uma quarta variável, a concentração de RML, a fim de estimar a concentração mínima de RML sem perda do efeito na TI. Para isso, o SLC foi diluído até atingir concentrações entre 0,50 e 0,05 g/L de RML.

Neste planejamento experimental, a TI observada variou de 0,88 a 7,93 mN/m (Tabela 5.6 e Anexo A.2). Esta variação foi diretamente relacionada à concentração de RML na amostra e, assim como observado para o petróleo de °API médio, nenhum efeito significativo (p<0,05) foi observado para salinidade, pressão e temperatura. As interações (linear ou quadrática) entre estas variáveis também não foi significativa



Figura 5.9: Superfícies de respostas para os efeitos lineares de: A) pressão e temperatura; B) salinidade e temperatura; e C) salinidade e pressão em um sistema de AMS:petróleo de alto °API. As análises e gráficos foram feitos usando o *software* STATISTICA trial 12.0.

para a TI (resultados brutos e ANOVA: Anexo A.2 e A.5).

Para a variável concentração, os efeitos linear e quadrático foram significativos. Este fenômeno pode estar relacionado ao início da saturação de moléculas de RML na interface, com consequente formação de micelas e agregados micelares. Para esta variável, foi então construído um modelo (Equação 5.2) que descrevesse a interação do sistema SLC+AMS-Hexano. Então, a partir do modelo, foi gerada uma superfície resposta (Figura 5.10) e calculada a concentração mínima de RML em AMS para manutenção dos baixos valores de TI. Dessa forma, foi obtido que, para uma melhor aproveitamento do SLC, a concentração pode ser ajustada para 0,305 \pm 0,006 g/L de RML.

$$TI = 1.348 - 0.81[RML] + 0.70([RML]^2)$$
(5.2)

Onde TI é Tensão Interfacial e [RML] é a concentração de RML em valores codificados.

Dessa foma, os 300 mL de produção com um título de 17,6 g/L de RMLs, pro-



Figura 5.10: Efeito da concentração de RML na TI em um sistema de AMS:hexano. Pressão foi fixada em $1,1 \times 10^7$ Pa e temperatura em 14 °C.

duzidos neste trabalho (Tabela 5.4), podemria ser diluído para 16 litros (9 vezes) de AMS, sem perda na capacidade de abaixamento de tensão.

Os surfactantes atualmente utilizados em acidentes ambientais envolvendo derramamento de óleo, são eficazes em uma ampla gama de tipos de óleo e são geralmente aplicados em águas rasas na proporção de 1:20 até 1:30 dispersante:óleo. Estes porém, são sempre de origem sintética [151].

O conhecimento sobre a ação dos biosurfactantes quando em coluna de água (e não na superfície) é escasso. Dessa forma, a descrição aqui apresentada traz novos dados à literatura e apresenta um produto de origem alternativa como potencial biorremediador em derramamento de petróleo.

5.8 Toxicidade

Muito tem sido discutido no que diz respeito à segurança do bioprocesso e do produto desenvolvido por esses quando realizados com o micro-organismo P. aeruginosa, um patógeno oportunista [19, 102]. Para contornar os potenciais danos que seriam causados por um acidente durante a produção industrial utilizando esse micro-organismo, alguns autores têm investido suas pesquisas em outras espécies como E. coli, B. kururiensis e B. thailandensis [2, 11, 70, 77]. Neste contexto, apesar de alguma controvérsia [124], Burkholderia parece alcançar os melhores resultados de produção de RML, com intervalos de 2,0 a 7,4 g/L [11, 73]. Porém, esses resultados ainda estão longe daqueles encontrados por P. aeruginosa, que pode atingir até 100 g/L de RML [20, 67]. Dessa forma, P.aeruginosa ainda é considerada para a maioria dos pesquisadores a melhor plataforma disponível para produção de RML [20, 90]. Isso pode ser visto no número de publicações de pesquisa e patentes, que ainda aumentam ao longo dos anos [2], e pela escolha das empresas que produzem esses compostos usando a espécie [14].

A fim de responder se a alteração da expressão gênica de *estA* poderia aumentar a virulência desse patógeno oportunista gerando uma super-bactéria, foi realizado um antibiograma da cepa *P. aeruginosa*-estA. Este foi comparado com o antibiograma da cepa selvagem que deu origem à esta, *P. aeruginosa* PAO1. *P. aeruginosa* PAO1 é também controle para o método, que define o intervalo estatisticamente confiável de halos que podem ser encontrados para esse micro-organismo [117].

Não foi obervado nenhuma diferença significativa entre os halos produzidos pela duas cepas e todos halos observados ficaram dentro dos intervalos definidos pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [117].

Dessa forma, os resultados sugerem que, em caso de infecção por *P. aeuginosa*estA, seja realizado o mesmo procedimento de tratamento utilizado para infecções com *P. aeruginosa* PAO1, cepa atualmente utilizada pelas industrias ativas de RML [4, 14].

A toxicidade de RMLs foi estudada por JOHANN *et al.* (2016) [152], e seus baixos valores são, inclusive, uma das principais razões de seu interesse econômico [10, 18]. No entanto, estas análises foram realizadas após a semi-purificação destas moléculas por solventes apolares [152], o que aumenta os custos de *downstream* e torna o processo ambientalmente não amigável. Visto que a etapa de *downstream* é responsável por entre 65 e 95 % do custo da produção de uma biomolécula [150], este é um dos principais alvos para diminuição do custo de produção. Dessa forma, a purificação do RML limita sua aplicação em produtos de alto valor agregado.

A aplicação de RML em ambientes complexos para a biorremediação local, não

Tabela 5.7: Toxicidade do SLC sob o organismo modelo *A. salina* e as linhagens de células animais A549 (células epiteliais de pulmão), LLC-MK2 (células epiteliais do rim) e RAW (células de macrófagos). CC_{50} refere-se à concentração do composto (RML) onde 50 % de células são mortas. DI ₅₀ refere-se à dose de RML onde ocorre a inibição de 50 % dos crustáceos. Todos os valores estão dentro do intervalo de 1000-100 g/L, que pode ser classificado como 'seguro' por MEYER *et al.* (1982).

Fonte de glicerina	Inóculo (g/L)		$CC_{50} (g/L)$		$DI_{50} (g/L)$
		A549	LLC-MK2	RAW	A. salina
P.A. (95%)	0,85	294,9	198,0	175,1	151,4
P.A. (95%)	1,28	344,9	313,4	177,4	112,3
Bruta	0,85	546,2	396,0	307,0	110,0
Bruta	1,28	$414,\!4$	404,0	$176,\!5$	117,2

impõe a necessidade de moléculas purificadas, como é exigido nas indústrias de alimentos e cosméticos, tornando o uso do SLC diretamente no meio ambiente uma possibilidade plausível. O uso de SLC como produto final, no entanto, deve ser usado com cautela, visto que as bactérias poderiam produzir compostos tóxicos à fauna e à flora.

Para analisar a possibilidade de utilização de todo o SLC em ambiente, a sua toxicidade sobre o organismo modelo *Artemia salina* e sobre três linhagens de células animais (A549, LLC-MK2 e RAW) foram investigadas. Todos os valores encontrados estão entre 1000-100 g/L, o que pode ser classificado como 'seguro' por MEYER *et al.* (1982) (Tabela 5.7).

Desta forma, conclui-se que o uso de RML obtido a partir de um patógeno oportunista não parece interferir nos níveis de toxicidade da amostra, mesmo sem purificação ou passando por única etapa de *downstream* (remoção das células). Estes valores estão também em conformidade com a resolução CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) Nº 463, DE 29 de julho de 2014, que dispõe sobre o controle ambiental de produtos destinados à remediação.

Nesta, o RML ou o SLC seria classificado como **remediador** (produto ou agente de processo físico, químico ou biológico destinado à recuperação de ambientes e ecossistemas contaminados e ao tratamento de efluentes e resíduos). O termo **bioremediador** é definido apenas para "remediador que apresenta como ingrediente ativo **microrganismos** capazes de se reproduzir e de degradar bioquimicamente compostos e substâncias contaminantes" [153]. Visto que não foram realizados ensaios utilizando *P. aeruginosa*-estA como remediador e sim com o SLC, o produto desenvolvido nesta tese se enquadraria dentro da classificação de **remediador**.

Já a resolução CONAMA nº 269 de 14 de setembro de 2000, dispõe sobre o uso de dispersantes químicos em incidentes de poluição por óleo no mar. O artigo primeiro, alínea VI define o termo **dispersantes químicos**, o qual ingloba o RML e o SLC: "formulações químicas constituídas de solvente e agentes surfactantes (tenso-ativos) usadas para diminuir a tensão interfacial óleo-água e para estabilizar a dispersão do óleo em gotículas na superfície e na coluna de água" [154].

Os procedimentos e exigências necessários para a obtenção do registro dos dispersantes químicos fica a cargo do IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) [154], a partir das Fichas Técnicas de Enquadramento (FTEs), assim como é determinado (artigo 5 da Resolução 463) que "a importação de remediadores só poderá ser realizada ... após anuência prévia do IBAMA.". Dessa forma ressalta-se a importância da obtenção de um produto nacional [153].

Atualmente, apenas três empresas têm registro ativo no IBAMA: ECOLAB QUÍMICA LTDA, OXITENO S/A INDÚSTRIA E COMÉRCIO e VERUS AMBI-ENTAL LTDA (ADVANCED BIOCATALYTICS CORPORATION (ABC)) [155]. Porém não foi possível obter informações de quais os surfactantes fazem parte dos pedidos. Também não foi encontrado o registro da empresa Sigma Aldrich, que importa e vende RML fabricado pela empresa AGAE Technologies [4].

Logo, para um potencial uso ou teste preliminar dos produtos obtidos em ambiente, é necessário ensaios adicionais para enquadramento nas normas exigidas pelo IBAMA. Estas incluem entre outras exigências, testes de toxicidade aguda para o misidáceo (crustacea) Mysidopsis juniae (Norma CETESB L5.251) e Artemia (Norma CETESB L5.021) [156]. Não há exigência de ensaios em células animais para o enquadramento [157].

Os resultados para Artemia gerados nesta tese podem ser utilizados, porém deverão ser complementados com controles utilizando SDS e com amostras da mistura óleo/dispersante e do óleo puro [157].

Capítulo 6

Conclusões

- Foi reportada a capacidade de crescimento celular e produção de RML pelo micro-organismo geneticamente modificado *P. aeruginosa-estA*, a partir de glicerina, óleos vegetais, glicose e ácido graxo como fontes de carbono, e nitrato de sódio e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.
- Foi estudada e reportada a cinética de produção de RML por *P. aeruginosa*estA em diferentes razões C/N e suas alterações discutidas. Entre as razões 17,5, 50,0, 83,2 e 116,0, a razão 83,2 se destacou pelo alto valor de conversão de sibstrato em protuto, e por sua produtividade.
- *P. aeruginosa*-estA foi capaz de produzir alto título de RML quando comparada com outras cepas modificadas da literatura.
- Foi mostrado que a modificação genética não parece gerar mudanças na proporção Mono:Di-RML.
- *P. aeruginosa*-estA foi capaz de produzir alto título de RML mesmo utilizando fonte alternativa de substrato. No caso, glicerina bruta co-produto da indústria de biodiesel.
- o SLC produzido neste trabalho foi capaz de emulsificar e dispersar óleo acima dos comumente reportados pela literatura.
- Os valores de tensão interfacial entre sistemas envolvendo água, água do mar
sintética, petróleo e hexano, foram semelhantes aos já reportados na literatura para RML e melhor que os reportados para outros biosurfactantes. Os valores foram pouco ou nada influenciados pelo intervalo de temperatura, salinidade e pressão testados.

- Foi demostrado o potencial de uso do RML produzido por *P. aeruginosa*estA, e a partir do co-produto industrial glicerina bruta, na remediação de águas brasileiras impactadas com petróleo.
- Foi mostrado que uso de RML obtido pela cepa geneticamente modificada, não parece interferir nos níveis de toxicidade da amostra final, mesmo quando esta não passou por processos expendiosos de purificação.

Capítulo 7

Perspectivas

• Biologia molecular para produção de raminolipídeos

A modificação genética realizada sobre o gene *estA* se destacou frente às outras modificações reportadas pela literatura. Um segundo trabalho de sucesso realizou a expressão da hemoglobina bateriana VhB, que aumenta a disponibilidade de oxigênio para o micro-organismo. A cepa *P. aeruginosa* JC tem o gene *vhb* clonado de forma cromossomial e está sendo alvo de estudos paralelos desta tese. Entre os alvos do trabalho, inclui a expressão de EstA nesta cepa, e análise da produção de RML pela cepa hibrida Vhb-EstA.

• Produção de RML por *P. aeruginosa*-estA em biorreator

Vislumbrando uma produção industrial, é necessário o estudo e adequação do processo para escalas maiores de produção. Desta forma, ensaios estão sendo realizados em biorreator com oxigenação de membranas. Neste sistema, a oxigenação é difundida para o seio do líquido através de um sistema de membranas e não por agitação ou borbulhamento, evitando assim a geração de espuma que é considerada um dos grandes problemas da área.

• Estudo do papel metabólico de EstA

Para complementação das análises da influência de EstA no metabolismo, incluindo o de nitrogênio, devem ser criados mutantes auxialiares. Entre eles, clones com *estA* deletado e com *estA* com seu sítio catálitico alterado por mutação sítio-dirigida.

• Adequação às normas IBAMA

Vislumbrando potenciais ensaios *in loco* do SLC de *P. aeruginosa*-estA, é necessário que estes passem por ensaios de toxicidade complementares, conforme normas do IBAMA.

Referências Bibliográficas

- [1] VAN DEN BERG, B. "Crystal Structure of a Full-Length Autotransporter", Journal of Molecular Biology, v. 396, n. 3, pp. 627-633, feb 2010. ISSN: 00222836. doi: 10.1016/j.jmb.2009.12.061. Disponível em: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002228361000015X>.
- [2] DOBLER, L., VILELA, L. F., ALMEIDA, R. V., et al. "Rhamnolipids in perspective: gene regulatory pathways, metabolic engineering, production and technological forecasting", New Biotechnology, v. 33, n. 1, pp. 123–135, 2016. doi: 10.1016/j.nbt.2015.09.005.
- [3] GLYCOSURF, D. "Rhamnolipids GlycoSurf". 2018. Disponível em: <http: //glycosurf.com/rhamnolipids/rhamnolipids/>.
- [4] AGAE_TECHNOLOGY. "Rhamnolipid Products". 2018. Disponível em: https://www.agaetech.com/new-product-catalog-2/.
- [5] ABDEL-MAWGOUD, A. M., LÉPINE, F., DÉZIEL, E. "Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles", *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 86, n. 5, pp. 1323–1336, may 2010. ISSN: 0175-7598. doi: 10.1007/s00253-010-2498-2. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/s00253-010-2498-2.
- [6] DOBLER, L. Expressão e caracterização funcional da EstA de Pseudomonas aeruginosa PAO1 visando à otimização da produção de biossurfactantes do tipo raminolipídeo. Dissertação de mestrado submetida ao programa de pós-graduação em bioquímica, instituto de química, universidade federal do rio de janeiro – ufrj, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre em ciências., Federal University from Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <https://minerva.ufrj.br/F/ YPTTR27SQQ7Q89XE6BU42KTGPUCX3BA69CN91FQJMXLREPDNU6-24555? func=find-b{&}find{_}code=WRD{&}request= dobler{&}local{_}base=UFR01{&}x=0{&}y=0>.

- [7] LIU, G., ZHONG, H., YANG, X., et al. "Advances in applications of rhamnolipids biosurfactant in environmental remediation: A review", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 115, n. 4, pp. 796–814, 2018. ISSN: 10970290. doi: 10.1002/bit.26517.
- [8] LI, Q. "Rhamnolipid synthesis and production with diverse resources", Frontiers of Chemical Science and Engineering, v. 11, n. 1, pp. 27-36, mar 2017. ISSN: 2095-0179. doi: 10.1007/s11705-016-1607-x. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/s11705-016-1607-x.
- [9] MEYER, B., FERRIGNI, N., PUTNAM, J., et al. "Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents", *Planta Medica*, v. 45, n. 05, pp. 31–34, may 1982. ISSN: 0032-0943. doi: 10.1055/s-2007-971236. Disponível em: http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2007-971236.
- BANAT, I. M., FRANZETTI, A., GANDOLFI, I., et al. "Microbial biosurfactants production, applications and future potential", *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 87, n. 2, pp. 427-444, jun 2010. ISSN: 0175-7598. doi: 10.1007/s00253-010-2589-0. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/s00253-010-2589-0>.
- [11] ELSHIKH, M., FUNSTON, S., CHEBBI, A., et al. "Rhamnolipids from non-pathogenic Burkholderia thailandensis E264: Physicochemical characterization, antimicrobial and antibiofilm efficacy against oral hygiene related pathogens", New Biotechnology, v. 36, pp. 26-36, may 2017. ISSN: 18716784. doi: 10.1016/j.nbt.2016.12.009. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/ pii/S1871678416323020?np=yhttp://linkinghub.elsevier.com/ retrieve/pii/S1871678416323020>.
- [12] LOURITH, N., KANLAYAVATTANAKUL, M. "Natural surfactants used in cosmetics: glycolipids", International Journal of Cosmetic Science, v. 31, n. 4, pp. 255-261, aug 2009. ISSN: 01425463. doi: 10.1111/j. 1468-2494.2009.00493.x. Disponível em: ">http://doi.wiley.com/10.1111/j.1468-2494.2009.00493.x>.
- [13] NITSCHKE, M., SILVA, S. S. E. "Recent food applications of microbial surfactants", Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 58, n. 4, pp. 631–638, mar 2018. ISSN: 1040-8398. doi: 10.1080/10408398.2016.1208635. Disponível em: http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.

2016.1208635https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/ 10408398.2016.1208635>.

- [14] MARCHANT, R., BANAT, I. M. "Microbial biosurfactants: chaland opportunities for future exploitation", Trends lenges in*Biotechnology*, v. 30, n. 11, pp. 558–565, nov 2012. ISSN: 01677799. 10.1016/j.tibtech.2012.07.003. doi: Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.07.003http: //linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779912001138>.
- [15] EL-SHESHTAWY, H., AIAD, I., OSMAN, M., et al. "Production of biosurfactant from Bacillus licheniformis for microbial enhanced oil recovery and inhibition the growth of sulfate reducing bacteria", *Egyptian Journal of Petroleum*, v. 24, n. 2, pp. 155–162, jun 2015. ISSN: 11100621. doi: 10.1016/j.ejpe.2015.05.005.
- [16] ZHAO, F., SHI, R., ZHAO, J., et al. "Heterologous production of *Pseudo-monas aeruginosa* rhamnolipid under anaerobic conditions for microbial enhanced oil recovery", *Journal of Applied Microbiology*, v. 118, n. 2, pp. 379–389, feb 2014. ISSN: 13645072. doi: 10.1111/jam.12698. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1111/jam.12698>.
- [17] RIKALOVIC, M., VRVIC, M., KARADZIC, I. "Rhamnolipid biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa*: From discovery to application in contemporary technology", *Journal of the Serbian Chemical Society*, v. 80, n. 3, pp. 279–304, 2015. ISSN: 0352-5139. doi: 10. 2298/JSC140627096R. Disponível em: http://www.doiserbia.nb.rs/Article.aspx?ID=0352-51391400096R>.
- [18] SEKHON RANDHAWA, K. K., RAHMAN, P. K. S. M. "Rhamnolipid biosurfactants past, present, and future scenario of global market", *Frontiers in Microbiology*, v. 5, n. September, pp. 1–7, sep 2014. ISSN: 1664-302X. doi: 10.3389/fmicb.2014.00454. Disponível em: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2014.00454.
- [19] WITTGENS, A., TISO, T., ARNDT, T. T., et al. "Growth independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic *Pseudomonas putida* KT2440", *Microbial Cell Factories*, v. 10, n. 1, pp. 80, 2011. ISSN: 1475-2859. doi: 10.1186/1475-2859-10-80. Disponível em: <http://www.microbialcellfactories.com/content/10/1/80http: //microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/ 1475-2859-10-80>.

- [20] MÜLLER, M. M., HÖRMANN, B., SYLDATK, C., et al. "Pseudomonas aeruginosa PAO1 as a model for rhamnolipid production in bioreactor systems", Applied Microbiology and Biotechnology, v. 87, n. 1, pp. 167–174, jun 2010. ISSN: 0175-7598. doi: 10.1007/s00253-010-2513-7. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-010-2513-7>.
- [21] WILHELM, S., TOMMASSEN, J., JAEGER, K. E. "A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*", *Journal of Bacteriology*, v. 181, n. 22, pp. 6977–6986, 1999. ISSN: 00219193.
- [22] BINDER, U., MATSCHINER, G., THEOBALD, I., et al. "High-throughput Sorting of an Anticalin Library via EspP-mediated Functional Display on the *Escherichia coli* Cell Surface", *Journal of Molecular Biology*, v. 400, n. 4, pp. 783–802, 2010. ISSN: 00222836. doi: 10.1016/j.jmb.2010.05.049. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2010.05.049.
- [23] BECKER, S., THEILE, S., HEPPELER, N., et al. "A generic system for the *Escherichia coli* cell-surface display of lipolytic enzymes", *FEBS Letters*, v. 579, pp. 1177–1182, 2005. ISSN: 00145793. doi: 10.1016/j.febslet.2004. 12.087.
- [24] BECKER, S., HÖBENREICH, H., VOGEL, A., et al. "Single-Cell High-Throughput Screening To Identify Enantioselective Hydrolytic Enzymes", *Angewandte Chemie International Edition*, v. 47, n. 27, pp. 5085–5088, jun 2008. ISSN: 14337851. doi: 10.1002/anie.200705236. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.200705236>.
- [25] HENDERSON, I. R., NAVARRO-GARCIA, F., DESVAUX, M., et al. "Type V Protein Secretion Pathway : the Autotransporter Story", *Microbiology* and molecular biology reviews, v. 68, n. 4, pp. 692–744, 2004. doi: 10. 1128/MMBR.68.4.692.
- [26] FAIRMAN, J. W., NOINAJ, N., BUCHANAN, S. K. "The structural biology of β-barrel membrane proteins: a summary of recent reports", Current Opinion in Structural Biology, v. 21, n. 4, pp. 523-531, aug 2011. ISSN: 0959440X. doi: 10.1016/j.sbi.2011.05.005. Disponível em: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959440X11000935>.
- [27] WILHELM, S., GDYNIA, A., TIELEN, P., et al. "The Autotransporter Esterase EstA of Pseudomonas aeruginosa Is Required for Rhamnolipid Production, Cell Motility, and Biofilm Formation", Journal of Bacteriology, v. 189, n. 18, pp. 6695–6703, sep 2007. ISSN: 0021-9193. doi:

10.1128/JB.00023-07. Disponível em: <http://jb.asm.org/cgi/doi/ 10.1128/JB.00023-07>.

- [28] DELEU, M., PAQUOT, M. "From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants", Comptes Rendus Chimie, v. 7, n. 6-7, pp. 641-646, jun 2004. ISSN: 16310748. doi: 10.1016/j.crci.2004.04. 002. Disponível em: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/ pii/S1631074804001146>.
- [29] VAN BOGAERT, I. N. A., SAERENS, K., DE MUYNCK, C., et al. "Microbial production and application of sophorolipids", *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 76, n. 1, pp. 23–34, jul 2007. ISSN: 0175-7598. doi: 10.1007/s00253-007-0988-7. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/s00253-007-0988-7.
- [30] SHAH, A., SHAHZAD, S., MUNIR, A., et al. "Micelles as Soil and Water Decontamination Agents", *Chemical Reviews*, p. acs.chemrev.6b00132, 2016. ISSN: 0009-2665. doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00132. Disponível em: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.chemrev.6b00132.
- [31] MENDES, A. N., FILGUEIRAS, L. A., PINTO, J. C., et al. "Physicochemical Properties of Rhamnolipid Biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 to Applications in Microemulsions", *Journal of Biomaterials* and Nanobiotechnology, v. 06, n. 01, pp. 64–79, 2015. ISSN: 2158-7027. doi: 10.4236/jbnb.2015.61007. Disponível em: http://www.scirp.org/journal/doi.aspx?D0I=10.4236/jbnb.2015.61007>.
- [32] ZULIANELLO, L., CANARD, C., KÖHLER, T., et al. "Rhamnolipids Are Virulence Factors That Promote Early Infiltration of Primary Human Airway Epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*", *Infection and Immunity*, v. 74, n. 6, pp. 3134–3147, jun 2006. ISSN: 0019-9567. doi: 10.1128/IAI. 01772-05. Disponível em: http://iai.asm.org/cgi/content/short/74/6/3134>.
- [33] BOLES, B. R., THOENDEL, M., SINGH, P. K. "Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms", *Molecular Microbiology*, v. 57, n. 5, pp. 1210–1223, 2005. ISSN: 0950382X. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04743.x.
- [34] DE KIEVIT, T. R. "Quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa biofilms". 2009. ISSN: 14622912.

- [35] CAIAZZA, N. C., SHANKS, R. M. Q., O'TOOLE, G. A. "Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*", *Journal* of Bacteriology, v. 187, n. 21, pp. 7351–7361, 2005. ISSN: 00219193. doi: 10.1128/JB.187.21.7351-7361.2005.
- [36] HEURLIER, K., WILLIAMS, F., HEEB, S., et al. "Positive Control of Swarming, Rhamnolipid Synthesis, and Lipase Production by the Posttranscriptional RsmA/RsmZ System in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1", *Journal of Bacteriology*, v. 186, n. 10, pp. 2936–2945, 2004. ISSN: 00219193. doi: 10.1128/JB.186.10.2936-2945.2004.
- [37] SCHMIDBERGER, A., HENKEL, M., HAUSMANN, R., et al. "Expression of genes involved in rhamnolipid synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in a bioreactor cultivation", *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 97, n. 13, pp. 5779–5791, jul 2013. ISSN: 0175-7598. doi: 10.1007/s00253-013-4891-0. Disponível em: http://link.springer. com/10.1007/s00253-013-4891-0>.
- [38] WITTGENS, A., KOVACIC, F., MÜLLER, M. M., et al. "Novel insights into biosynthesis and uptake of rhamnolipids and their precursors", Applied Microbiology and Biotechnology, v. 101, n. 7, pp. 2865–2878, apr 2017. ISSN: 0175-7598. doi: 10.1007/s00253-016-8041-3. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-016-8041-3>.
- [39] OCHSNER, U. A., REISER, J., FIECHTER, A., et al. "Production of Pseudomonas aeruginosa rhamnolipid biosurfactants in heterologous hosts", Applied and Environmental Microbiology, v. 61, n. 9, pp. 3503–3506, 1995. ISSN: 00992240.
- [40] BANERJEE, S., KARNS, J., CHAKRABARTY, A. "Pseudomonas bacteria, emulsifying composition comprising *Pseudomonas* bacteria and method of producing a composition comprising *Pseudomonas* bacteria". jun. 16 1987. Disponível em: https://encrypted.google.com/ patents/EP0161511A3?cl=pt-PT>. EP Patent App. EP19,850,104,565.
- [41] O, K., L, G., O, K., et al. "Microbiological rhamnolipid surfactant prepn. by continuously cultivating *Pseudomonas* species microorganisms under submerged aerobic conditions with limitation or growth". 1985.
- [42] HAFERBURG, D., HOMMEL, R., KLEBER, H. P., et al. "Bio-surfactant esp. rhammolipid prepn.-by cultivating *Pseudomonas aeruginosa* in liq. synthetic media with the addn. of ammonium ferrous sulphate to promote growth-rate". 1986.

- [43] DANIELS, L., LINHARDT, R. J., BRYAN, B. A., et al. "Rhamnose and 3hydroxy-decanoic acid prodn - by hydrolysis of rhamno-lipid produced by *Pseudomonas* strain". 1988.
- [44] ARETZ, W., HEDTMANN, U. "Inducing rhamno:lipid synthesis in *Pseudo-monas aeruginosa* with glyceric acid ether lipid, to form intermediate for rhamnose which is used in synthesis of chiral cpds." 1993.
- [45] JU, L. "Production of biological products e.g. biosurfactants, viscous biopolymers, proteins and enzymes under aerobic or anaerobic conditions using an alternative oxidant source other than oxygen". 2000.
- [46] MELO SANTA ANNA, L. M., GUIMARAES FREIRE, D. M., DE ARAUJO KRONEMBERGER, F., et al. "System for obtaining bioproducts such as biosurfactants, biofuel, enzymes and chemicals for production of biofuels, has bioreactor and tank for preparation of medium". 2012.
- [47] KRIEGER, N., MITCHELL, D. A., CAMILIOS, D., et al. "Solid state fermentation method for production of rhamnolipids, involves using strains of *Pseudomonas* species". 2009.
- [48] DHANARAJAN, G., SEN, R. "Cost Analysis of Biosurfactant Production from a Scientist's Perspective". In: *Biosurfactants*, CRC Press, pp. 153– 162, nov 2014. ISBN: 9781466596702. doi: 10.1201/b17599-12. Disponível em: http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/b17599-12>.
- [49] GEETHA, S. J., BANAT, I. M., JOSHI, S. J. "Biosurfactants: Production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR)". 2018. ISSN: 18788181.
- [50] SIGMA_ALDRICH. "rhmanolipid Sigma Aldrich". 2018. Disponível em: ">https://www.sigmaaldrich.com/>.
- [51] ABALOS, A., PINAZO, A., INFANTE, M. R., et al. "Physicochemical and Antimicrobial Properties of New Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from Soybean Oil Refinery Wastes", *Langmuir*, v. 17, n. 5, pp. 1367–1371, 2001. ISSN: 0743-7463. doi: 10.1021/la0011735. Disponível em: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la0011735>.
- [52] HABA, E., PINAZO, A., JAUREGUI, O., et al. "Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 81, n. 3, pp. 316–322, feb 2003. ISSN: 0006-3592. doi: 10.1002/bit. 10474. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1002/bit.10474>.

- [53] CREATIVE_COMMONS. "L'Oréal Wikipédia, a enciclopédia livre". 2018. Disponível em: <https://pt.wikipedia.org/ wiki/L{%}270r{\unhbox\voidb@x\bgroup\let\unhbox\voidb@ x\setbox\@tempboxa\hbox{e\global\mathchardef\accent@ spacefactor\spacefactor}\accent19e\egroup\spacefactor\ accent@spacefactor}al>.
- [54] USA, L. P. "Rhamnose Sugar Skincare Ingredient L'Oreal Paris". 2017. Disponível em: http://www.lorealparisusa.com/en/ ingredient-library/rhamnose.aspx>.
- [55] KAMAL, A. "Metabolic Profiling and Biological Activities of Bioactive Compounds Produced by *Pseudomonas* sp. Strain ICTB-745 Isolated from Ladakh, India", *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 22, n. 1, pp. 69-79, jan 2012. ISSN: 10177825. doi: 10.4014/jmb.1105.05008. Disponível em: .
- [56] KIM, S. K., KIM, Y. C., LEE, S., et al. "Insecticidal Activity of Rhamnolipid Isolated from *Pseudomonas* sp. EP-3 against Green Peach Aphid (Myzus persicae)", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, n. 3, pp. 934–938, feb 2011. ISSN: 0021-8561. doi: 10.1021/jf104027x. Disponível em: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf104027x.
- [57] SILVA, V. L., LOVAGLIO, R. B., VON ZUBEN, C. J., et al. "Rhamnolipids : solution against Aedes aegypti?" Frontiers in Microbiology, v. 6, n. February, pp. Article 88, 2015. doi: 10.3389/fmicb.2015.00088.
- [58] PEI, X.-H., ZHAN, X.-H., WANG, S.-M., et al. "Effects of a Biosurfactant and a Synthetic Surfactant on Phenanthrene Degradation by a Sphingomonas Strain", *Pedosphere*, v. 20, n. 6, pp. 771-779, dec 2010. ISSN: 10020160. doi: 10.1016/S1002-0160(10)60067-7. Disponível em: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1002016010600677>.
- [59] DAHRAZMA, B., MULLIGAN, C. N. "Investigation of the removal of heavy metals from sediments using rhamnolipid in a continuous flow configuration", *Chemosphere*, v. 69, n. 5, pp. 705-711, oct 2007. ISSN: 004565355. doi: 10.1016/j.chemosphere.2007.05.037. Disponível em: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653507006765>.
- [60] JUWARKAR, A. A., NAIR, A., DUBEY, K. V., et al. "Biosurfactant technology for remediation of cadmium and lead contaminated soils", *Chemosphere*, v. 68, n. 10, pp. 1996–2002, aug 2007. ISSN: 00456535. doi: 10.

1016/j.chemosphere.2007.02.027. Disponível em: <http://linkinghub. elsevier.com/retrieve/pii/S0045653507002615>.

- [61] LAI, C.-C., HUANG, Y.-C., WEI, Y.-H., et al. "Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil", *Journal of Hazardous Materials*, v. 167, n. 1-3, pp. 609-614, aug 2009. ISSN: 03043894. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.01.017. Disponível em: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030438940900048X>.
- [62] RAHMAN, K. S., RAHMAN, T. J., KOURKOUTAS, Y., et al. "Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients", *Bioresource Technology*, 2003. ISSN: 09608524. doi: 10.1016/S0960-8524(03)00114-7.
- [63] VARJANI, S. J., UPASANI, V. N. "Core Flood study for enhanced oil recovery through ex-situ bioaugmentation with thermo- and halo-tolerant rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514", *Bioresource Technology*, 2016. ISSN: 18732976. doi: 10.1016/j.biortech.2016.08.060.
- [64] PETROLEUM, B. BP Statistical Review of World Energy June 2017. Relatório técnico, British Petroleum, 2017. Disponível em: https://www.bp.com/content/dam/bp/en/ corporate/pdf/energy-economics/statistical-review-2017/ bp-statistical-review-of-world-energy-2017-full-report. pdf
- [65] ITOPF, I. T. O. P. F. L. Oil Tanker Spill Statistics 2017. Relatório técnico, ITOPF, London, 2017. Disponível em: http://www.itopf. org/knowledge-resources/data-statistics/statistics/>.
- [66] HIRA, A., DE OLIVEIRA, L. G. "No substitute for oil? How Brazil developed its ethanol industry", *Energy Policy*, v. 37, n. 6, pp. 2450-2456, jun 2009. doi: 10.1016/j.enpol.2009.02.037. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.enpol.2009.02.037.
- [67] GIANI, C., WULLBRANDT, D., ROTHERT, R., et al. "New Pseudomonas aeruginosa strains producing rhamno:lipid(s) at high concn - used for prodn. of pharmaceutical, agrochemical or aroma intermediate L-Rhamnose by hydrolysis". 1994.
- [68] SOLAIMAN, D. K. Y., ASHBY, R. D., GUNTHER, N. W., et al. "Dirhamnose-lipid production by recombinant nonpathogenic bacterium Pseudomonas chlororaphis", Applied Microbiology and Bi-

otechnology, v. 99, n. 10, pp. 4333-4342, may 2015. ISSN: 0175-7598. doi: 10.1007/s00253-015-6433-4. Disponível em: <http: //link.springer.com/10.1007/s00253-015-6433-4{%}5Cnhttp: //www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25661819http://link.springer. com/10.1007/s00253-015-6433-4>.

- [69] HAN, L., LIU, P., PENG, Y., et al. "Engineering the biosynthesis of novel rhamnolipids in *Escherichia coli* for enhanced oil recovery", *Journal of Applied Microbiology*, v. 117, n. 1, pp. 139–150, jul 2014. ISSN: 13645072. doi: 10.1111/jam.12515. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1111/jam.12515.
- [70] CHA, M., LEE, N., KIM, M., et al. "Heterologous production of Pseudomonas aeruginosa EMS1 biosurfactant in Pseudomonas putida", Bioresource Technology, v. 99, n. 7, pp. 2192-2199, may 2008. ISSN: 09608524. doi: 10.1016/j.biortech.2007.05.035. Disponível em: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852407004464>.
- [71] COLAK, A. K., KAHRAMAN, H., COLAK, et al. "The use of raw cheese whey and olive oil mill wastewater for rhamnolipid production by recombinant *Pseudomonas aeruginosa*", *Environmental and Experimental Biology*, v. 11, pp. 125–130, 2013.
- [72] KRYACHKO, Y., NATHOO, S., LAI, P., et al. "Prospects for using native and recombinant rhamnolipid producers for microbially enhanced oil recovery", *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 81, pp. 133-140, jul 2013. ISSN: 09648305. doi: 10.1016/j.ibiod.2012.09. 012. Disponível em: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0964830512002697>.
- [73] TAVARES, L. F. D., SILVA, P. M., JUNQUEIRA, M., et al. "Characterization of rhamnolipids produced by wild-type and engineered Burkholderia kururiensis", Applied Microbiology and Biotechnology, v. 97, n. 5, pp. 1909–1921, mar 2013. ISSN: 0175-7598. doi: 10.1007/s00253-012-4454-9. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/s00253-012-4454-9>.
- [74] KAHRAMAN, H., ERENLER, S. O. "Rhamnolipid production by *Pseudomo*nas aeruginosa engineered with the Vitreoscilla hemoglobin gene", Applied Biochemistry and Microbiology, v. 48, n. 2, pp. 188–193, mar 2012. ISSN: 0003-6838. doi: 10.1134/S000368381202007X.

- [75] ROSENAU, F., ISENHARDT, S., GDYNIA, A., et al. "Lipase LipC affects motility, biofilm formation and rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa*", *FEMS Microbiology Letters*, v. 309, n. 1, pp. no-no, may 2010. ISSN: 03781097. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.02017.x. Disponível em: ">https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2010.02017.x>.
- [76] WANG, Q., FANG, X., BAI, B., et al. "Engineering Bacteria for Production of Rhamnolipid as an Agent for Enhanced Oil Recovery", *Biotechnology* and *Bioengineering*, v. 98, n. 4, pp. 842–853, 2007. ISSN: 00063592. doi: 10.1002/bit.
- [77] CABRERA-VALLADARES, N., RICHARDSON, A.-P., OLVERA, C., et al. "Monorhamnolipids and 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs) production using *Escherichia coli* as a heterologous host", *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 73, n. 1, pp. 187–194, oct 2006. ISSN: 0175-7598. doi: 10.1007/s00253-006-0468-5. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/s00253-006-0468-5.
- [78] WIGNESWARAN, V., NIELSEN, K. F., STERNBERG, C., et al. "Biofilm as a production platform for heterologous production of rhamnolipids by the non-pathogenic strain *Pseudomonas putida* KT2440", *Microbial Cell Factories*, v. 15, n. 181, pp. ??, 2016. doi: 10.1186/s12934-016-0581-.
- [79] MACEACHRAN, D. P., ULRICH, J. "New Ralstonia eutropha cell having been transfected with a vector comprising e.g. rhlA gene from Pseudomonas aeruginosa or xylA gene from Pseudomonas fluorescens Pf01, useful for producing rhamnolipids". 2014.
- [80] SCHAFFER, S., WESSEL, M., THIESSENHUSEN, A., et al. "Cell forming a rhamnolipid, useful for producing cosmetics, dermatological or pharmaceutical formulations, plant protection formulations, care- and cleaning products and surfactant concentrates". 2012.
- [81] SCHAFFER, S., THIESSENHUSEN, A., WESSEL, M. "New cell capable of forming rhamnolipid compound, which is useful for the production of cosmetic, dermatological or pharmaceutical formulations, of plant protection formulations and of care and cleaning agents and surfactant concentrates". 2013.
- [82] BLANK, L., ROSENAU, F., WILHELM, S., et al. "New host cell e.g. prokaryotic cell used for producing rhamnolipid used as detergent in washing

agent, comprises rhamnosyltransferase 1, subunit A gene and rhamnosyltransferase 1, subunit B gene, under control of heterologous promoter". 2013.

- [83] STARK, B. C., PAGILLA, K. R., DIKSHIT, K. L. "Recent applications of Vitreoscilla hemoglobin technology in bioproduct synthesis and bioremediation", *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 99, n. 4, pp. 1627–1636, feb 2015. ISSN: 0175-7598. doi: 10.1007/s00253-014-6350-y. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/s00253-014-6350-y>.
- [84] TIELEN, P., ROSENAU, F., WILHELM, S., et al. "Extracellular enzymes affect biofilm formation of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*", *Microbiology*, v. 156, n. 7, pp. 2239-2252, jul 2010. ISSN: 1350-0872. doi: 10.1099/mic. 0.037036-0. Disponível em: http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.037036-0>.
- [85] WEST, S. E. H., SCHWEIZERB, H. P., DALL, C., et al. "Construction of improved Escherichia-Pseudomonas shuttle vectors derived from pUC 18 / 1 9 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas* aeruginosa", Gene, v. 128, pp. 81–86, 1994.
- [86] SMYTH, T. J. P., RUDDEN, M., TSAOUSI, K., et al. "Protocols for the Detection and Chemical Characterisation of Microbial Glycolipids". In: McGenity, T. (Ed.), Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols - Springer Protocols Handbooks, n. October 2016, 1 ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014, cap. 1, pp. 29-60, Berlin Heidelberg 2, 2014. ISBN: 9780874216561. doi: 10.1007/8623_2014_25. Disponível em: <http://link.springer.com/ 10.1007/8623{_}2014{_}25http://arxiv.org/abs/1011.1669http: //dx.doi.org/10.1088/1751-8113/44/8/085201>.
- [87] JARVIS, F. G., JOHNSON, M. J. "A Glyco-lipide Produced by Pseudomonas aeruginosa", Journal of the American Chemical Society, 1949. ISSN: 15205126. doi: 10.1021/ja01180a073.
- [88] HAUSER, G., KARNOVSKY, M. L. "Studies on the production of glycolipide by pseudomonas aeruginosa", *Journal of Bacteriology*, v. 68, n. 1954, pp. 645–655, 1954.
- [89] SYLDATK, C., LANG, S., MATULOVIC, U., et al. "Production of four interfacial active rhamnolipids from n-alkanes or glycerol by resting cells of pseudomonas species DSM 2874", Zeitschrift fur Naturforschung - Section

C Journal of Biosciences, v. 40, n. 1-2, pp. 61–67, 1985. ISSN: 18657125. doi: 10.1515/znc-1985-1-213.

- [90] MÜLLER, M. M., HÖRMANN, B., KUGEL, M., et al. "Evaluation of rhamnolipid production capacity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in comparison to the rhamnolipid over-producer strains DSM 7108 and DSM 2874", *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 89, n. 3, pp. 585–592, feb 2011. ISSN: 0175-7598. doi: 10.1007/s00253-010-2901-z. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-010-2901-z>.
- [91] BENNETT, B., KIMBALL, E., GAO, M. "Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in Escherichia coli." *Nature chemical*..., 2009. ISSN: 1552-4450. doi: 10.1038/nchembio.186.Absolute.
- [92] SHAH, M. U. H., SIVAPRAGASAM, M., MONIRUZZAMAN, M., et al. "A comparison of Recovery Methods of Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas* Aeruginosa", *Procedia Engineering*, v. 148, pp. 494– 500, 2016. ISSN: 18777058. doi: 10.1016/j.proeng.2016.06.538. Disponível em: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877705816310050>.
- [93] LEITERMANN, F., SYLDATK, C., HAUSMANN, R. "Fast quantitative determination of microbial rhamnolipids from cultivation broths by ATR-FTIR Spectroscopy", Journal of Biological Engineering, v. 2, n. 1, pp. 13, 2008. ISSN: 1754-1611. doi: 10.1186/1754-1611-2-13. Disponível em: http://jbioleng.biomedcentral.com/articles/10.1186/1754-1611-2-13.
- [94] NITSCHKE, M., COSTA, S. G. V. A. O., HADDAD, R., et al. "Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI", *Biotechnology Progress*, v. 21, n. 5, pp. 1562–1566, 2005. ISSN: 87567938. doi: 10.1021/bp050198x.
- [95] SMYTH, T. J. P., PERFUMO, A., MARCHANT, R., et al. "Isolation and Analysis of Low Molecular Weight Microbial Glycolipids". In: *Handbook* of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, 2010. ISBN: 978-3-540-77584-3. doi: 10.1007/978-3-540-77587-4.
- [96] KOCH, A. K., KAPPELI, O., FIECHTER, A., et al. "Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants", *Journal of Bacteriology*, v. 173, n. 13, pp. 4212–4219, 1991. ISSN: 00219193. doi: 10.1128/jb.173.13.4212-4219.1991.

- [97] CHANDRASEKARAN, E. V., BEMILLER, J. N. "Constituent analyses of glycosaminoglycans". In: Whistler, R. L. (Ed.), Methods in Carbohydrate Chemistry, pp. 89–96, New York, 1980. ISBN: 032315364X.
- [98] TAVARES, L. F. Produção e caracterização de biossurfactantes produzidos por Burkholderia kururiensis. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.
- [99] DOBLER, L., DE CARVALHO, B. R., ALVES, W. D. S., et al. "Enhanced rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing *estA* in a simple medium", *PLOS ONE*, v. 12, n. 8, pp. e0183857, aug 2017. ISSN: 1932-6203. doi: 10.1371/journal.pone.0183857. Disponível em: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0183857>.
- [100] BENINCASA, M., CONTIERO, J., MANRESA, M. A., et al. "Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soap stock as the sole carbon source", *Journal of Food Engineering*, v. 54, pp. 283–288, 2002.
- [101] SCHENK, T., SCHUPHAN, I., SCHMIDT, B. "High-performance liquid chromatographic determination of the rhamnolipids produced by *Pseudomo*nas aeruginosa", Journal of Chromatography A, 1995. ISSN: 00219673. doi: 10.1016/0021-9673(94)01127-Z.
- [102] IRORERE, V. U., TRIPATHI, L., MARCHANT, R., et al. "Microbial rhamnolipid production: a critical re-evaluation of published data and suggested future publication criteria", *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 101, n. 10, pp. 3941–3951, may 2017. ISSN: 0175-7598. doi: 10.1007/s00253-017-8262-0. Disponível em: http://link.springer. com/10.1007/s00253-017-8262-0.
- [103] DÉZIEL, E., LÉPINE, F., MILOT, S., et al. "Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP", *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1485, n. 2-3, pp. 145–152, may 2000. ISSN: 13881981. doi: 10.1016/S1388-1981(00)00039-1. Disponível em: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1388198100000391>.
- [104] SONG, B., SPRINGER, J. "Determination of Interfacial Tension from the Profile of a Pendant Drop Using Computer-Aided Image Processing2. Experimental", *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 184, n. 1, pp. 77– 91, dec 1996. ISSN: 00219797. doi: 10.1016/S0021-9797(96)90598-6.

Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/ S0021979796905986>.

- [105] BUTT, H.-J., GRAF, K., KAPPL, M. "Front Matter". In: *Physics and Chemistry of Interfaces*, pp. i-xii, 2003. ISBN: 9783527602315. doi: 10.1002/3527602313.fmatter. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1002/3527602313.fmatter>.
- [106] TISO, T., THIES, S., MÜLLER, M., et al. "Rhamnolipids: Production, Performance, and Application". In: Lee, S. Y. (Ed.), Consequences of Microbial Interactions with Hydrocarbons, Oils, and Lipids: Production of Fuels and Chemicals, Springer International Publishing, cap. 35, pp. 1-37, Cham, 2017. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-31421-1.
- [107] MORIKAWA, M., HIRATA, Y., IMANAKA, T. "A study on the structurefunction relationship of lipopeptide biosurfactants", *Biochimica et Bi*ophysica Acta (BBA), v. 1488, n. 3, pp. 211–218, 2000. ISSN: 1388-1981.
- [108] SRIRAM, M. I., KALISHWARALAL, K., DEEPAK, V., et al. "Biofilm inhibition and antimicrobial action of lipopeptide biosurfactant produced by heavy metal tolerant strain *Bacillus cereus* NK1", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 85, n. 2, pp. 174–181, jul 2011. ISSN: 09277765. doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.02.026.
- [109] SANTA ANNA, L. M., SEBASTIAN, G. V., PEREIRA, JR, N., et al. "Production of Biosurfactant from a New and Promising Strain of *Pseudomonas aeruginosa* PA1", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 91-93, n. 1-9, pp. 459-468, 2001. ISSN: 0273-2289. doi: 10.1385/ABAB:91-93: 1-9:459. Disponível em: http://link.springer.com/10.1385/ABAB:91-93:1-9:459.
- [110] ALMEIDA, K. L. Produção de ramnolipídios por isolados de Pseudomonas : avaliação do efeito das fontes de carbono e nitrogênio na composição do ramnolipídeo. Dissertação, Universidade de São Paulo, 2011.
- [111] RIZZO, C., MICHAUD, L., SYLDATK, C., et al. "Influence of salinity and temperature on the activity of biosurfactants by polychaete-associated isolates", *Environmental Science and Pollution Research*, v. 21, n. 4, pp. 2988–3004, feb 2014. ISSN: 0944-1344. doi: 10.1007/s11356-013-2259-8. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/s11356-013-2259-8>.

- [112] PERSOONE, G., WELLS, P. G. "Artemia in aquatic toxicology : A Review", Artemia Research and its Applications Vol. 1 : Morphology, Genetics, Strain Characterization, Toxicology, v. 1, pp. 259–275, 1987.
- [113] PIMENTEL, M., JÚNIOR, F. S., SANTAELLA, S., et al. "The use of Artemia sp. as a test-organism to assess the toxicity of the cashew nut improvement industry effluent before and after the treatment by an experimental biological reactor", *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, v. 6, n. 1, 2011.
- [114] NUNES, B. S., CARVALHO, F. D., GUILHERMINO, L. M., et al. "Use of the genus Artemia in ecotoxicity testing". 2006. ISSN: 02697491.
- [115] FINNEY, D. J. "THE ADJUSTMENT FOR A NATURAL RESPONSE RATE IN PROBIT ANALYSIS", Annals of Applied Biology, v. 36, n. 2, pp. 187–195, 1949. ISSN: 17447348. doi: 10.1111/j.1744-7348.1949. tb06408.x.
- [116] MOSMANN, T. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays", Journal of Immunological Methods, v. 65, n. 1-2, pp. 55-63, dec 1983. ISSN: 00221759. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4. Disponível em: <http: //linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022175983903034>.
- [117] "CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. CLSI document M100-S21." 2011.
- [118] DE ARAUJO FILHO, C. A., ERÄNEN, K., MIKKOLA, J.-P., et al. "A comprehensive study on the kinetics, mass transfer and reaction engineering aspects of solvent-free glycerol hydrochlorination", *Chemical Engineering Science*, v. 120, pp. 88–104, dec 2014. doi: 10.1016/j.ces.2014.08.043. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ces.2014.08.043.
- [119] MCCOY, M. "GLYCERIN SURPLUS", Chemical & Engineering News, v. 84, n. 6, pp. 7, feb 2006. doi: 10.1021/cen-v084n006.p007a. Disponível em: https://doi.org/10.1021/cen-v084n006.p007a.
- [120] YAZDANI, S. S., GONZALEZ, R. "Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry", *Current Opinion in Biotechnology*, v. 18, n. 3, pp. 213–219, jun 2007. doi: 10.1016/j.copbio.2007. 05.002. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.

- [121] GUERRERO-PEREZ, M., ROSAS, J., BEDIA, J., et al. "Recent Inventions in Glycerol Transformations and Processing", *Recent Patents on Chemical Engineeringe*, v. 2, n. 1, pp. 11–21, jan 2009. doi: 10.2174/2211334710902010011. Disponível em: https://doi.org/10.2174/2211334710902010011.
- [122] SANTOS, A. S., SAMPAIO, A. P. W., VASQUEZ, G. S., et al. "Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of rhamnolipids by a strain of *Pseudomonas aeruginosa*", *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 98-100, pp. 1025–1035, 2002. ISSN: 0273-2289.
- [123] MATSUFUJI, M., NAKATA, K., YOSHIMOTO, A. "High production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* growing on ethanol", *Biotechnology Letters*, v. 19, n. 12, pp. 1213–1215, 1997. doi: https://doi.org/ 10.1023/A:1018489905076. Disponível em: https://link.springer. com/article/10.1023{%}2FA{%}3A1018489905076>.
- [124] FUNSTON, S. J., TSAOUSI, K., RUDDEN, M., et al. "Characterising rhamnolipid production in Burkholderia thailandensis E264, a non-pathogenic producer", Applied Microbiology and Biotechnology, v. 100, n. 18, pp. 7945-7956, sep 2016. ISSN: 0175-7598. doi: 10.1007/s00253-016-7564-y. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/s00253-016-7564-y>.
- [125] LEŠČIĆ AŠLER, I., IVIĆ, N., KOVAČIĆ, F., et al. "Probing Enzyme Promiscuity of SGNH Hydrolases", *ChemBioChem*, v. 11, n. 15, pp. 2158–2167, oct 2010. ISSN: 14394227. doi: 10.1002/cbic.201000398. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/cbic.201000398>.
- [126] DONG, T., YU, R., SCHELLHORN, H. "Antagonistic regulation of motility and transcriptome expression by RpoN and RpoS in Escherichia coli", *Molecular Microbiology*, v. 79, n. 2, pp. 375–386, nov 2010. doi: 10.1111/ j.1365-2958.2010.07449.x. Disponível em: https://doi.org/10.1111/ j.1365-2958.2010.07449.x.
- [127] RURAL, M. R. M. F. "Soro de leite em pó desmineralizadoem Contagem MG Vender Comprar Soro de leite". 2017. Disponível em: http://www.mfrural.com.br/detalhe/soro-de-leite-em-po-desmineralizado-227218.aspx>.
- [128] MÜLLER, M. M., HAUSMANN, R. "Regulatory and metabolic network of rhamnolipid biosynthesis: Traditional and advanced engineering towards

biotechnological production", *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 91, n. 2, pp. 251-264, jul 2011. ISSN: 0175-7598. doi: 10.1007/ s00253-011-3368-2. Disponível em: <http://link.springer.com/10. 1007/s00253-011-3368-2>.

- [129] TAKAMURA, K., FISCHER, H., MORROW, N. R. "Physical properties of aqueous glycerol solutions", Journal of Petroleum Science and Engineering, v. 98-99, pp. 50-60, nov 2012. doi: 10.1016/j.petrol.2012.09.003. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.petrol.2012.09.003.
- [130] ROBERT, J. M., LATTARI, F. S., MACHADO, A. C., et al. "Production of recombinant lipase B from Candida antarctica in Pichia pastoris under control of the promoter PGK using crude glycerol from biodiesel production as carbon source", *Biochemical Engineering Journal*, v. 118, pp. 123–131, feb 2017. doi: 10.1016/j.bej.2016.11.018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.11.018>.
- [131] HIRSCHMANN, S., BAGANZ, K., KOSCHIK, I., et al. "Development of an integrated bioconversion process for the production of 1,3-propanediol from raw glycerol waters", *Landbauforschung Volkenrode*, v. 55, n. 4, pp. 261–267, 2005. Disponível em: <www.scopus.com>. Cited By :72.
- [132] LIANG, Y., SARKANY, N., CUI, Y., et al. "Batch stage study of lipid production from crude glycerol derived from yellow grease or animal fats through microalgal fermentation", *Bioresource Technology*, v. 101, n. 17, pp. 6745–6750, sep 2010. doi: 10.1016/j.biortech.2010.03.087. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.087>.
- [133] VILLORBINA, G., TOMÀS, A., ESCRIBÀ, M., et al. "Combining AlCl3·6H2O and an ionic liquid to prepare chlorohydrin esters from glycerol", *Tetrahedron Letters*, v. 50, n. 23, pp. 2828–2830, jun 2009. doi: 10.1016/j.tetlet.2009.03.183. Disponível em: https://doi.org/ 10.1016/j.tetlet.2009.03.183>.
- [134] ADHIKARI, S., FERNANDO, S. D., HARYANTO, A. "Hydrogen production from glycerol: An update", *Energy Conversion and Management*, v. 50, n. 10, pp. 2600–2604, oct 2009. doi: 10.1016/j.enconman.2009.06.011. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.enconman.2009.06.011.
- [135] ABAD, S., TURON, X. "Valorization of biodiesel derived glycerol as a carbon source to obtain added-value metabolites: Focus on polyunsaturated fatty acids", *Biotechnology Advances*, v. 30, n. 3, pp. 733–741, may 2012. doi:

10.1016/j.biotechadv.2012.01.002. Disponível em: <https://doi.org/ 10.1016/j.biotechadv.2012.01.002>.

- [136] KARINEN, R., KRAUSE, A. "New biocomponents from glycerol", Applied Catalysis A: General, v. 306, pp. 128–133, jun 2006. doi: 10.1016/j.apcata. 2006.03.047. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.apcata.
- [137] ZAKARIA, Z., LINNEKOSKI, J., AMIN, N. "Catalyst screening for conversion of glycerol to light olefins", *Chemical Engineering Journal*, v. 207-208, pp. 803-813, oct 2012. doi: 10.1016/j.cej.2012.07.072. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.07.072.
- [138] ONWOSI, C. O., ODIBO, F. J. C. "Effects of carbon and nitrogen sources on rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas nitrore-ducens* isolated from soil", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 28, pp. 937–942, mar 2012. ISSN: 0959-3993. doi: 10.1007/s11274-011-0891-3. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/s11274-011-0891-3>.
- [139] DE SOUSA, J. R., DA COSTA CORREIA, J. A., DE ALMEIDA, J. G. L., et al. "Evaluation of a co-product of biodiesel production as carbon source in the production of biosurfactant by *P. aeruginosa* MSIC02", *Process Biochemistry*, v. 46, n. 9, pp. 1831–1839, sep 2011. ISSN: 13595113. doi: 10.1016/j.procbio.2011.06.016. Disponível em: <http: //linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511311002182>.
- [140] GUDINA, E. J., RODRIGUES, A. I., ALVES, E., et al. "Bioconversion of agro-industrial by-products in rhamnolipids toward applications in enhanced oil recovery and bioremediation", *Bioresource Technology*, v. 177, pp. 87–93, feb 2015. ISSN: 09608524. doi: 10.1016/j.biortech.2014.11. 069. Disponível em: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096085241401671X>.
- [141] KASKATEPE, B., YILDIZ, S., GUMUSTAS, M., et al. "Biosurfactant production by Pseudomonas aeruginosain kefir and fish meal." Brazilian journal of microbiology : *[publication of the* Brazilian Society for Microbiology, v. 46, n. 3, pp. 855–9, 2015.ISSN: 1678-4405. doi: 10.1590/S1517-838246320140727. Disponível em: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid= 2-s2.0-84939487090{&}partnerID=tZ0tx3y1>.

- [142] PRABU, R., KUILA, A., RAVISHANKAR, R., et al. "Microbial rhamnolipid production in wheat straw hydrolysate supplemented with basic salts", *RSC Advances*, v. 5, n. 64, pp. 51642–51649, 2015. ISSN: 2046-2069. doi: 10.1039/C5RA05800G. Disponível em: http://xlink.rsc.org/?DOI=C5RA05800G>.
- [143] RAZA, Z. A., KHAN, M. S., KHALID, Z. M., et al. "Production kinetics and tensioactive characteristics of biosurfactant from a *Pseudo*monas aeruginosa mutant grown on waste frying oils", *Biotechnology Letters*, v. 28, n. 20, pp. 1623–1631, 2006. ISSN: 01415492. doi: 10.1007/s10529-006-9134-3.
- [144] PEREIRA, A. G., PACHECO, G. J., TAVARES, L. F., et al. "Optimization of biosurfactant production using waste from biodiesel industry in a new membrane assisted bioreactor", *Process Biochemistry*, v. 48, n. 9, pp. 1271–1278, sep 2013. doi: 10.1016/j.procbio.2013.06.028. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.06.028>.
- [145] MERCAD, M. E., MANRESA, M. A., ROBERT, M., et al. "Olive oil mill effluent (OOME). New substrate for biosurfactant production", *Bioresource Technology*, v. 43, n. 1, pp. 1-6, 1993. ISSN: 09608524. doi: 10.1016/0960-8524(93)90074-L. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/096085249390074L>.
- [146] SATHI REDDY, K., YAHYA KHAN, M., ARCHANA, K., et al. "Utilization of mango kernel oil for the rhamnolipid production by *Pseudomo*nas aeruginosa DR1 towards its application as biocontrol agent", *Bio*resource Technology, v. 221, pp. 291–299, 2016. ISSN: 18732976. doi: 10.1016/j.biortech.2016.09.041.
- [147] RAZA, Z. A., AHMAD, N., KAMAL, S. "Multi-response optimization of rhamnolipid production using grey rational analysis in Taguchi method", *Biotechnology Reports*, v. 3, pp. 86–94, 2014. ISSN: 2215017X. doi: 10. 1016/j.btre.2014.06.007.
- BANDALA, E. R., PELÁEZ, M. A., SALGADO, M. J., et al. "Degradation of sodium dodecyl sulphate in water using solar driven Fenton-like advanced oxidation processes", *Journal of Hazardous Materials*, v. 151, n. 2-3, pp. 578–584, mar 2008. doi: 10.1016/j.jhazmat.2007.06.025. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.06.025>.
- [149] CHU, W., KWAN, C. "Remediation of contaminated soil by a solvent/surfactant system", *Chemosphere*, v. 53, n. 1, pp. 9–15, oct 2003. doi:

10.1016/s0045-6535(03)00389-8. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/s0045-6535(03)00389-8>.

- [150] WILKEN, L. R., NIKOLOV, Z. L. "Recovery and purification of plant-made recombinant proteins", *Biotechnology Advances*, v. 30, n. 2, pp. 419–433, mar 2012. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.07.020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.07.020>.
- [151] LESSARD, R. R., DEMARCO, G. "The significance of oil spill dispersants". In: Spill Science and Technology Bulletin, v. 6, pp. 59–68, 2000. ISBN: 1353-2561. doi: 10.1016/S1353-2561(99)00061-4.
- [152] JOHANN, S., SEILER, T.-B., TISO, T., et al. "Mechanismspecific and whole-organism ecotoxicity of mono-rhamnolipids", *Science of The Total Environment*, v. 548-549, pp. 155-163, apr 2016. ISSN: 00489697. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.01.066. Disponível em: .">http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.066http: //linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969716300663>.
- [153] CONAMA. "RESOLUÇÃO CONAMA Nº 463, DE 29 de julho de 2014." 2014. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/ legiabre.cfm?codlegi=705>.
- [154] CONAMA. "RESOLUÇÃO CONAMA nº 269, de 14 de setembro de 2000". 2000. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/ legiabre.cfm?codlegi=267>.
- [155] IBAMA. "Dispersantes Químicos". 2018. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/ dispersantes-quimicos{#}lista-produtos-registrados>.
- [156] CETESB. "Água do mar Teste de toxicidade aguda com Artemia. Norma Técnica L5.021". 1991. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov. br/>.
- [157] IBAMA. "INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 1, DE 14 DE JULHO DE 2000". 2000. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/sophia/ cnia/legislacao/IBAMA/IN0001-140700.PDF>.

Anexo A - Dados suplementares

.1 Valores de Tensão Interfacial encontrados para um sistema petróleo:AMS, em diversas condições de temperatura, pressão e salinidade.

Tabela 1: Ensaios realizados durante o planejamento experimental e os valores de TI encontrados em um sistema AMS:petróleo (de densidade média e alta).

Ensaio	Temperatura	Salinidade	Pressão	TI (mN/m)	TI (mN/m)
	(°C)	(g/L)	(Pa)	Médio °API	Alto °API
1	8	34,6	$4,5 \times 10^{6}$	0,60	0,41
2	20	34,6	$4,5\times10^{6}$	$0,\!47$	0,60
3	8	36,4	$4,5 \times 10^6$	$0,\!57$	0,47
4	20	36,4	$4{,}5\times10^{6}$	$0,\!85$	$0,\!56$
5	8	34,6	$1,7 \times 10^7$	$0,\!58$	0,53
6	20	34,6	$1,7 \times 10^7$	0,73	0,64
7	8	36,4	$1,7 \times 10^7$	$0,\!55$	0,51
8	20	36,4	$1,7 \times 10^7$	0,88	0,60
9	4	35,5	$1,1 \times 10^7$	0,77	0,40
10	24	35,5	$1{,}1\times10^7$	1,01	0,70
11	14	34,0	$1,1 \times 10^7$	$0,\!95$	0,63
12	14	37,0	$1{,}1\times10^7$	$0,\!85$	0,48
13	14	35,5	1,0 \times 10^5	0,83	0,49
14	14	35,5	$2,2 \times 10^7$	$0,\!90$	$0,\!56$
15	14	35,5	$1,1 \times 10^7$	$0,\!85$	$0,\!57$
16	14	35,5	$1{,}1\times10^7$	0,84	$0,\!56$
17	14	35,5	$1{,}1\times10^7$	0,84	$0,\!55$
18	14	35,5	$1{,}1\times10^7$	$0,\!85$	$0,\!55$
19	14	35,5	$1{,}1\times10^7$	0,86	0,54
20	14	35,5	$1{,}1\times10^7$	$0,\!87$	0,54

.2 Valores de Tensão Interfacial encontrados para um sistema petróleo: hexano, em diversas condições de temperatura, pressão e salinidade.

Ensaio	Temperatura	Salinidade	Pressão	RML	TI
	(°C)	(g/L)	(Pa)	Concentration	(mN/m)
1	9	34,8	$5,6 \times 10^{8}$	0,14	2,57
2	9	34,8	$5,6 \times 10^{8}$	0,36	1,84
3	9	34,8	$1,7 \times 10^{9}$	$0,\!14$	1,90
4	9	34,8	$1,7 \times 10^9$	0,36	1,59
5	9	36,3	5,6 \times 10^8	$0,\!14$	2,09
6	9	36,3	5,6 \times 10^8	0,36	1,40
7	9	36,3	$1,7 \times 10^9$	$0,\!14$	2,01
8	9	36,3	$1,7 \times 10^9$	0,36	1,37
9	19	34,8	5,6 \times 10^8	$0,\!14$	3,24
10	19	34,8	5,6 \times 10^8	0,36	1,93
11	19	34,8	$1,7 \times 10^9$	$0,\!14$	2,46
12	19	34,8	$1,7 \times 10^9$	0,36	1,71
13	19	36,3	5,6 \times 10^8	$0,\!14$	2,16
14	19	36,3	5,6 \times 10^8	0,36	1,64
15	19	36,3	$1,7 \times 10^9$	$0,\!14$	1,48
16	19	36,3	$1,7 \times 10^9$	0,36	1,15
17	4	35,5	$1,1 \times 10^7$	0,23	1,73
18	24	35,5	$1,1 \times 10^7$	0,23	2,28
19	14	34,0	$1,1 \times 10^7$	0,23	1,85
20	14	37,0	$1{,}1\times10^7$	0,23	1,38
21	14	35,5	$1,0 \times 10^5$	0,23	1,20
22	14	35,5	$2,2 \times 10^7$	0,23	1,36
23	14	35,5	$1,1 \times 10^7$	$0,\!05$	7,93
24	14	35,5	$1,1 \times 10^7$	$0,\!50$	0,88
25	14	35,5	$1{,}1\times10^7$	0,23	1,35
26	14	35,5	$1{,}1\times10^7$	0,23	1,37
27	14	35,5	$1{,}1\times10^7$	0,23	1,27

Tabela 2: Ensaios realizados durante o planejamento experimental e valores de TI encontrados em um sistema AMS: hexano.

.3 ANOVA do planejamento experimental utilizando petróleo de média densidade.

	ANOVA; Var.:TI (mN/m);						
Fator	R-quadrado=0,50117; Adj:,05222						
Fator	3 Fatores, 1 Blocos, 20 Corridas; MS Residual=,0207231						
	DV: TI (mN/m)						
	SS	df	MS	F	р		
Pressão (L)	0,010196	1	0,010196	$0,\!492007$	0,499031		
Pressão (Q)	0,028717	1	0,028717	$1,\!385736$	0,266385		
Salinidade (L)	0,007003	1	0,007003	$0,\!337912$	0,573905		
Salinidade (Q)	$0,\!013381$	1	$0,\!013381$	$0,\!645686$	0,440341		
Temperatura (L)	0,077744	1	0,077744	3,751539	0,081500		
Temperatura (Q)	$0,\!017457$	1	$0,\!017457$	$0,\!842394$	0,380317		
Pressão por Salinidade	0,006541	1	0,006541	0,315629	$0,\!586617$		
Pressão por Temperatura	0,014175	1	0,014175	$0,\!684021$	0,427500		
Salinidade por Temperatura	0,042359	1	0,042359	2,044028	0,183294		
Error	0,207231	10	0,020723				
Total SS	0,415432	19					

Tabela 3: ANOVA referente ao planejamento experimental (simulação de derramamento de petróleo) em um sistema petróleo médio °API:AMS.

.4 ANOVA do planejamento experimental utilizando petróleo de alta densidade.

	ANOVA; Var.:TI (mN/m);						
Fatarag	R-quadrado=0,89331; Adj:,7973						
Fatores	3 fatores, 1 Blocos, 20 Corridas; MS Residual=0,0011128						
	DV: TI (mN/m)						
	SS	df	MS	F	р		
Pressão (L)	0,009928	1	0,009928	8,92205	0,013644		
Pressão (Q)	0,001630	1	0,001630	$1,\!46467$	0,254017		
Salinidade (L)	0,006357	1	0,006357	5,71293	0,037947		
Salinidade (Q)	0,000000	1	0,000000	0,00028	0,986972		
Temperatura (L)	0,071735	1	$0,\!071735$	64,46430	0,000011		
Temperatura (Q)	0,000014	1	0,000014	0,01262	0,912769		
Pressão por Salinidade	0,000767	1	0,000767	$0,\!68891$	$0,\!425907$		
Pressão por Temperatura	0,000714	1	0,000714	$0,\!64137$	0,441826		
Salinidade por Temperatura	0,002034	1	0,002034	1,82787	0,206164		
Erro	0,011128	10	0,001113				
Total SS	0,104304	19					

Tabela 4: ANOVA referente ao planejamento experimental (simulação de derramamento de petróleo) em um sistema petróleo alto °API:AMS.

.5 ANOVA do planejamento experimental utilizando hexano

	ANOVA; Var.:TI (mN/m);						
D. J	R-quadrado=0,71287; Adj:,37789						
Fatores	4 fatores, 1 Blocos, 27 Corridas; MS Residual=1,045717						
	DV: TI (mN/m)						
	SS	df	MS	F	р		
Concentração de RML (L)	$15,\!66442$	1	$15,\!66442$	14,97960	0,002226		
Concentração de RML (Q)	$10,\!45905$	1	$10,\!45905$	10,00180	0,008182		
Pressão (L)	0,34662	1	0,34662	0,33147	0,575433		
Pressão (Q)	0,14439	1	0,14439	0,13808	0,716678		
Salinidade (L)	0,99934	1	0,99934	$0,\!95565$	0,347582		
Salinidade (Q)	0,00006	1	0,00006	0,00006	0,993963		
Temperatura (L)	$0,\!18579$	1	$0,\!18579$	$0,\!17766$	0,680841		
Temperatura (Q)	0,20904	1	0,20904	$0,\!19990$	0,662761		
C. RML por Pressão	0,09412	1	0,09412	0,09000	0,769305		
C. RML por Salinidade	$0,\!05489$	1	0,05489	0,05249	0,822642		
C. RML por Temperatura	0,01825	1	0,01825	0,01745	0,897094		
Pressão por Salinidade	0,02613	1	0,02613	0,02499	0,877026		
Pressão por Temperatura	0,08315	1	0,08315	$0,\!07951$	0,782765		
Salinidade por Temperatura	0,21818	1	0,21818	0,20864	$0,\!655990$		
Erro	12,54860	12	1,04572				
Total SS	43,70409	26					

Tabela 5: ANOVA referente ao planejamento experimental (simulação de derramamento de petróleo) em um sistema hexano:AMS.

Anexo B - Produção acadêmica

Publicações em periódicos durante o período de desenvolvimento da tese.

- DOBLER L *et al.* A study in rhamnolipid production and application: biodiesel by-product as feedstock, crudeproduct toxicity and petroleum interaction. A ser publicado em breve.
- DOBLER L et al. Enhanced rhamnolipid production by Pseudomonas aeruginosa overexpressing estA in a simple medium. PLOS ONE v.12, n.8, p. 1-12, 2017. doi.org/10.1371/journal.pone.0183857
- DOBLER L et al. Rhamnolipids in perspective: gene regulatory pathways, metabolic engineering, production and technological forecasting. New Biotechnology, v. 33, p. 123-135, 2016. doi.org/10.1016/j.nbt.2015.09.005

Capítulos de livros publicados durante o período de desenvolvimento da tese.

- MOURA MHV, DOBLER L et al. Extremophilic Lipases. In: Extremophilic Enzymatic Processing of Lignocellulosic Feedstocks to Bioenergy. 1ed. South Dakota: Springer International Publishing, v. 1, 249-270, 2017. doi.org/10.1007/978-3-319-54684-1
- BREDA GC, DOBLER L et al. Catálise com células Íntegras Aplicações de Lipases por meio de Surface Display. (Chapter 1) In: Ivaldo Itabaiana, Rodrigo O. M. A. de Souza. (Org.). Biocatálise e Biotransformação Fundamentos e Aplicações. 4ed., 2016, v. 1, p. 1-44. ISBN: 858245385X, 9788582453858 https://goo.gl/KoAvtx

Anexo C -Reprodução de trabalhos publicados



Citation: Dobler L, de Carvalho BR, Alves WdS, Neves BC, Freire DMG, Almeida RV (2017) Enhanced rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing *estA* in a simple medium. PLoS ONE 12(8): e0183857. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183857

Editor: Santanu Bose, Washington State University, UNITED STATES

Received: January 19, 2017

Accepted: August 11, 2017

Published: August 24, 2017

Copyright: © 2017 Dobler et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This work is supported by Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (<u>www.anp.gov.br</u>) - LD, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (<u>www.capes.gov.br</u>) - LD, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (<u>www.cnpq.br</u>) - BRC. The funders had no role in study design, data collection and RESEARCH ARTICLE

Enhanced rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing *estA* in a simple medium

Leticia Dobler¹*, Bruna Rocha de Carvalho¹, Wilber de Sousa Alves¹, Bianca Cruz Neves¹, Denise Maria Guimarães Freire²*, Rodrigo Volcan Almeida¹*

1 LaMMP–Laboratório de Microbiologia Molecular e de Proteínas, Chemistry Institute, Federal University from Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, 2 LaBiM–Laboratório de Biotecnologia Microbiana, Chemistry Institute, Federal University from Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

* ledobler@ufrj.br (LD); freire@iq.ifrj.br (DMGF); volcan@iq.ufrj.br (RVA)

Abstract

A modified *Pseudomonas aeruginosa* strain capable of overexpressing the estA gene, an encoding gene for a membrane-bound esterase, was constructed and its rhamnolipid (RML) production was studied. Fermentations using wild-type (WT) and modified *P. aeruginosa* strains were conducted until exhaustion of glycerol in Medium Salt Production, using two different C/N ratios. At a C/N of 83.2, the modified strain produced up to 3.9 times more RMLs than the WT, yielding a maximum concentration of 14.62 g/L RML when measured by HPLC and 22 g/L by the orcinol assay. Cell-free supernatant from the modified strain reduced surface tension to 29.4 mN/m and had a CMC of 240 mg/L and CMD of 56.05. This is the first report on the construction of an estA-based recombinant strain for RML production.

Introduction

Surfactants are surface-active molecules that are able to lower the surface and interfacial tension between phases. Although biosurfactants have several advantages over chemical surfactants, their production is still costly and the production process still requires further optimization. Among the biosurfactants of microbial origin, rhamnolipids (RML) are a very important group of molecules [1–3] with potential application in a variety of industrial sectors, such as the pharmaceutical, cosmetic, food and oil industry [2] with a growing interest during last years as in the scientific literature as in patents [3].

P. aeruginosa is the most widely used microorganism for RML production [1], despite being an opportunistic pathogen. So far, there is a shortage of non-pathogenic strains capable of achieving the same RML production levels as strains from the *Pseudomonas* genus [3,4]. The models and tools for fermentation processes in bioreactors are better described for *P. aeruginosa* PAO1, making this strain a common choice for studies on a bench scale [5].

The discovery of EstA, an esterase anchored on the outer membrane of *P. aeruginosa* PAO1 [6], has attracted attention in a broad field of study. Since its discovery, EstA has attracted growing interest as a cell surface anchor [7–9], which has motivated the determination of its



analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

structure [10]. EstA is classified as an auto-transporter protein, within a family of type V secretion systems, and has been studied in order to elucidate how these proteins can translocate to the outer membrane [11,12].

In 2007, EstA was related to cell motility, biofilm formation, and production of RMLs [13]. Thus far, no further research work has been reported involving this membrane-bound enzyme and RML production.

There are many studies in the literature on the construction of high-yield RML-producing strains. Mostly, they focus on modifying the genes that play a direct role in the RML biosynthesis pathway, such as *rhlA*, *rhlB* and *rhlC*. Very few researchers have invested in unrelated genes, which have also produced good yields of rhamnolipids. Besides the proven relationship between the *estA* gene and RML production, no strain-optimization work has ever focused on *estA* gene expression modification [3].

The present study explores the previously described relationship between EstA and RML production by constructing a *P. aeruginosa* strain that overexpress the gene estA, called *P. aeruginosa*-estA.

The comparison of RML production by wild-type *P. aeruginosa* PAO1 and mutant strains was carried out using different C/N ratios in a simple and low cost medium. Additionally, the RML production by *P. aeruginosa*-estA was studied under different C sources.

Materials and methods

Bacterial strains and culture conditions

The pUCP26-estA plasmid was constructed with the insertion of a full-length *estA* gene from *P. aeruginosa* PAO1 (GenBank® accession number AF005091) at the *Eco*RI and *Bam*HI restriction sites of the shuttle vector pUCP26 [14], kindly provided by Professor Herbert Schweizer from Colorado State University. Thus, a synthetic DNA fragment including the signal peptide and its own ribosomal binding site (Shine-Dalgarno) was inserted under the control of the *lac* promoter. The plasmid was designed *in silico* and later synthesized by Epoch Bio-Labs®. and transformed into *E.coli* JM109 competent cells (Promega) according to the manufacturer's instructions, generating the strain *E.coli* JM109-estA. For the construction of the *P. aeruginosa-estA* strain, the shuttle vector pUCP26estA was transformed into *P. aeruginosa* PAO1 by heat shock, as previously described [15]. All strains were stored at -80°C in sterile solutions of 30 to 50% glycerol (Table 1). With the exception of the RML-producing medium, all liquid cultures were grown in Luria-Bertani (LB) broth (Sigma Aldrich). For the solid medium, 2% bacteriological agar (Vetec®) was added. Bacterial growth for the pre-inoculum was carried out in a liquid medium, in 50 mL conical bottom tubes, with 5 to 10 mL medium, rotation at 170 rpm, and 30°C.

	Characteristics	Reference or Supplier
Strains		
P. aeruginosa PAO1	Wild-Type Amp ^R	[16]
P. aeruginosa-estA	P. aeruginosa PAO1 containing plasmid pUCP26estA	This study
E.coli JM109	endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rk–, mk+), relA1, supE44, Δ (lac-proAB)	Promega®
E.coli JM109estA	E.coli JM109 with pUCP26estA	This study
Plasmids		
pUCP26	Tc ^R , containing Ori from <i>Pseudomonas</i> , Ori from <i>E. coli</i>	[14]
pUCP26estA	pUCP26 containing the full-length estA from P. aeruginosa PAO1, including its native ribosomal-binding site	This study

Table 1. Strains and plasmids used at this study.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183857.t001

P. aeruginosa-estA fermentation with different carbon sources

Analyses of RML production by *P. aeruginosa*-estA were performed using seven different variations of MSP medium, consisting of: potassium phosphate buffer, magnesium sources, and a combination of carbon and nitrogen sources, as shown in Table 2.

The masses of the carbon and nitrogen sources were calculated to achieve a C/N ratio of 83. All fermentations were carried out in duplicate at a C/N ratio of 83.2 (mol/mol). Final culture volumes of 100 mL were placed in 250 mL Erlenmeyer flasks for incubation. All fermentations were conducted at 30° C, with orbital agitation at 170 rpm. For all the experiments carried out using *P. aeruginosa-estA*, tetracycline was added to a final concentration of 100 µg/mL.

Comparative analysis of P. aeruginosa PAO1 and P. aeruginosa-estA

For RML production, the transformed *P. aeruginosa*-estA and the wild strain *P. aeruginosa* PAO1 were inoculated in 1L flasks containing 300 mL of a growth medium consisting of 30.0 g/L glycerol, 1.4 g/L NaNO₃, 7.0 g/L K₂HPO₄, 3.0 g/L KH₂PO₄, 0.2 g/L MgSO₄.7H₂O, 5 g/L soy peptone, and 5 g/L yeast extract. The cells were harvested at the exponential phase and inoculated at an initial cell concentration of 0.85 g/L (dry cell) in a 1 L flask containing 300 mL of two different fermentation media with different C/N ratios: MSP medium (7.0 g/L K₂HPO₄, 3.0 g/L KH₂PO₄, 0.2 g /L MgSO₄.7H₂O) at concentrations of 4.75 g/L of NaNO₃ and 30 g/L of glycerol, resulting in a medium with a C/N ratio of 17.5 (mol/mol); and 1.4 g/L of NaNO₃ and 42 g/L glycerol, resulting in a C/N of 83.2 (mol/mol). Fermentations were conducted until exhaustion of glycerol, and samples were withdrawn for biomass and glycerol concentration analyses, surface tension measurements, and the calculation of the critical micelle concentration (CMC).

The choice of 17.5 and 83.2 as the C/N ratios was based on the reports of Tavares et al. [17] and Santos et al. [18].

All the fermentations were conducted at 30° C with 170 rpm orbital agitation and at a dark room. For all the experiments carried out using *P. aeruginosa-estA*, tetracycline was added to a final concentration of 100 µg/mL.

Bacterial cell quantification

A standard curve of cell growth was plotted using absorbance at 600 nm against dry mass concentration (g/L).

Esterase activity assay

The wild types and constructed strains were tested for their esterase activity using 4-methylumbelliferyl-heptanoate (MUH) as a substrate. Activity in MUH was measured using a fluorometer, as described by Prim et al. [19], at 54.8°C. Three milliliter aliquots of 50 mM sodium

C source		N source		K ₂ HPO ₄	KH₂PO₄	MgSO₄.7H₂O			
Glycerol	42.00	Sodium nitrate	1.40	7.00	3.00	0.20			
Glycerol	42.00	Ammonium sulfate	1.09	7.00	3.00	0.20			
Olive oil	21.53	Sodium nitrate	1.40	7.00	3.00	0.20			
Soy oil	21.50	Sodium nitrate	1.40	7.00	3.00	0.20			
Oleic acid	21.45	Sodium nitrate	1.40	7.00	3.00	0.20			
Ethanol	31.50	Sodium nitrate	1.40	7.00	3.00	0.20			
Glucose	41.05	Sodium nitrate	1.40	7.00	3.00	0.20			

Table 2. Composition of the production media (g/L).

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183857.t002

phosphate buffer pH = 8, were added to 12 μ L of a MUH solution (25 mM solubilized in ethylene glycol monomethyl ether). To start the reactions, 10 to 50 μ L cell suspension was added. The *P. aeruginosa* cell suspension was prepared as described in section 2.1. (pre-inoculum).

The production of 4-methylumbelliferone was measured by fluorescence ($\lambda ex = 323$ nm; $\lambda em = 448$ nm) under initial reaction conditions. Standard curves were plotted using solutions that varied from 82.8 to 1225.00 μ M MUF (4-methylumbelliferyl) solubilized in 50 mM sodium phosphate buffer pH = 8. All experiments were analyzed in triplicate (n = 3). One unit of activity was defined as the amount of enzyme required to produce 1 μ mol MUF per minute under the test conditions, and was expressed in U per g of dry mass. The natural degradation of the substrate by the action of temperature over time was monitored and discounted for activity calculations.

Determination of RML and glycerol concentration

The quantification of RML was assessed by the indirect quantification of rhamnose. Rhamnose was quantified by the addition of 100 μ L of a 10 M sulfuric acid solution to 1 ml supernatant samples, and the hydrolysis generating rhamnose and fatty acid was conducted at 100°C for 4 hours. The mixture was neutralized with 10 M NaOH, filtered with a 0.22 μ m filter, and analyzed using high performance liquid chromatography (HPLC). An Aminex HPX-87H column (BioRad®) was used for the HPLC assays, using 5 mM acid sulfuric as the mobile phase at a rate of 0.6 mL/min and oven temperatures of 42°C to assess rhamnose and 68°C to assess glycerol. Some samples were also quantified by the orcinol assay [20,21], for the purposes of comparison with data in the literature. The procedure was followed as described by Koch et al. [21], with some modifications: 200 μ L samples of culture supernatant were mixed with 1.8 mL orcinol reagent containing 53% acid sulfuric and 0.19 orcinol. The mixture was incubated at 80°C for 30 minutes and absorbance at 421 nm (rhamnose) was measured in a spectrophotometer (Pharmacia). For the conversion of rhamnose to rhamnolipid, a factor of 2.5 was used, on the assumption that 1 g rhamnose corresponds to 2.5 g rhamnolipid mixture [13,22,23].

Thin-layer chromatography (TLC)

The RML mixture produced in each fermentation was analyzed by thin-layer chromatography (TLC), as described by Wilhelm et al. [13], with some modifications. Two microliters of each fermentation supernatant was applied 1cm up from the bottom of the silica sheet. Silica 60 gel aluminum sheets were used (Merck®, Germany). A mobile phase consisting of chloroform: methanol:glacial acetic acid (65:15:02) was added until 0.8 cm of the standing layer was reached. After the layer was dried, it was stained for 10 minutes in a chamber at 100°C using a buffer of a stained reagent, containing 75 mg orcinol, 4.2 mL concentrated sulfuric acid, and 21 mL deionized water, as reported by Tielen et al. [23]. The assay was done in duplicate.

n-hexadecane emulsion

Two milliliters of final fermentation supernatant (free of glycerol) was mixed vigorously with 2 mL n-hexadecane (reference for fuel mixtures/cetane number 100) for 2 minutes. The mixture was left to stand and its emulsion formation capability was observed after 24 hours.

Surface tension assay, CMC and CMD assessment

Surface tension was determined using the DSA 100S Drop Shape Analyzer (Krüss), as described by Song and Springer (1996). To assess CMC (critical micelle concentration) and CMD (critical micelle dilution), several dilutions were made of the cell-free fermented


Fig 1. Esterase activity of wild type and recombinant strain. Recombinant strain was created by the insertion of pUCP26-estA plasmid, that contains *estA* gene, for encoding an outer membrane esterase. Esterase activities for the wild type *P. aeruginosa* PAO1 and the recombinant *P. aeruginosa*-estA were carried out using MUH (C7) as a substrate, at 30°C and pH = 7. A Student's t-test was performed and it is affirmed that the data are significantly different from each other (p<0.5).

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183857.g001

medium, from 0 to 1000. All the analyses were performed with the last-day fermentation sample, free of glycerol, as this compound could interfere with drop formation in the surface tension assay.

Results and discussion

Esterase expression in P. aeruginosa

Recombinant EstA expression in *P. aeruginosa* was confirmed by the 13-fold increase of esterase activity per gram of cell when the wild type (32.6 mU) was compared with the modified strain (427.8 mU) (Fig 1).

RML production by P. aeruginosa-estA in different carbon sources

In order to evaluate the production of the recombinant strain in different carbon sources, a comparative analysis of the RML production of *P. aeruginosa-estA* was performed in seven different MSP media with different carbon or nitrogen sources (Fig 2). The fermentation using sodium nitrate as a nitrogen source and glycerol as a carbon source had the highest yield,



Fig 2. RML production using different carbon and nitrogen sources. Analyses of RML production by *P. aeruginosa*-estA were performed using several variations of MSP medium (glycerol, olive oil, soy oil, oleic acid, ethanol and glucose as carbon source and sodium nitrate and ammonium sulfate as nitrogen sources). Figure presents RML production after 24 (light gray) and 72 hours (dark gray). All cultives were conducted at C/N ratio of 83.2 (mol/mol).

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183857.g002

reaching 5.16 g/L RML in the first 72 hours. Ammonium N is assimilated faster than N from nitrate, as nitrate suffers dissimilatory nitrate reduction to ammonium. Santos et al., [18] discussed the participation of nitrogen in the production of RML by *Pseudomonas aeruginosa* PA1. As RML production is accentuated under nitrogen-limited conditions, the use of nitrate could be seen as a way of simulating such conditions, where the production of this biosurfactant is known to be higher.

Benicasa et al. [24] produced RML, under batch cultivation, using *Pseudomonas aeruginosa* LBI and soapstock as the sole carbon source. The soapstock was composed mainly of linoleic acid (50%) and oleic acid (25%), and reached a maximum rhamnolipid concentration of 15.9 g/L at 54h (productivity of 29.4mgRML/L.h) using the source at an initial concentration of 2.5%.

For any future research designed to investigate the *in-vivo* function of EstA, it will be important to study how a negative mutant for *estA* would behave in glycerol, triglyceride, and fatty acids. Also, it is broadly known that different oils used in fermentation will result in different congeners of RML [25], yielding different surface physicochemical properties.

Matsufuji et al. [26] produced up to 32 gRML/L using *Pseudomonas aeruginosa* IFO 3924 (a non-modified strain) in 7 days of cultivation fed with ethanol 55.3 g/L, achieving one of the highest final RML concentrations reported in the literature. However, this result was obtained only when fed-batch strategy was used. In a simple batch (with 30g/L ethanol in a complex media) the authors obtained 3.7 gRML/L. Santos et al. (18) using *Pseudomonas aeruginosa* PA1 obtained 2 gRML/L in a medium containing ethanol (30 g/L) and yeast extract (5 g/L), as carbon and nitrogen source respectively. Unfortunately, *P. aeruginosa*-estA was not able to produce RMLs using ethanol as a carbon source in the simple medium used in this research.

Likewise, glucose, one of most commonly used substrates for RML production [4], did not yield high amounts of RML. Wittgens et al. [4] produced up to 1.5 g/L RML, measured by the orcinol method. They used 5–10 g/L of glucose in the culture medium, while in our study the medium consisted of 41.05 g/L in order to keep the same C/N ratio for all the carbon sources. The low RML production and higher substrate concentration could be explained by the inhibition of the cell by the higher concentration of glucose.

Thus, we chose the low-cost byproduct from biodiesel refining, glycerol, as the best carbon source (together with sodium nitrate as a nitrogen source) for RML production, using the new engineered strain, *P. aeruginosa-estA*.

Production of RML by *P. aeruginosa-estA* and *P. aeruginosa* PAO1 in MSP-glycerol medium

The comparative analysis of the modified and wild-type strains was performed in two different MSP media, using 30 and 42 g/L glycerol as the sole carbon source, at a C/N ratio of 17.5 and 83.2 (mol/mol), respectively. These fermentations were carried out in 300 mL MSP culture medium, and RML yields were assessed by HPLC.

No difference was found between the strains in terms of their production when C/N = 17.5 (Fig 3A and 3B).

However, a difference of up to 290% was observed in RML when C/N = 83.2 (Fig 3C and 3D). Under these conditions, the *P. aeruginosa-estA* transforming strain was able to produce 14.6 g/L RML and 76.0 mg/L.h of productivity on the 8th fermentation day, while the wild type produced 3.7 g/L RML and 19.3 mg/L.h. The maximum RML concentration for the wild strain was attained only on the 16th day, when 5.5 g/L of RML and a productivity of 14.3 mg/L.h was obtained. The pH at the final day were 7±0.2 to all conditions. The modified strain exhausted the glycerol by the 12th day, while the wild strain exhausted the glycerol by the 17th day. The



Fig 3. Kinetic of rhamnolipid production. Wild type and recombinant strains were used at cultives under MSP media in two different C/N ratios. Glycerol was used at carbon source and sodium nitrate as nitrogen source. RML production and glycerol consumption was accessed by liquid chromatography. General data on cell (rhombus), rhamnolipid (triangle), and glycerol (square) concentrations (g/L) are shown over time for A) wild-type strain (*P. aeruginosa* PAO1) at C/N = 17.5; B) modified strain (*P. aeruginosa*-estA) at C/N = 17.5; C) wild-type strain (*P. aeruginosa* PAO1) at C/N = 83.2; D) modified strain (*P. aeruginosa*-estA) at C/N = 83.2.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183857.g003

cell viabilities were maintained during these periods. The depletion of nitrogen probably occurred at the firsts days of culture, inhibiting the cell growth. In the other hand, as soon the glycerol keeps available, the existing cell can keep their availability and produce rhamnolipids

Table 3 compares all four fermentation conditions and the main fermentation parameters. The modified strain did not just produce more RML by time (productivity), but had a higher RML yield per biomass ($Y_{RLM/X}$) for a C/N ratio of 83.2. Also, the mutant strain was able to better use its carbon source to produce RML ($Y_{RLM/S}$) under the same conditions. The opposite was observed at C/N = 17.5, where the production of the wild-type and constructed strain had similar production by substrate consumption.

These results show that the RML production by *P. aeruginosa*-estA strain is strongly influenced by the C/N ratio and do not often generate higher RML titer, as can be directly inferred in Whilhelm et al. (2007) (13).

The low productivity of the wild strain at C/N = 17.5 could be because the energy of the carbon source was channeled into cell growth ($Y_{x/s}$), which reached 0.113 (g/g), while under the other condition it reached 0.068.As orcinol overestimates the RML concentration in a sample by recording other hexoses, it is difficult to compare the results with the data in the literature [3]. As such, samples of both the last day of fermentation and the day with maximum production were measured by orcinol assay to allow a better comparison. It was observed that the productivity of our modified strain was really higher than that of the other modified strains

Table 3. Comparative biotechnological bioprocess parameters for four fermentations, using *P. aeruginosa* PAO1 and *P. aeruginosa-estA* and two different C/N ratios for the MSP medium (83.2 and 17.5 mol/mol). All data calculated for the day when production reached its maximum RML concentration.

Strain	C/N ratio	Time (day)	Max. Concentration (gRML/L)	Productivity (mgRML/h.L)	Y _{RML/x (g/g)}	Y _{RML/s (g/g)}	Y _{x/s (g/g)}
PAO1	83.2	16	5.5	14.3	3.89	0.188	0.048
PAO1	17.5	4	6.6	68.8	2.66	0.300	0.113
estA	83.2	8	14.6	76.0	6,55	0.377	0.058
estA	17.5	6	6.5	45.0	3,45	0.235	0.068

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183857.t003

Table 4. Comparison between the transformed strains with the best production or productivity already reported in the literature and the results attained in this study, including one of best results achieved with a wild strain reported in the literature, for reference purposes.

Microorganism	Peculiarity	Maximum RLM (g/L)	Productivity (mg/L.h)	Carbon source(s)	Vf/Vm	Quantification Method	Reference
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Reference–wild type strain with great production	39	433	Sunflower oil (250g/L)	42L/19L	HPLC-UV/vis	[5]
P. aeruginosa- estA	estA overexpression	14.6	76.0	Glycerol (42g/L)	1L/ 300mL	HPLC	This work
P. aeruginosa- estA	estA overexpression	22.0	114.6	Glycerol (42g/L)	1L/ 300mL	Orcinol	This work
P. aeruginosa JC	vhb expression.	8.373	349	Glucose (10g/L) + Yeast extract (5g/L)	150/ 50mL	Phenolsulphuric	[27]
<i>P. putida</i> KCTC 1067 (pNE2)	<i>rhIA</i> and <i>rhIB</i> co-expression as an operon, clustered with <i>rhIR</i> and <i>rhII</i> .	7.3	101.39	Soybean oil (20g/ L)	NI	Orcinol	[33]
P. aeruginosa JC	vhb expression.	13.3	185	Raw cheese whey (500g/L)	250mL/ 50mL	Phenolsulphuric	[28]

NI-Not Informed

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183857.t004

reported in the literature, as determined by both procedures (orcinol assay and HPLC analysis). In Table 4, we compare the results of the present findings with the main modified strains already reported in the literature [3], by both orcinol assay and HPLC analysis.

Our mutant strain reached a maximum of 14.6 g/L RLM when rhamnose was assessed by HPLC and 22g/L when the traditional orcinol assay was carried out. These concentrations are higher than any RML mutant reported in the literature [3].

Erenler and Kahraman [27] constructed the engineered strain *P. aeruginosa* JC, which is capable of heterologously expressing the *vhb* gene, which codes hemoglobin of the bacterium *Vitreoscilla*. The idea was to circumvent the difficulties generated by the oxygenation of the medium, which generates too much foam. By the expression of hemoglobin, the oxygen could be diluted at a higher rate in the medium and be more easily accessible for cell metabolism. The group achieved production of 8.373 g/L and productivity of 349 mg/L.h (measured by the phenol-sulfuric assay). The bioprocess presented by the group achieved high productivity, close to the most widely accepted model in the literature [5]. However, the low final RLM concentration is not suitable for good bioprocess design, because it generates costs in downstream processes. Also, production was carried out in a low volume (50 mL) and using a fairly expensive medium.

The same group later used the same strain with a raw, low-cost medium based on raw cheese whey, achieving a good concentration of RML (13.3 g/L), but the work still has some shortfalls. The concentration of waste in the culture medium was high (500 g/L), and productivity was lower than in the earlier study (185 mg/L.h). Also, the volume of production was still not scaled up (50 mL) [28].

To our knowledge, no engineered strain has achieved as high a final RML concentration as the ones reported for wild strains. Giani et al. [29] claimed a patent with maximum production of 112 g/L, which is the highest production reported in the literature. As no further work has been published since, the model described by Müller et al. [5,30] is recognized as the best for RML production.

Müller et al. [5] declare maximum production of 39 g/L and productivity of 433 mg/L.h using *P. aeruginosa* PAO1. However, these results were obtained in a bioreactor with control of temperature, pH, pO2 and foam. Also, it was applied a high amount of feedstock, 250 g/L of



Fig 4. Thin-layer chromatography. In order to analyze the mono-dirhamnolipid ratio, a TLC was carried out by the application of 2µL of the final medium supernatant. From left to right: *P. aeruginosa* PAO1, C/N ratio = 17.5; *P. aeruginosa* PAO1, C/N ratio = 83.2; *P. aeruginosa*-estA, C/N ratio = 17.5; *P. aeruginosa*-estA, C/N ratio = 83.2; and a 5g/mL rhamnose standard solution.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183857.g004

sunflower oil, a component more expensive than glycerol. Furthermore, despite the high final titer obtained by Müller et al. [5] the yield ($Y_{P/X}$) was 2.02 gRML/g dry cell, while we present a yield of 6.55 gRML/g dry cell (Table 3). As the strain constructed in this research produced 290% more RML than *P. aeruginosa* PAO1, this leads us to believe that the present strain has significant potential for industrial applications.

Characterization of RML produced

For the partial characterization of the RML specimens produced by the wild and mutated strains in different C/N ratio media, the RML mixture obtained on the last day of fermentation (free of glycerol) was studied by TLC, and its capability to emulsify n-hexadecane in water and its surface tension were measured.

TLC was performed with the aim of observing whether the ratio of mono and di-RML was altered when EstA was overexpressed. Unlike Wilhelm et al. [13] and Tielen et al. [23], the overexpression of *estA* gene did not appear to be affected by the mono and di-RML ratio (Fig 4).

All the supernatants were able to fully emulsify n-hexadecane and keep the emulsification stable for more than a month. When the supernatants were diluted 1000 times, a small volume of unemulsified oil was observed at the top of the flask for the wild type, but not for the



Fig 5. n-Hexadecane emulsion test. Last-day fermentation supernatant (free of glycerol) was diluted 1000 times and vigorously vortexed with equal parts of n-hexadecane, and left to stand for 24 hours. Then, the capacity of emulsifying the alkane was analyzed. From left to right: *P. aeruginosa* PAO1, with a C/N ratio of 17.5 and 83.2, then, *P. aeruginosa*-estA with a C/N ratio of 17.5 and 83.2 (mol/mol), respectively.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183857.g005

modified strain (Fig 5), which confirms the higher concentration and higher emulsifying capability of the supernatant from the recombinant *P. aeruginosa-estA*.

For the 83.2 medium, the mutant *P. aeruginosa-estA* produced a mixture that was able to reduce the surface tension of water (75 mN/m) to 29.33 mN/m and presented a CMC of 140 mg/L, and a CMD of 56.02. These values are compatible with the findings for RMLs in the literature, as reviewed by Lourith et al. [31]. Mendes et al. [32] produced RMLs under similar conditions, but using *P. aeruginosa* PA1, and found a CMC of 198 mg/L on the 7th fermentation day. However, glycerol consumption was not observed, and it is possible that there was some left over in the sample, which could have decreased the CMC value. The authors showed that after a purification step, the CMC of the RMLs produced was 25 mg/L, highlighting their promising use as a biosurfactant.

Conclusions

In the present work, overexpression of *estA* gene, an outer-membrane esterase, was performed for the first time with the aim of achieving enhanced levels of RML production. It was shown that depending of the conditions, this strain was able to produce higher quantities of RML than the widely used wild-type strain *P. aeruginosa* PAO1. It was shown that both strains could produce significant quantities of RMLs using a low-cost medium, MSP-glycerol, which consists of just five simple, affordable components, including glycerol. No trace solution was used to increase productivity, as is often reported in the literature, and this medium was found to be one of the simplest and least costly media for RML production. A brief characterization of the molecules produced was performed, and presented surfactant properties compatible with those of interest to industry, such as the capacity to lower the surface tension of water and to emulsify oil (n-hexadecane). When compared with the bioprocesses described in the literature that use engineered strains, the strain constructed in this study showed great promise for further studies and its scaled up production for use in industry.

Acknowledgments

The authors are grateful to Professor Herbert Schweizer from Colorado State University for providing the pUCP26 vector, ANP (Agência Nacional de Petróleo) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for their financial support, the engineer Antônio Carlos de Oliveira Machado for his help with the CMC calculus, and Fábio Diniz Vale for his help with the TS/CMC measurements. All authors are disclose to any conflict of interest.

Author Contributions

Conceptualization: Leticia Dobler, Bianca Cruz Neves, Denise Maria Guimarães Freire, Rodrigo Volcan Almeida.

Formal analysis: Leticia Dobler.

Funding acquisition: Bianca Cruz Neves, Denise Maria Guimarães Freire, Rodrigo Volcan Almeida.

Investigation: Leticia Dobler, Bruna Rocha de Carvalho.

Methodology: Leticia Dobler, Wilber de Sousa Alves, Bianca Cruz Neves, Denise Maria Guimarães Freire, Rodrigo Volcan Almeida.

Project administration: Leticia Dobler, Rodrigo Volcan Almeida.

Resources: Bianca Cruz Neves, Denise Maria Guimarães Freire, Rodrigo Volcan Almeida.

Supervision: Bianca Cruz Neves, Denise Maria Guimarães Freire, Rodrigo Volcan Almeida.

Visualization: Leticia Dobler, Rodrigo Volcan Almeida.

Writing - original draft: Leticia Dobler.

Writing – review & editing: Bianca Cruz Neves, Denise Maria Guimarães Freire, Rodrigo Volcan Almeida.

References

- Sekhon KK, Rahman PKSM. Rhamnolipid biosurfactants–Past, Present and future scenario of global market. Front Microbiol. 2014; 5: 1–7. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00001
- Rikalović MG, Vrvić MM, Karadžić IM. Rhamnolipid biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa*: From discovery to application in contemporary technology. J Serbian Chem Soc. 2015; 80: 279–304. <u>https:// doi.org/10.2298/JSC140627096R</u>
- Dobler L, Vilela LF, Almeida RV, Neves BC. Rhamnolipids in perspective: gene regulatory pathways, metabolic engineering, production and technological forecasting. N Biotechnol. 2016; 33: 123–135. https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.09.005 PMID: 26409933
- Wittgens A, Tiso T, Arndt TT, Wenk P, Hemmerich J, Müller C, et al. Growth independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic *Pseudomonas putida* KT2440. Microb Cell Fact. BioMed Central Ltd; 2011; 10: 80. https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-80 PMID: 21999513
- Müller MM, Hörmann B, Syldatk C, Hausmann R. Pseudomonas aeruginosa PAO1 as a model for rhamnolipid production in bioreactor systems. Appl Microbiol Biotechnol. 2010; 87: 167–174. <u>https://doi.org/10.1007/s00253-010-2513-7</u> PMID: 20217074
- Wilhelm S, Tommassen J, Jaeger KE. A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 1999; 181: 6977–6986. PMID: 10559163
- Binder U, Matschiner G, Theobald I, Skerra A. High-throughput Sorting of an Anticalin Library via EspPmediated Functional Display on the Escherichia coli Cell Surface. J Mol Biol. Elsevier Ltd; 2010; 400: 783–802. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.05.049 PMID: 20630471
- Becker S, Theile S, Heppeler N, Michalczyk A, Wentzel A, Wilhelm S, et al. A generic system for the Escherichia coli cell-surface display of lipolytic enzymes. FEBS Lett. 2005; 579: 1177–1182. https://doi. org/10.1016/j.febslet.2004.12.087 PMID: 15710409
- Becker S, Höbenreich H, Vogel A, Knorr J, Wilhelm S, Rosenau F, et al. Single-Cell High-Throughput Screening To Identify Enantioselective Hydrolytic Enzymes. Angewande Chemie. 2008; 47: 5085– 5088. https://doi.org/10.1002/anie.200705236 PMID: 18512207
- van den Berg B. Crystal Structure of a Full-Length Autotransporter. J Mol Biol. Elsevier Ltd; 2010; 396: 627–633. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.12.061 PMID: 20060837
- Fairman JW, Noinaj N, Buchanan SK. The structural biology of b -barrel membrane proteins: a summary of recent reports. Curent Opnion Struct Biol. 2011; 21: 523–531. https://doi.org/10.1016/j.sbi. 2011.05.005 PMID: 21719274
- Henderson IR, Navarro-garcia F, Desvaux M, Fernandez RC, Ala'Aldeen D. Type V Protein Secretion Pathway: the Autotransporter Story. Microbiol Mol Biol Rev. 2004; 68: 692–744. https://doi.org/10. 1128/MMBR.68.4.692-744.2004 PMID: 15590781
- Wilhelm S, Gdynia A, Tielen P, Rosenau F, Jaeger KE. The autotransporter esterase EstA of *Pseudo-monas aeruginosa* is required for rhamnolipid production, cell motility, and biofilme formation. J Bacteriol. 2007; 189: 6695–6703. https://doi.org/10.1128/JB.00023-07 PMID: 17631636
- West SEH, Schweizerb HP, Dall C, Sample AK, Runyen-Janecky LJ. Construction of improved *Escheri-chia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC 18 / I 9 and sequence of the region required for their replication in Pseudomonas aeruginosa. Gene. 1994; 128: 81–86.
- Choi KH, Kumar A, Schweizer HP. A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudo-monas aeruginosa* cells: Application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. J Microbiol Methods. 2006; 64: 391–397. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.06.001 PMID: 15987659
- Holloway BW, Krishnapillai V, Morgan a F. Chromosomal genetics of *Pseudomonas*. Microbiol Rev. 1979; 43: 73–102. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/111024%5Cnhttp://www. pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC281463 PMID: 111024

- Tavares LFD, Silva PM, Junqueira M, Mariano DCO, Nogueira FCS, Domont GB, et al. Characterization of rhamnolipids produced by wild-type and engineered *Burkholderia kururiensis*. Appl Microbiol Biotechnol. 2013; 97: 1909–1921. https://doi.org/10.1007/s00253-012-4454-9 PMID: 23053103
- Santos AS, Sampaio APW, Vasquez GS, Santa Anna LM, Pereira N, Freire DMG. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of rhamnolipids by a strain of *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Biochem Biotechnol. 2002; 98–100: 1025–1035. PMID: 12018227
- Prim N, Sánchez M, Ruiz C, Pastor FIJ, Diaz P. Use of methylumbeliferyl-derivative substrates for lipase activity characterization. J Mol Catal B Enzym. 2003; 22: 339–346. <u>https://doi.org/10.1016/ S1381-1177(03)00048-1</u>
- Chandrasekaran E V., Bemiller JN. Constituent analyses of glycosaminoglycans. Methods in Carbohydrate Chemistry. 1980. p. 372.
- Koch a. K, Kappeli O, Fiechter a., Reiser J. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. J Bacteriol. 1991; 173: 4212–4219. 134212–08\$02.00/0 PMID: <u>1648079</u>
- Ochsner UA, Fiechter A, Reiser J. Isolation, characterization, and expression in Escherichia coli of the *Pseudomonas aeruginosa* rhIAB genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. J Biol Chem. 1994; 269: 19787–19795. PMID: 8051059
- Tielen P, Rosenau F, Wilhelm S, Jaeger KE, Flemming HC, Wingender J. Extracellular enzymes affect biofilm formation of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology. 2010; 156: 2239–2252. https:// doi.org/10.1099/mic.0.037036-0 PMID: 20360178
- 24. Benincasa M, Contiero J, Manresa MA, Moraes IO. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aerugi*nosa LBI growing on soapstock as the sole carbon source. J Food Eng. 2002; 54: 283–288.
- Abdel-Mawgoud AM, Lépine F, Déziel E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. Appl Microbiol Biotechnol. 2010; 86: 1323–1326. <u>https://doi.org/10.1007/s00253-010-2498-2</u> PMID: 20336292
- Matsufuji M, Nakata K, Yoshimoto A. High production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* growing on ethanol. 1997; 19: 1213–1215.
- Kahraman H, Erenler SO. Rhamnolipid Production by Pseudomonas aeruginosa Engineered with the Vitreoscilla Hemoglobin Gene. Appl Biochem Microbiol. 2012; 48: 188–193. <u>https://doi.org/10.1134/S000368381202007X</u>
- Colak AK, Kahraman H. The use of raw cheese whey and olive oil mill wastewater for rhamnolipid production by recombinant *Pseudomonas aeruginosa*. Environ Exp Biol. 2013; 11: 125–130.
- Giani C, Meiwes J, Wullbrandt D. α-I-rhamnosidase for obtaining rhamnose, a process for its preparation and its use. US; US5641659 A, 1997.
- Müller MM, Hörmann B, Kugel M, Syldatk C, Hausmann R. Evaluation of rhamnolipid production capacity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in comparison to the rhamnolipid over-producer strains DSM 7108 and DSM 2874. Appl Microbiol Biotechnol. 2011; 89: 585–592. https://doi.org/10.1007/s00253-010-2901-z PMID: 20890599
- Lourith N, Kanlayavattanakul M. Natural surfactants used in cosmetics: glycolipids. J Cosmet Sci. 2009; 31: 255–261. https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2009.00493.x PMID: 19496839
- Mendes AN, Filgueiras LA, Pinto JC, Nele M. Physicochemical Properties of Rhamnolipid Biosurfactant from Pseudomonas aeruginosa PA1 to Applications in Microemulsions. J Biomater Nanobiotechnol. 2015; 6: 64–79.
- Cha M, Lee N, Kim MM, Kim MM, Lee S. Heterologous production of Pseudomonas aeruginosa EMS1 biosurfactant in *Pseudomonas putida*. Biosource Technol. 2008; 99: 2192–2199. https://doi.org/10. 1016/j.biortech.2007.05.035 PMID: 17611103



Rhamnolipids in perspective: gene regulatory pathways, metabolic engineering, production and technological forecasting

Leticia Dobler, Leonardo F. Vilela, Rodrigo V. Almeida and Bianca C. Neves

Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Rhamnolipids have emerged as a very promising class of biosurfactants in the last decades, exhibiting properties of great interest in several industrial applications, and have represented a suitable alternative to chemically-synthesized surfactants. This class of biosurfactants has been extensively studied in recent years, aiming at their large-scale production based on renewable resources, which still require high financial costs. Development of non-pathogenic, high-producing strains has been the focus of a number of studies involving heterologous microbial hosts as platforms. However, the intricate gene regulation network controlling rhamnolipid biosynthesis represents a challenge to metabolic engineering and remains to be further understood and explored. This article provides an overview of the biosynthetic pathways and the main gene regulatory factors involved in rhamnolipid production within *Pseudomonas aeruginosa*, the prototypal producing species. In addition, we provide a perspective view into the main strategies applied to metabolic engineering and biotechnological production.

Contents

123
124
126
126
127
127
127
129
129
130
132
133
133
133

Introduction

Biosurfactants have emerged as a promising alternative to their chemically synthesized counterparts, for being environmentally

Corresponding author:bcneves@iq.ufrj.br Neves, B.C. (bcneves@iq.ufrj.br)

friendly and having remarkable physicochemical properties [1,2]. Commonly obtained from renewable sources, these compounds are usually produced by microorganisms and are most commonly grouped according to their chemical structures, as glycolipids, phospholipids, lipoproteins and polymers [3]. The majority of

REVIEW



Mono- and di-rhamnolipids from P. aeruginosa. General structures of typical rhamnolipids.

these compounds are either anionic or neutral [4] and the most extensively studied are glycolipids. They show many advantages in terms of biodegradability, toxicity, structural diversity, surfactant activity, and stability in extremes of temperature, pH, and salt concentration [5,6].

Rhamnolipids from Pseudomonas aeruginosa, an opportunistic pathogen, comprise a category of biosurfactants that has been the focus of many research groups, and several structural homologs have been identified [7]. The most abundant species of Rhamnolipids are α-L-rhamnopyranosyl-α-L-rhamnopyranosylβ-hydroxydecanoyl-β-hydroxydecanoate (Rha-Rha-C10-C10), α -L-rhamnopyranosyl- α -L-rhamnopyranosyl- β -hydroxydecanoate (Rha-Rha-C10), along with mono-rhamnolipid homologs Rha-C10-C10 and Rha-C10 (Fig. 1; [3]). P. aeruginosa can produce rhamnolipids from substrates including C11 and C12 alkanes, succinate, pyruvate, citrate, fructose, glycerol, olive oil, glucose and mannitol [8]. The design and structure of the fermenter, pH, nutrient composition, substrate and temperature influence the composition and yield of rhamnolipids [8]. The role of rhamnolipids in bacterial cell physiology remains unclear, although many studies have suggested that they might act as virulence factors in P. aeruginosa infections [9], affecting biofilm formation [10,11] and swarming motility [12,13]. In addition, this versatile group of surface-active molecules are known for their antimicrobial activities [14], ability to increase aqueous solubility and biodegradation of organic compounds and complex heavy metal contaminants [4,6,15].

Although rhamnolipid production by *P. aeruginosa* has been extensively studied, the knowledge has not been sufficient to provide a satisfactory basis for the development of overproducing strains, which would allow for more competitive commercial values of this bioproduct. Briefly, the biosynthesis of rhamnolipids includes three major steps. The precursors, namely β -hydroxyalkanoyl- β -hydroxyalkanoyl-ACP (HAA-ACP) and dTDP-L-rhamnose, were shown to be synthesized *de novo* during the first two steps [8,16]. Two special rhamnosyltransferases sequentially catalyze the condensation of the precursors to mono- and di-rhamnolipids. In addition, rhamnolipids biosynthesis in *P. aeruginosa* is controlled by environmental signals and quorum sensing (QS) systems

124 www.elsevier.com/locate/nbt

[17]. QS signals, in their turn, are intertwined with a global regulatory network of signal molecules [17,18]. Both biosynthetic and regulatory pathways have been reported as promising targets to metabolic engineering for improved rhamnolipid production and design [19–22]. However, all revision articles on the subject have focused on *de novo* synthesis of fatty acid as the central precursors of rhamnolipids, in detriment to the newly reported metabolic connection between β -oxidation and rhamnolipids biosynthesis [23,24]. In the present review we provide an overview of the biosynthetic pathways and the main gene regulatory factors involved in rhamnolipid production by *P. aeruginosa*, stressing the importance of those new findings.

Several reviews have been published in the last few years [17,25–27], although few of them consider a future scenario for rhamnolipids as a competitive product in the market of biosurfactants. Hereby, we present a literature assessment that shows that the number of patents and articles on the subject have grown exponentially in the last decade. We present a quantitative analysis of publications and briefly discuss the main patents and strategies that have been applied to production.

In addition, we made an extensive search for metabolic engineered strains in the literature, which unraveled some novel and "unorthodox" metabolic engineering strategies. Such strategies have been recently described and showed outstanding results when compared to the vastly studied modifications based on the traditional *rhlABC* expression, which have been extensively applied, with similar outcomes. The present review shows that those new approaches may have a great potential for taking over the place of some established strategies.

Rhamnolipid biosynthesis pathways

The rhamnolipids biosynthesis pathway is cross-linked with the formation of various polysaccharide species (Fig. 2) [28–32]. The *de novo* synthesis of the hydrophobic moiety occurs by classical type-II fatty acid synthetases (FAS II) [3,33]. The syntheses of the fatty acid moiety of N-acyl homoserine lactones (AHL) and 4-hydroxyl-2-alkylquinolens (HAQ) are closely linked to each other [34–38]. Initially, RhIG was thought to be the enzyme responsible for diverting the fatty acid components from their



FIGURE 2

Rhamnolipids biosynthesis pathways in P. aeruginosa. The diagram depicts the sequential reactions involved in mono- and di-rhamnolipids assembly, as well as the biosynthetic routes of their L-rhamnose and fatty acid precursors. The dashed red line indicates allosteric inhibition of RmIA by dTDP-L-rhamnose, one of the bottlenecks within the process.

general biosynthetic pathway. RhlG shows significant sequence homology with numerous nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP)-dependent ketoacyl reductases. Even though RhlG was reported to be an active β -ketoacyl reductase [39], FabG was 2000-fold more active in carrying out the same NADPHdependent reduction of β -ketoacyl-ACP to β -D-hydroxyacyl-ACP [40]. Further structural and biochemical studies by Zhu and Rock (2008) confirmed that RhlG is not involved in rhamnolipid biosynthesis [16,18]. On the other hand, it was demonstrated that RhlA plays a pivotal role in the conversion of β-D-hydroxyacyl-ACP intermediates from fatty acids *de novo* synthesis into the β-hydroxydecanoyl-β-hydroxydecanoate component of rhamnolipids.

Stereochemical observations of the β-hydroxyacids present in the fatty acid components of rhamnolipids suggested that this moiety originates from the intermediates in fatty acid biosynthetic pathway [16]. The lipidic moiety of rhamnolipids is thus most probably synthesized de novo. However, Kang et al. showed that virulence factor expression, including that of rhamnolipids, is affected by fatty acid β -oxidation enzymes. For example, a P. aeruginosa PAO1 mutant with inactive fadD2 gene showed a significantly lower production of rhamnolipids [41]. The addition of oil waste products or oils is metabolized through β-oxidation can increase yields of rhamnolipids [42]. Hori et al. (2011) suggested the potential for a metabolic connection between β -oxidation and biosynthesis of rhamnolipids. In their study, a direct relationship was observed between the carbon numbers of βhydroxy fatty acids with the rhamnolipids synthesis [6,24].

Abdel-Mawgoud et al. (2014) recently demonstrated that the role of β-oxidation in rhamnolipids production is constitutive and should happen not only when fatty acid are supplied as carbon sources. They suggest that β -oxidation is the main direct supplier of lipid precursors for rhamnolipids biosynthesis [23].

As shown in Fig. 2, rhamnolipid biosynthesis occurs through three major enzymatic reactions: RhlA catalyzes the synthesis of the fatty acid dimer of rhamnolipids and free 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanoic acid (HAA), while rhamnosyltransferases RhlB and RhIC catalyze the transfer of activated L-rhamnose to either HAA, or a previously generated mono-rhamnolipid, respectively [43].

Rhamnose is found in several strains of Pseudomonas spp., as a component of the cell wall lipopolysaccharide (LPS) and is also disseminated in a variety of Gram-negative bacteria [8,30]. It is also present in the exopolysaccharide (EPS) Psl [29]. The dTDP-Lrhamnose precursor of the hydrophilic portion of rhamnolipids can directly derive from both the Entner-Doudoroff pathway and gluconeogenesis [44,45]. Generation of active L-rhamnose (dTDP-L-rhamnose) initiates through the conversion of D-glucose-6-phosphate into D-glucose-1-phosphate by the phosphoglucomutase AlgC [10,44,45] and is followed by the *rmlBDAC* operon gene products, as shown in Fig. 2 [30,46]. The L-rhamnose promotes a competitive and a non-competitive inhibition in the direction of both synthesis and pyrophosphorolysis, respectively [47]. Melo and Glaser (1965) observed that inhibition was reversed by dTDP-D-glucose and with very high concentrations of pyrophosphate.

REVIEW

Biosynthesis of dTDP-L-rhamnose starts with the glucose-1-phosphate thymidylyltransferase (RmlA, EC 2.7.7.24) that catalyzes the transfer of a thymidylmonophosphate nucleotide to glucose-1phosphate [47]. Importantly, the catalytic activity of RmlA is negatively regulated by dTDP-L-rhamnose [48], the end product, therefore acting as a bottleneck within its own synthesis and consequently in all related pathways involving this compound, including rhamnolipid systemesis [17]. The following sequential reactions leading to dTDP-L-rhamnose biosynthesis are shown in Fig. 2.

Transcriptional and posttranscriptional regulation of gene expression related to rhamnolipid production *Quorum sensing systems*

Quorum sensing (QS) systems are bacterial cell-to-cell communication systems that include the biosynthesis, secretion and detection of signaling molecules known as autoinducers (AI) [49]. QS mechanisms within bacterial populations can produce a synchronized, coordinated behavior once a certain quorum is achieved. QS regulatory systems are widespread in bacteria, controlling a broad variety of biological behavior [49]. A typical QS regulatory system is composed by a signal synthase, a signal receptor protein and a signal molecule. In *P. aeruginosa*, las and rhl are the major QS systems: the synthases LasI and RhII produce their signal molecules, homoserine lactones 3OC12-HSL and C4-HSL. These signal molecules bind and modulate their correspondent transcriptional regulator, LasR and RhIR, respectively [50]. The las system also requires RsaL, a repressor protein to *lasI* and *lasR*, downregulating expression of both genes, and indirectly affecting rhamnolipid biosynthesis [51].

A third QS system, the Pseudomonas quinolone signal (PQS) is involved in upregulation of rhamnolipid biosynthesis. PqsR receptor (or MvfR) mediates the expression of gene clusters *phnAB*, *pqsABCD* and *pqsH*, all of them related to the biosynthesis of quinolone signals, 4-hydroxy-2-alkylquinolones (HAQ) and *Pseudomonas* quinolone signal (PQS), the 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone [52,53]. Biosynthesis of PQS is promoted by the gene products of operon *pqsABCD* and binds PqsR (MvfR) (Fig. 3), a LysR-type regulator. Expression of PqsR is driven by the las and repressed by the rhl QS system, in a typically intricate regulatory network.



FIGURE 3

Transcriptional and posttranscriptional regulation of rhamnolipid biosynthesis in Pseudomonas aeruginosa. Further details are described in the main text.

PQS production reaches its maximum in the late stationary phase [54], a production kinetics that is similar to that of rhamnolipids. Knockout mutants of *pqsR* and *pqsE* have decreased rhamnolipid production levels, even when supplied with exogenous C4-HSL [55]. This finding indicates a direct role of PqsR and PQS in rhamnolipid biosynthesis.

Some QS-regulated genes respond specifically to the rhl regulon, such as the *rhlAB* operon, which directly affect expression of rhamnolipid biosynthetic enzymes [56]. In the case of LasR, it seems to play a direct role at controlling *rhl* and *pqs* systems (Fig. 3). Transcription of *rhll* is activated by the LasR-3OC12-HSL complex in what seems to be a las-dependent fashion, establishing a classical QS hierarchy based on LasR. However, it was reported that expression of the rhl system is still maintained in a lasR-minus mutant, and that RhIR partially controls some LasR-related genes in the absence of LasR [50]. Production of rhamnolipids in P. aeruginosa is directly related to the transcriptional regulator RhlR, which acts either as activator through the complex RhlR-C4-HSL or repressor when the autoinducer is not available [55]. Also related to the las QS system is Vfr, a global regulator of virulence factor in P. aeruginosa. Vfr is a cAMP-binding protein, known to directly activate expression of LasR and RhlR [55].

Transcriptional regulator protein QscR, a homologous member to the Lux family, seems to play a role in the integration between las and rhl QS systems [57], binding to LasR and RhlR in a reversible manner, at low AHL levels. Once AHL concentration increases, stable QscR-AHL complexes occur. As a result, as QscR dissociates from LasR and RhlR, and transcription-activating complexes LasR-3OC12-HSL and RhlR-C4-HSL are formed [58,59]. This mode of action explains the reason why *rhlAB* operon is repressed by QscR during exponential phase [57].

Global regulators

P. aeruginosa, an opportunistic pathogen, is a remarkably versatile microorganism in regard to its ability to adapt and survive within a wide variety of ecological niches, many of them with very limited supply of nutrients [60]. This adaptation requires an orchestrated gene expression for nutrient uptake, and involves coordination of typical two-component regulatory systems, such as NtrB/C and CbrA/B which are active when nitrogen is scarce [61–63]. Using translational reporter fusions, it was proposed that RpoN indirect-ly activates expression of the *rhlAB* operon through the transcription activation of *rhlR* [55]. Therefore, downstream the regulatory cascade of NtrB/C and CbrA/B systems, the alternative sigma factor RpoN plays a central role as a global regulator, by controlling genes involved in nitrogen metabolism, carbon assimilation, nutrient transport, motility and quorum sensing [64].

More recently, Wanner *et al.* (2013) demonstrated that the NtrB/ C-RpoN cascade activates transcription of the nitrogen-regulated sRNA (NrsZ), which in its turn activates *rhlA* expression, leading to the increase of rhamnolipid production by nitrogen limitation [65]. They suggest that the upregulation of *rhlA* expression by nitrogen starvation, through RpoN, happens indirectly, at a posttranscriptional level. Thus, sRNA NrsZ would bind the leader sequence of rhlA mRNA, positively modulating *rhlA* expression. So far, NrsZ is the only sRNA regulator related to rhamnolipid biosynthesis. In agreement with these findings, a transcriptome analysis of *Pseudomonas putida* in response to nitrogen availability limitation has revealed that NtrB/C regulates several genes, including a glutamine synthetase gene, porin genes, amino acid transporter genes, genes related to urea assimilation, and in carbon catabolism [63]. In addition, NtrB/C is related to the ability of *P. aeruginosa* swarming motility, a typical bacterial surface movement that is directly dependent on the presence of rhamnolipids [61–63].

The RpoS sigma factor (σ S or σ 38) also plays a major role in stress responses in P. aeruginosa. RpoS levels are highest at the stationary phase and in response to nutrient limitation [66]. RpoS regulates most of the genes in stationary phase, and is connected to las and rhl regulatory pathways [56]. The rhlAB operon is under the control of RpoS, being partially upregulated [55], clearly suggesting that there is yet another connection between rhamnolipid production and nutrient starvation.

Metabolic engineering for enhanced production of rhamnolipids

The useful properties presented by rhamnolipids, as the low toxicity and the possibility of production from renewable sources, have turned them into one of the most versatile and promising biosurfactants for commercial application. However, after 60 years of study and process optimization attempts, the high cost of production of these biosurfactants still limits their application. Development of high-producing strains and a deeper understanding of the biosynthetic and regulatory pathways involved in rhamnolipid yield are still required in order to minimize production costs and turn them into competitive commodities [4,67].

In this context, two main strategies have been targeted: metabolic engineering and optimization process parameters. Metabolic engineering has been widely used to generate a broad number of modified strains, focusing especially on biosynthetic enzymes and/or regulatory proteins involved in gene expression [67]. During the last few years, a number of studies have reported genetically modified bacterial strains with enhanced production of rhamnolipids, as seen in Table 1. Those high-producing strains are Pseudomonads, or other Gram-negative bacteria, used as platforms for heterologous expression of *P. aeruginosa* genes.

Hereby, we outline the main studies in which metabolism remodeling was performed, either in Pseudomonads or other related bacterial species, mostly using heterologous expression of Pseudomonas genes. A summary of the molecular manipulation strategies, the resulting rhamnolipid productivity, maximum yields, carbons sources, volume of work and method for rhamnolipid quantification is shown in Table 1.

Metabolic engineering focused on rhamnolipid biosynthetic pathways

The first obvious strain modifications to increase the production of a compound would be the overexpression of proteins which are part in its biosynthetic and/or regulatory pathways. In this context, several constructs were made, which include the overexpression of the *rhlA*, *rhlB* and *rhlC*. These genes encode the well known enzymes of *P. aeruginosa* rhamnolipid biosynthesis pathway. Basically, investigation trials have employed the rational development of vector and expression designs, besides random mutagenesis.

A typically optimized *P. aeruginosa* strain was obtained through transposon mediated chromosome integration of an engineered

REVIEW

TABLE 1

Summary of engineered strains for rhampolinid production

Microorganism	Description	Maximum yield (g/L)	Productivity (mg/L h)	Carbon source	Cultivation volume/flask volume	Quantification method	Reference
P. aeruginosa PAO1	Recognized model for RL production	39	433	Sunfloweroil (250 g/L)	19L/42L	HPLC-UV/vis	[70]
P. chlororaphis pBS29-P2- rhIC	rhlC expression in P. chloraphis under P. syringae promoter	0.242	1.44	Glucose (20 g/L)	200 mL/1L	LC–MS analysis	[79]
E. coli ETRABC	<i>rhIAB</i> and <i>rhIC</i> expression in <i>E. coli</i> under T7 promoter	0.120	5	Glucose (4 g/L) + Yeast extract (5 g/L)	25 mL/250 mL	Orcinol	[83]
P. aeruginosa PEER02	rhIAB transposed into P. aeruginosa rhIA-	1.819	18.95	Soybean oil (20 g/L)	25 mL/250 mL	Orcinol	[22]
P. aeruginosa PEER02	rhlAB transposed into P. aeruginosa rhlA-	0.784	8.17	Glucose (20 g/L)	25 mL/250 mL	Orcinol	[22]
P. aeruginosa JC	vhb expression	13.3	185	Raw cheese whey (500 g/L)	50 mL/250 mL	Phenolsulphuric method	[74]
<i>E. coli</i> pF1bR4	<i>rhIAB</i> genes expression in <i>E. coli</i> under lac promoter	0	ND	Yeast extract (5 g/L)	NI	MALDI-TOF-MS	[84]
B. kururiensis LMM21	rhIAB expression in B. kururiensis	7.4	30.83	Glycerol (30 g/L)	500 mL/1L	Orcinol	[24]
P. aeruginosa JC	vhb expression	8.373	349	Glucose (10 g/L) + yeast extract (5 g/L)	50/150 mL	Phenolsulphuric method	[72]
P. putida KT42C1 pVLT31_rhIAB	<i>rhIAB</i> cloning in <i>P. putida</i> , in an inducible form	1.5	62.5	Glucose (10 g/L) + yeast extract (5 g/L)	50 mL/500 mL	Orcinol	[23]
P. aeruginosa pBBLCH	lipC overexpression	0.9*	NI	Yeast extract (1.6 g/L)	Biofilm production	Orcinol	[77]
<i>P. putida</i> KCTC 1067 (pNE2)	rhlA and rhlB co-expression as an operon, clustered with rhlR and rhll.	7.3	101.39	Soybean oil (20 g/L)	NI	Orcinol	[25]
P. aeruginosa pBBX+	estA overexpression	1.75 [*]	37*	Glucose (5 g/L)	200 mL/2L	Orcinol	[75]
E. coli TnERAB	rhIAB expressed in E. coli	0.175	7.3	Glucose (4 g/L) + yeast extract (5 g/L)	25 mL/250 mL	Orcinol	[22]
<i>E. coli</i> HB101 pRLM4	<i>rhIAB</i> genes and <i>rmIBDAC</i> operon expressed in <i>E. coli</i> by 2 different plasmids	0.052	4.3	Oleic acid (15 mM) + yeast extract (5 g/L)	NI	Orcinol	[82]
E. coli W3110 (pINC94, pNC46)	<i>rhIAB</i> genes and <i>rmIBDAC</i> operon expressed in <i>E. coli</i> by 2 different plasmids	0.121	2.94	M9 + Glucose (5 g/L)	NI	Orcinol	[82]
<i>P. putida</i> KT2442 (pUO98)	<i>rhIAB</i> expression in <i>P. putida</i> in an inducible form (under <i>tac</i> promoter)	0.600	24	Glucose (10 g/L) + yeast extract (5 g/L)	NI	Orcinol	[71]
P. aeruginosa PG201 (pUO101)	rhlABRI gene cluster on plasmid pUO101	2.2	13.1	Glycerol (2 g/L)	NI	Orcinol	[71]
P. fluorescences (pUO101)	rhIAB expression in P. fluorescens	0.250	1.49	Glucose (5 g/L)	NI	Orcinol	[71]

ND, not determined. NI, not informed. * Approximate values.

rhlAB operon from *P. aeruginosa* PAO1. The relative quantification of the rhamnolipids by HPLC/MS demonstrated a population of rhamnolipids with similar structural composition to that from other *P. aeruginosa* strains, although with different percentage of the several structural congeners [19]. A maximum of 1.819 g/L rhamnolipids was achieved when the strain was grown with soybean oil, reaching a productivity of 18.95 mg/L h. When glucose was used as the sole carbon source, the maximum yield achieved was 0.784 g/L, and productivity was 8.19 mg/L h. Despite the reduction in productivity, the use of glucose as carbon source is interesting due to its lower cost, when compared to soybean oil. Later on, modified *P. aeruginosa* strain PG201 was obtained, which yielded 2.2 g/L of rhamnolipids with a productivity of 13.1 mg/L h, when glycerol (2 g/L) was used [68].

Metabolic engineering with unrelated genes

Metabolic engineering has been widely used to enhance production levels of a variety of bioproducts. In the past five years, the co-expression of hemoglobin from Vitreoscilla (VHb) has been a strategy of choice in some studies. The presence of this protein allows for a major accessibility to oxygen in the bacterial cells, which in turn increases the biosynthesis and production levels of genes of interest [69,70]. This strategy was used to produce rhamnolipids with P. aeruginosa NRRL B-771, a strain containing a plasmid construct with vhb gene. This P. aeruginosa strain has achieved a yield of 8.4 g/L in batch culture. Another report describes a yield of 13.3 g/L, using the same recombinant strain, in a culture medium that contained cheese and olive oil industrial wastewater as carbon sources [69,71]. To date, this strain shows the highest reported rhamnolipid productivity among engineered strains, having achieved an yield of 185 mg/L h [69,71].

Exploring the relationship between the outer membrane protein EstA of P. aeruginosa and the production of rhamnolipids, Whilhelm et al. (2007) have studied the influence of this protein and its catalytic activity on the production of rhamnolipids [72]. They demonstrated that a estA-minus strain had a severely reduced production of rhamnolipids. In the same study, a mutant strain with a modified EstA protein lacking the esterase domain produced only traces of rhamnolipids, while overexpression of EstA resulted in the increase in production of almost four times when compared with the wild type strain P. aeruginosa PAO1. Still focusing on EstA, the impact of this protein on the production of rhamnolipid by P. aeruginosa SG81 was further assessed by another group [73]. It was shown that overexpression of *estA* gene affected the rhamnolipid production and recovery in the extracellular milieu. The SG81estA+ clone of P. aeruginosa showed a rhamnolipid production of $18.90 \text{ g}/10^9$ cells while the wild type strain produced 14.94 g/10⁹ cells. Interestingly, both groups have shown the overexpression of EstA resulted in significant changes in the ratio of mono- and dirhaminolipids.

Another enzyme, LipC, was investigated in regard to its influence on rhamnolipid synthesis [73,74]. However, two independent groups showed relatively different results: while Rosenau *et al.* (2010) showed that *lipC* overexpression would increase the rhamnolipid production, Tielen *et al.* (2010) observed that rhamnolipid production was not affected when *lipC* was overexpressed [73,74].

P. aeruginosa genes in heterologous hosts

More recently, production of rhamnolipid by a modified facultative anaerobic *Pseudomonas* strain was constructed and reported. The metabolic engineering involved a *rhlABRI* gene cluster from *P. aeruginosa*, which was introduced into the facultative anaerobic strain *Pseudomonas stutzeri* DQ1, generating strain *P. stutzeri*-Rhl [75]. Using glycerol as the sole carbon substrate, a production of 1.6 g/L of rhamnolipids was achieved. Interestingly, for some *in situ* field applications, production of rhamnolipid under anaerobic conditions would make the best strategy to circumvent the need for *ex situ* production of rhamnolipids [75].

In order to circumvent the negative implications of using a non GRAS strain, and disconnect the rhamnolipid biosynthesis from the complex quorum sensing regulation of *P. aeruginosa*, some research groups are investing in heterologous expression of *P. aeruginosa* genes in GRAS strains, such as *Escherichia coli*, *Burkholderia* spp. and others *Pseudomonas* species that are not recognized as pathogen [20,21].

In these ways, a modified *P. chlororaphis* strain was also designed, harboring plasmid pBS29-P2-rhlC, and expressing of the rhamnosyltransferase C (*rhlC*) gene from *P. aeruginosa*, under control of a *Pseudomonas syringae* promoter [76]. The authors reported that the modified *P. chlororaphis* was able to produce 2.4 fold more di-rhamnolipids than mono-rhamnolipids [76]. A previous study of the same group reported that a 3-hydroxyacyl-ACP/CoA transacylase (phaG)-knockout does not affect rhamnolipid synthesis [77].

With regard to productivity, little has changed over the years. Twenty years ago, some modified, non-pathogenic Pseudomonas harboring rhlAB operon from P. aeruginosa were constructed: P. fluorescens, P. oleovorans and P. putida were used as heterologous hosts. It was observed a production of 0.25 g/L to the P. fluorescens strain, when grown under nitrogen-limiting conditions. The highest yields (0.6 g/L) and productivities (24 mg/L h) were obtained at the recombinant P. putida KT2442 (pUO98) [68]. More recently, a modified P. putida strain carrying rhlA and rhlB genes as an operon, were clustered with *rhlR* and *rhlI*, which encode proteins involved in their transcriptional regulation through the quorum sensing response. A maximum rhamnolipid concentration of 7.3 g/L was achieved when soybean oil was used as carbon source [22]. A third construction using P. putida as a platform was also obtained by adding rhlAB cluster cloned under control of an inducible promoter [20]. Rhamnolipid production was still lower than the in the previous study [22], as the P. putida KCTC 1067 (pNE2) reached a maximum concentration of 1.5 g/L in a shorter time (72 hours) than the previous work and with a lower cell concentration [20].

So far, the highest rhamnolipid concentration production by a GRAS strain, was achieved by the cloning of *rhlA* and *rhlB* genes into *Brukholderia kururiensis*. The resulting strain, *B. kururiensis* LMM21, reached a 7.4 g/L of rhamnolipids in 10 days of fermentation [21], a similar value of those encountered for *P. putida* KCTC 1067 (pNE2) in 7 days of fermentation [22]. Although *P. putida* KCTC 1067 (pNE2) could reach the same production in a shorter period of time, soybean oil was used as carbon source, while with *B. kururiensis* LMM21 glycerol was the sole carbon source.

Another non-*Pseudomonas*, GRAS host cell used for heterologous expression of *rhlA*, *rhlB* and *rhlC* genes from *P. aeruginosa* was *Ralstonia eutropha*. For that, it was transformed with a plasmid vector containing *xylA*, *xylB*, *xylF*, *xylG* and *xylH* genes from *Pseudomonas fluorescens* Pf01. The construction was able to form at least one rhamnolipid congener, reaching a maximum yield of 9.2 mg/L of rhamnolipds. This work is reported as an invention protected under the patent number WO 2014039940 A1 [78].

Escherichia coli is a widely used model organism for heterologous protein expression due to a host of available information regarding gene regulation, easy growth at low costs substrates and a wide variety vector options. Some efforts have taken place to use E. coli as a platform for rhamnolipid production. As far as our knowledge goes, the first trial of heterologous rhamnolipid expression in E. coli dates back to 1995. The rhlAB genes from P. aeruginosa PG201 were successfully cloned into E. coli DH5α but no significant rhamnolipid production was observed, presumably due to a limited availability dTDP-L-rhamnose [68]. Another E. coli construct allied a recombinant *rhlAB*-containing fragment with the rmlBDAC operon in order to increase the supply of precursor dTDP-L-rhamnose, showing a slightly improved production of 0.121 g/L of rhamnolipids [79]. The latter work accounts for the first successful rhamnolipid production in E. coli. A second successful work was based on the manipulation E. coli BL21 (DE3) by insertion of a transposon containing rhlAB, and yielded 0.175 g/L of rhamnolipids [19]. Therefore, the expression of the *rmlBDAC* operon is not essential for heterologous production of rhamnolipids in E. coli. Beyond the scope of *rhlAB* native cluster, a library of recombinant E. coli strains was obtained, containing plasmids with various combinations of genes rhlA, rhlB, rhlC and different mutations in *rhlB*. Since the goal to analyze the composition of the molecular mixtures of rhamnolipids produced, and not the production yields, no specific fermentation was performed. A maximum production of 0.120 g/mL was obtained with a clone harboring rhlAB and rhlC, with no mutations, under the control of the T7

promoter, and fermentation in LB media supplemented with 0.4% glucose. This work also confirms that the co-expression a recombinant *rmlBDAC* cluster is not essential for rhamnolipid heterologous synthesis in *E. coli*, and depends essentially on the expression design [80].

Technological perspective

In order to have a holistic view of the main developments on rhamnolipid production, specially within Pseudomonas, a patent literature assessment was carried out using Derwent Innovations Index (R) database. The key words used were 'rhamnolipid* AND Pseudomonas' in the field 'topic'. Initially, 86 documents were retrieved from 1970 to 2014. After reviewing their abstracts, 28 were discarded for not having full information about production of rhamnolipids, only field applications. Furthermore, as the confidentiality period is 18 months, the data from 2013 and 2014 were not considered for statistical analysis, therefore 51 documents were analyzed from 1975 to 2012. For comparison to non-patent literature, the searches were performed with basis on the main collection of Web of Science database, within articles published from 1945 to 2014. The following strategy was adopted in the "topic" field: "Pseudomonas AND rhamnolipid* production" OR "Pseudomonas AND production of rhamnolipid*". Brief analyses were performed on the years when articles were published, showing that whilst the first article dates back to 1986, and another one in 1987, a following gap of five years showed no publication. In 1993, production of rhamnolipids was to be reported again [81] as well as in 1994. Oschner [82] marks the beginning of the studies on rhamnolipid production by recombinant strains. The same group also marks the heterologous production of rhamnolipids [68], as discussed in the previous section (Fig. 4).



FIGURE 4

Annual distribution of works involving production of rhamnolipids and *Pseudomonas*. The no-patent literature were retrieved with a search with "*Pseudomonas* AND rhamnolipid* production" OR "*Pseudomonas* AND production of rhamnolipid*", held in the main collection of the Web of Science database. The patent literature was obtained by search with "rhamnolipid* AND *Pseudomonas*", held in the Derwent Innovations Index ® database. Inset shows the cumulative number of patents (1975–2012).



FIGURE 5

Evolution of patent deposits according to priority year. Data are grouped in three years from 2010 to 2012, for the main priority countries. Japan (JP), Germany + German Democratic Republic (DE + DD), United States (US), South Korea (KR), China (CN) and Brazil (BR).

Interest in rhamnolipid production has remarkably increased over the years, especially in the last decade, when the number of reports more than doubled from 2006 to 2007. A substantial amount of records are from the USA (18.8%), followed by Brazil (13.1%) and Germany (10.6%).

Taking into account the patent literature as an indicative for technological forecasting [83], we conclude that the rhamnolipid production technology is on the increase, still in exponential growth phase (Fig. 4, inset) and the maturation time is not possible to calculate precisely for this technology [84]. Furthermore, observing differences in the numbers of patent and no-patent literature, dating mostly after the 2000s, it suggests that scientific research may represent a great contribution to increase technology on the subject.

When the patent literature was analyzed, the main priority countries were: China (with 16 documents), Germany (10), United States (7), South Korea (5), Japan (3) and Brazil (3) (Fig. 5). Other countries account for seven documents. According to that literature, the technological production of rhamnolipids using microorganisms, specifically using *Pseudomonas* spp., seems to have emerged in 1975, where the first document (JP52054083-A [85]) was reported, belonging to the Japanese Agency of Industrial Science & Technology (currently National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, AIST). That patent claimed the culture conditions of *Pseudomonas* for rhamnolipid production and its recovery by a silica gel column chromatography. The authors also reported the structure of two main glycolipids, whose relative concentrations may differ depending on the nitrogen source (urea or sodium nitrate).

Although Japan seems to be the country that initially dedicated to this type of technology, its patent production in the area has

been disperse, with only two other deposits in 1996 and 2001. Germany was the largest priority country during 80s and 90s, and the United States and South Korea have engaged more recently, from the 2000s. China, in its turn, despite being the country with the largest number of documents, its emergence as a priority country is relatively recent, since their first deposit only occurred 10 years ago (2005). Brazil has three documents, equalizing with Japan, although the patents are very recent (2007 and 2011) (Fig. 5).

Analyzing the documents, a particular one emerges in 1983, eight years after the first deposit, by an applicant in Switzerland, claiming rhamnolipid production by continuously cultivation, under different media composition when compared to the first deposit (EP135099-A2, [86]). The group reported that the yield were of 1–1.5 g/L, stressing our previous observation that in more than 40 years of patents and more than 60 years of studies, a significant increase in rhamnolipid production is still beyond reach.

During the 1980s and 1990s, the first deposits reported the cultivation in anaerobic conditions, and the successive ones claimed simple changes on the process, especially in regard the media composition, which include the use of ammonium ferrous sulphate aiming to promote the growth rate (DD234689-A [87]), vegetable oil as carbon source (EP282942-A [88]) or gliceric acids ether lipids as inducers (DE4127908 [89]). The first patent deposit claiming for an process using harvest cell and production in aerated medium was DD234689-A [87] and the first one that reported care with the foam/oxygenation problem during rhamnolipid production was WO200029604-A [90], in 1998.

Document BR100586-6 (WO2012079138 [91]), claimed by PET-ROBRAS and Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), did not initially appear in our search by using keywords "rhamnolipids*"



FIGURE 6

Bioreactors with dispersive and non-dispersive aeration. Picture show bench scale experiments, carried out with (A) dispersive and (B) the non-dispersive technology claimed in BR100586-6 (WO2012079138 [91]). Pictures kindly provided by the authors.

AND "*Pseudomonas*". However, it is extremely important since the authors claimed a pilot plant with a bioreactor that was aerated by diffusion, and not by the traditional dispertion method. Using membranes, the air is diffused in the culture medium, through a non-dispersive manner, and the foam/oxygenation problems typically related to rhamnolipid production are eliminated (Fig. 6).

Patent BR200701366-A2 [92], from Federal University of Paraná, is the only document claiming the production of rhamnolipids by solid-state fermentation. The authors claimed the production of rhamnolipids using soybean, canola, cottonseed meals and bagasse of sugar-cane as solid media. The best substrate was the bagasse from sugar-cane, yielding 12 g/L of rhamnolipids per g of dry bagasse.

Among the documents found in our search, the first document describing a *Pseudomonas* mutant was claimed by HOESCHT (US 5501966 A [93]) claiming a *P. aeruginosa* constructed by chemical mutagenization by the use of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG), and the process where it was used. The patent claim for a process for L-rhamnose production, which would synthetize rhamnolipids in a concentration of 70–120 g/L. Research works involving metabolic engineering are discussed below, along with other patent prospects.

The Institute for Technological Research from São Paulo state (Brazil) developed a method to select rhamnolipid producers from soil samples, and observed high rhamnolipid producers with low PHA production. A library of random mutants was generated by UV-irradiation and screened to select mutants exhibiting high rhamnolipid production, and negatively affected in PHA biosynthesis. With this strategy, they obtained a strain with a two-fold increase in rhamnolipid production when compared to the wild type (BR2007055327-A2 [94]).

Using the same metabolic engineering approach, but using the modern tools of molecular biology, the authors of

132 www.elsevier.com/locate/nbt

DE102010032484 [95] (assigned by Evonik Goldschmidt Gmbh) overexpressed P. aeruginosa genes rhlA, rhlB, rhlC and pa1131 in P. putida KT2440 (wild type) and GPp104 (having inactivated polyhydroxybutyrate formation [96]). They observed the importance of inactivation of polyhydroxybutirate biosynthesis and of the gene *pa1131*. In an improvement of this invention, the same company described the manipulation of fatty acid biosynthesis (document DE102012201360 [97]). Once more, the authors overexpressed the genes rhlA, rhlB, rhlC and pa1131 in Pseudomonas putida KT2440 and GPp104 and, additionally, overexpressed rhlG. In order to improve the fatty acid biosynthesis they tried to increase the NADPH pool trough heterologous expression of gapC from Clostridium acetobutilycum, as well as pntAB and udhA genes from Escherichia coli. The best results were obtained with P. putida GPp104, simultaneously expressing heterologous rhlA, rhlB, rhlC, pa1131 and pntAB. Another invention using metabolic engineering to enhance the rhamnolipid production, and overcome the problem of P. aeruginosa pathogenicity, was disclosed in EP2573172 [98]. The authors expressed genes *rhlA* and *rhlB* from *P. aeruginosa* in *P. putida* KT42C1 (Δ*phaC1*::Km^r) under the control of a modified P_{Tac} promoter.

Concluding remarks

Rhamnolipids are a very promising class of biosurfactants and have been subject of many studies the last decades, focusing mainly in production and the intricate biosynthesis and regulatory pathways. However, these biomolecules are not yet economically exploited at its full potential. This review discussed the main bottlenecks for their production and commercialization, which reside on relatively low production and productivity. Although many drawbacks were surpassed and alternatives to pathogenic of *P. aeruginosa* have been proposed, high cost of culture media and foam production are still at stake. Moreover, an increasingly detailed knowledge about biosynthesis pathways and regulatory mechanisms have allowed the generation of tailor-made strains. In this way, new studies have recently emerged corroborating the importance of β -oxidation pathway for rhamnolipids biosynthesis, which may serve as the basis for novel molecular approaches to increase productivity. Our technological forecasting study showed an increasing interest in this class of biosurfactants and support the expectations that production and commercialization bottlenecks could be overcome.

References

- Deleu M, Paquot M. From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. Comptes Rendus Chim 2004;7:641–6. <u>http://</u> dx.doi.org/10.1016/j.crci.2004.04.002.
- [2] Van Bogaert INA, Saerens K, De Muynck C, Develter D, Soetaert W, Vandamme EJ. Microbial production and application of sophorolipids. Appl Microbiol Biotechnol 2007;76:23–34. <u>http://dx.doi.org/10.1007/s00253-007-0988-7</u>.
- [3] Abdel-Mawgoud AM, Lépine F, Déziel E, Rhamnolipids. Diversity of structures, microbial origins and roles. Appl Microbiol Biotechnol 2010;86:1323–36. <u>http:// dx.doi.org/10.1007/s00253-010-2498-2</u>.
- [4] Müller MM, Kügler JH, Henkel M, Gerlitzki M, Hörmann B, Pöhnlein M, et al. Rhamnolipids-Next generation surfactants? J Biotechnol 2012;162:366–80. <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.05.022</u>.
- [5] Banat IM, Makkar RS, Cameotra SS. Potential commercial applications of microbial surfactants. Appl Microbiol Biotechnol 2000;53:495–508. <u>http:// dx.doi.org/10.1007/s002530051648</u>.
- [6] Zhang L, Veres-Schalnat TA, Somogyi A, Pemberton JE, Maier RM. Fatty acid cosubstrate provides -oxidation precursors for rhamnolipid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence from isotope tracing and gene expression. Appl Environ Microbiol 2012. <u>http://dx.doi.org/10.1128/AEM. 02111-12</u>.
- [7] Abalos A, Pinazo A, Infante MR, Casals M, García F, Manresa A. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. Langmuir 2001;17:1367–71. <u>http://dx.doi.org/10.1021/la0011735</u>.
 [8] Abdel-Mawgoud AM, Hausmann RL, Pine F, Müller MM, Déziel E. Detection,
- [8] Abdel-Mawgoud AM, Hausmann RL, Pine F, Müller MM, Déziel E. Detection, analysis, biosynthesis, genetic regulation & bioengineering of production. In: In Biosurfactants: From Genes to Applications. Heidelberg: Springer Berlin; 2011.
- [9] Zulianello L, Canard C, Köhler T, Caille D, Lacroix JS, Meda P. Rhamnolipids are virulence factors that promote early infiltration of primary human airway epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun 2006;74:3134–47. <u>http:// dx.doi.org/10.1128/IAI. 01772-05.</u>
- [10] Boles BR, Thoendel M, Singh PK. Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudo-monas aeruginosa* from biofilms. Mol Microbiol 2005;57:1210–23. <u>http://dx.doi.org/10.1111/j. 1365-2958.2005.04743.x.</u>
- De Kievit TR. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Environ Microbiol 2009;11:279–88. <u>http://dx.doi.org/10.1111/j. 1462-2920.2008.</u> 01792.x.
- [12] Caiazza NC, Shanks RMQ, O'Toole GA. Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 2005;187:7351–61. http://dx.doi.org/10.1128/JB.187.21. 7351-7361.2005.
- [13] Heurlier K, Williams F, Heeb S, Pessi G, Singer D, Cámara M, et al. Positive control of swarming, rhamnolipid synthesis, and lipase production by the posttranscriptional RsmA/RsmZ system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 positive control of swarming, rhamnolipid synthesis, and lipase production by the posttranscription. J Bacteriol 2004;186:2936–45. <u>http://dx.doi.org/10.1128/JB.</u> <u>186.10.2936</u>.
- [14] Haba E, Pinazo A, Jauregui O, Espuny MJ, Infante MR, Manresa A. Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044. Biotechnol Bioeng 2003;81:316– 22. http://dx.doi.org/10.1002/bit.10474.
- [15] Maier RM, Soberón-Chávez G. Pseudomonas aeruginosa rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. Appl Microbiol Biotechnol 2000;54:625–33. <u>http://dx.doi.org/10.1007/s002530000443</u>.
- [16] Zhu K, Rock CO. RhlA converts beta-hydroxyacyl-acyl carrier protein intermediates in fatty acid synthesis to the beta-hydroxydecanoyl-beta-hydroxydecanoate component of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 2008;190:3147–54. http://dx.doi.org/10.1128/JB. 00080-08.
- [17] Reis RS, Pereira AG, Neves BC, Freire DMG. Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa* a review. Bioresour Technol 2011;102:6377–84. <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.074</u>.
 [18] Müller MM, Hausmann R. Regulatory and metabolic network of rhamnolipid
- [18] Müller MM, Hausmann R. Regulatory and metabolic network of rhamnolipid biosynthesis: traditional and advanced engineering towards biotechnological production. Appl Microbiol Biotechnol 2011;91:251–64. <u>http://dx.doi.org/</u> 10.1007/s00253-011-3368-2.
- [19] Wang Q, Fang X, Bai B, Liang X, Shuler PJ, Goddard WA, et al. Engineering bacteria for production of rhamnolipid as an agent for enhanced oil recovery. Biotechnol Bioeng 2007;98:842–53. <u>http://dx.doi.org/10.1002/bit.21462</u>.
- [20] Wittgens A, Tiso T, Arndt TT, Wenk P, Hemmerich J, Müller C, et al. Growth independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic

Conflict of interest statement

The authors declare that the conception and writing of this article were conducted in the absence of any commercial or financial interests that could represent any potential conflict of interest.

Acknowledgements

The authors are very grateful to CNPq, CAPES, ANP and PETROBRAS for sponsorships and financial support. We thank Prof. Denise M.G. Freire for kindly providing Fig. 6.

Pseudomonas putida KT2440. Microb Cell Fact 2011;10:80. <u>http://dx.doi.org/</u>10.1186/1475-2859-10-80.

- [21] Tavares LFD, Silva PM, Junqueira M, Mariano DCO, Nogueira FCS, Domont GB, et al. Characterization of rhamnolipids produced by wild-type and engineered *Burkholderia kururiensis*. Appl Microbiol Biotechnol 2013;97:1909–21. <u>http://dx.doi.org/10.1007/s00253-012-4454-9</u>.
- [22] Cha M, Lee N, Kim M, Kim M, Lee S. Heterologous production of *Pseudomonas aeruginosa* EMS1 biosurfactant in *Pseudomonas putida*. Bioresour Technol 2008;99:2192–9. <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.035</u>.
- [23] Abdel-Mawgoud AM, Lépine F, Déziel E. A stereospecific pathway diverts βoxidation intermediates to the biosynthesis of rhamnolipid biosurfactants. Chem Biol 2014;21:156–64. http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.11.010.
- [24] 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 2011;53:196–202. http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2010.10.011.
- [25] Marchant R, Banat IM, Biosurfactants. A sustainable replacement for chemical surfactants? Biotechnol Lett 2012;34:1597–605. <u>http://dx.doi.org/10.1007/</u> <u>s10529-012-0956-x</u>.
- [26] Sekhon KK, Rahman PKSM. Rhamnolipid biosurfactants past, present and future scenario of global market. Front Microbiol 2014;5:1–7. <u>http://dx.doi.org/10.3389/</u> <u>fmicb.2014.00454</u>.
- [27] Marchant R, Banat IM. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. Trends Biotechnol 2012;30:558–65. <u>http://dx.doi.org/</u> <u>10.1016/j.tibtech.2012.07.003</u>.
- [28] Friedman L, Kolter R. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. Mol Microbiol 2004;51:675–90. <u>http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03877.x.</u>
- [29] Ma L, Conover M, Lu H, Parsek MR, Bayles K, Wozniak DJ. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. PLoS Pathog 2009;5. http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000354.
- [30] Rahim R, Burrows LL, Monteiro MA, Perry MB, Lam JS. Involvement of the rml locus in core oligosaccharide and O polysaccharide assembly in *Pseudomonas* aeruginosa. Microbiology 2000;146:2803–14.
- [31] Byrd MS, Sadovskaya I, Vinogradov E, Lu H, Sprinkle AB, Richardson SH, et al. Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production. Mol Microbiol 2009;73:622–38. <u>http://dx.doi.org/10.1111/</u> <u>j. 1365-2958.2009.06795.x</u>.
 [32] Lindhout T, Lau PCY, Brewer D, Lam JS. Truncation in the core oligosaccharide
- [32] Lindhout T, Lau PCY, Brewer D, Lam JS. Truncation in the core oligosaccharide of lipopolysaccharide affects flagella-mediated motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 via modulation of cell surface attachment. Microbiology 2009:155:3449–60. http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.030510-0.
- 2009;155:3449–60. <u>http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.030510-0</u>.
 [33] Rehm BHA, Krüger N, Steinbüchel A. A new metabolic link between fatty acid de novo synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis. J Biol Chem 1998;273:24044–51. doi:10.1074/jbc.273.37.24044.
- [34] Schaefer AL, Val DL, Hanzelka BL, Cronan JE, Greenberg EP. Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein. Proc Natl Acad Sci U S A 1996;93:9505–9. <u>http://dx.doi.org/10.1073/pnas.93.18.9505</u>.
 [35] Hoang TT, Schweizer HP. Fatty acid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*:
- [35] Hoang TT, Schweizer HP. Fatty acid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: cloning and characterization of the fabAB operon encoding [β-hydroxyacylacyl carrier protein dehydratase (FabA) and β-ketoacyl-acyl carrier protein synthase I (FabB). J Bacteriol 1997;179:5326–32.
- [36] Hoang TT, Schweizer HP. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI): a target for the antimicrobial triclosan and its role in acylated homoserine lactone synthesis. J Bacteriol 1999;181:5489–97.
- [37] Déziel E, Lépine F, Milot S, He J, Mindrinos MN, Tompkins RG, et al. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101:1339–44. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0307694100.
- [38] Bredenbruch F, Nimtz M, Wray V, Morr M, Muller R, Haussler S. Biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinofines. J Bacteriol 2005;187:3630–5.
- [39] Campos-García J, Caro AD, Nájera R, Miller-Maier RM, Al-Tahhan RA, Soberón-Chávez G. The *Pseudomonas aeruginosa* rhlG gene encodes an NADPH-dependent β-ketoacyl reductase which is specifically involved in rhamnolipid synthesis. J Bacteriol 1998;180:4442–51.

New Biotechnology • Volume 33, Number 1 • January 2016

- [40] Miller DJ, Zhang YM, Rock CO, White SW. Structure of RhlG, an essential βketoacyl reductase in the rhamnolipid biosynthetic pathway of *Pseudomonas* aeruginosa. J Biol Chem 2006;281:18025–32. <u>http://dx.doi.org/10.1074/jbc.</u> <u>M601687200</u>.
- [41] Kang Y, Zarzycki-Siek J, Walton CB, Norris MH, Hoang TT. Multiple fadd acyl-CoA synthetases contribute to differential fatty acid degradation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS One 2010;5. <u>http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0013557</u>.
- [42] Nitschke M, Costa SGVAO, Contiero J. Rhamnolipid surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. Biotechnol Prog 2005;21:1593–600. <u>http://dx.doi.org/10.1021/bp050239p</u>.
- [43] Déziel E, Lépine F, Milot S, Villemur R. rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. Microbiology 2003;149:2005–13. http://dx.doi.org/10.1099/mic.0. 26154-0.
- [44] Olvera C, Goldberg JB, Sánchez R, Soberón-Chávez G. The *Pseudomonas aeru-ginosa* algC gene product participates in rhamnolipid biosynthesis. FEMS Microbiol Lett 1999;179:85–90. <u>http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1097(99)00381-X</u>.
 [45] Pham TH, Webb JS, Rehm BHA. The role of polyhydroxyalkanoate biosynthesis
- [45] Pham TH, Webb JS, Rehm BHA. The role of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* in rhamnolipid and alginate production as well as stress tolerance and biofilm formation. Microbiology 2004;150:3405–13. <u>http://dx.doi.org/10.1099/mic.0. 27357-0.</u>
 [46] Robertson BD, Frosch M, Van Putten JPM. The identification of cryptic rham-
- [46] Robertson BD, Frosch M, Van Putten JPM. The identification of cryptic rhamnose biosynthesis genes in *Neisseria gonorrhoeae* and their relationship to lipopolysaccharide biosynthesis. J Bacteriol 1994;176:6915–20.
- [47] Melo A, Glaser L. The nucleotide specificity and feedback control of thymidine. J Biol Chem 1965;240:398–405.
- [48] Blankenfeldt W, Giraud MF, Leonard G, Rahim R, Creuzenet C, Lam JS, et al. The purification, crystallization and preliminary structural characterization of glucose-1-phosphate thymidylyltransferase (RmlA), the first enzyme of the dTDP-L-rhamnose synthesis pathway from *Pseudomonas aeruginosa*. Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr 2000;56:1501–4. http://dx.doi.org/10.1107/S0907444900010040.
- [49] Williams P, Cámara M. Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. Curr Opin Microbiol 2009;12:182–91. <u>http://dx.doi.org/10.1016/</u> j.mib.2009.01.005.
- [50] Dekimpe V, Déziel E. Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: The transcriptional regulator RhlR regulates LasR-specific factors. Microbiology 2009;155:712–23. http://dx.doi.org/10.1099/mic.0. 022764-0.
- Microbiology 2009;155:712–23. <u>http://dx.doi.org/10.1099/mic.0. 022764-0.</u>
 [51] Rampioni G, Polticelli F, Bertani I, Righetti K, Venturi V, Zennaro E, et al. The Pseudomonas quorum-sensing regulator RsaL belongs to the tetrahelical superclass of H-T-H proteins. J Bacteriol 2007;189:1922–30. <u>http://dx.doi.org/10.1128/IB.01552-06.</u>
 [52] Gallagher La, Mcknight SL, Marina S, Pesci EC, Manoil C, Gallagher La. Func-
- [52] Gallagher La, Mcknight SL, Marina S, Pesci EC, Manoil C, Gallagher La. Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa* functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa* 2002;184:6472–80. <u>http://dx.doi.org/10.1128/JB.184.23.6472</u>.
- [53] Schertzer JW, Boulette ML, Whiteley M. More than a signal: non-signaling properties of quorum sensing molecules. Trends Microbiol 2009;17:189–95. http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2009.02.001.
- [54] Diggle SP, Winzer K, Chhabra SR, Worrall KE, Cámara M, Williams P. The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell densitydependency of the quorum sensing hierarchy, regulates rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. Mol Microbiol 2003;50:29–43. <u>http://dx.doi.org/10.1046/j. 1365-2958.2003.</u> 03672.x.
- [55] Medina G, Juárez K, Díaz R, Soberón-Chávez G. Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* rhlR, encoding a quorum-sensing regulatory protein. Microbiology 2003;149:3073–81. <u>http://dx.doi.org/10.1099/mic.0. 26282-0</u>.
- [56] Schuster M, Greenberg EP. Early activation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* reveals the architecture of a complex regulon. BMC Genomics 2007;8:287. <u>http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-8-287</u>.
- [57] Lequette Y, Lee JH, Ledgham F, Lazdunski A, Greenberg EP. A distinct QscR regulon in the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing circuit. J Bacteriol 2006;188:3365–70. <u>http://dx.doi.org/10.1128/JB.188.9. 3365-3370.2006</u>.
 [58] Ledgham F, Ventre I, Soscia C, Foglino M, Sturgis JN, Lazdunski A. Interactions
- [58] 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 RhIR. Mol Microbiol 2003;48:199–210. <u>http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03423.x.</u>
 [59] Fuqua C, Fuqua C. Guest commentaries. Society 2006;188:3169–71. <u>http://</u>
- [59] Fuqua C, Fuqua C. Guest commentaries. Society 2006;188:3169–71. <u>http://dx.doi.org/10.1128/JB.188.9.3169</u>.
- [60] Kimata N, Nishino T, Suzuki S, Kogure K. Pseudomonas aeruginosa isolated from marine environments in Tokyo Bay. Microb Ecol 2004;47:41–7. <u>http:// dx.doi.org/10.1007/s00248-003-1032-9</u>.
- [61] Zhang XX, Rainey PB. Regulation of copper homeostasis in *Pseudomonas fluorescens* SBW25. Environ Microbiol 2008;10:3284–94. <u>http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01720.x.</u>
- [62] Yeung aTY, Torfs ECW, Jamshidi F, Bains M, Wiegand I, Hancock REW, et al. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is controlled by a broad spectrum of transcriptional regulators, including MetR. J Bacteriol 2009;191:5592–602. http://dx.doi.org/10.1128/JB. 00157-09.
- [63] Hervás AB, Canosa I, Little R, Dixon R, Santero E. NtrC-dependent regulatory network for nitrogen assimilation in *Pseudomonas putida*. J Bacteriol 2009;191:6123–35. <u>http://dx.doi.org/10.1128/JB.00744-09</u>.
- [64] Potvin E, Sanschagrin F, Levesque RC. Sigma factors in Pseudomonas aeruginosa. FEMS Microbiol Rev 2008;32:38–55. <u>http://dx.doi.org/10.1111/j. 1574-6976.</u> 2007.00092.x.

- [65] Warner NR, Christie Ca, Jackson RB, Vengosh A. Impacts of shale gas wastewater disposal on water quality in Western Pennsylvania. Environ Sci Technol 2013;47:11849–57. <u>http://dx.doi.org/10.1021/es402165b</u>.
- [66] Bertani I, Ševo M, Kojic M, Venturi V. Role of GacA, LasI, RhII, Ppk, PsrA, Vfr and ClpXP in the regulation of the stationary-phase sigma factor rpoS/RpoS in Pseudomonas. Arch Microbiol 2003;180:264–71. <u>http://dx.doi.org/10.1007/</u> <u>s00203-003-0586-8</u>.
- [67] Banat IM, Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Martinotti MG, Fracchia L, et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. Appl Microbiol Biotechnol 2010;87:427–44. <u>http://dx.doi.org/10.1007/s00253-010-2589-0</u>.
- [68] Ochsner UA, Reiser J, Fiechter A, Witholt B. Production of *Pseudomonas aeru-ginosa* rhamnolipid biosurfactants in heterologous hosts. Appl Environ Microbiol 1995;61:3503–6.
- [69] Kahraman H, Erenler SO. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* engineered with the Vitreoscilla hemoglobin gene. Appl Biochem Microbiol 2012;48:188–93. <u>http://dx.doi.org/10.1134/S000368381202007X</u>.
- [70] Stark BC, Pagilla KR, Dikshit KL. Recent applications of Vitreoscilla hemoglobin technology in bioproduct synthesis and bioremediation. Appl Microbiol Biotechnol 2015;99:1627–36. <u>http://dx.doi.org/10.1007/s00253-014-6350-y</u>.
- [71] Colak AK, Kahraman H. The use of raw cheese whey and olive oil mill wastewater for rhamnolipid production by recombinant *Pseudomonas aeruginosa*. Environ Exp Biol 2013;11:125–30.
- [72] Wilhelm S, Gdynia A, Tielen P, Rosenau F, Jaeger KE. The autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* is required for rhamnolipid production, cell motility, and biofilm formation. J Bacteriol 2007;189:6695–703. <u>http:// dx.doi.org/10.1128/JB. 00023-07</u>.
- [73] Tielen P, Rosenau F, Wilhelm S, Jaeger KE, Flemming HC, Wingender J. Extracellular enzymes affect biofilm formation of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology 2010;156:2239–52. <u>http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.037036-0</u>.
 [74] Rosenau F, Isenhardt S, Gdynia A, Tielker D, Schmidt E, Tielen P, et al. Lipase
- [74] Rosenau F, Isenhardt S, Gdynia A, Tielker D, Schmidt E, Tielen P, et al. Lipase LipC affects motility, biofilm formation and rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Lett 2010;309:25–34. <u>http://dx.doi.org/</u> <u>10.1111/j. 1574-6968.2010.02017.x.</u>
- [75] Zhao F, Mandlaa M, Hao J, Liang X, Shi R, Han S, et al. Optimization of culture medium for anaerobic production of rhamnolipid by recombinant *Pseudomonas stutzeri* Rhl for microbial enhanced oil recovery. Lett Appl Microbiol 2014;59:231–7. <u>http://dx.doi.org/10.1111/lam.12269</u>.
- [76] Solaiman DKY, Ashby RD, Gunther NW, Zerkowski Ja. Dirhamnose-lipid production by recombinant nonpathogenic bacterium *Pseudomonas chlororaphis*. Appl Microbiol Biotechnol 2015. <u>http://dx.doi.org/10.1007/s00253-015-6433-</u> 4.
- [77] Solaiman DKY, Ashby RD, Crocker N, Lai B-H, Zerkowski Ja. Rhamnolipid and poly(hydroxyalkanoate) biosynthesis in 3-hydroxyacyl-ACP:CoA transacylase (phaG)-knockouts of *Pseudomonas chlororaphis*. Biocatal Agric Biotechnol 2014;3:159–66. <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2013.09.009</u>.
- [78] Kaur S, Saad O, Xu K. WO 2009140242 A1.pdf, 2009.
- [79] Cabrera-Valladares N, Richardson AP, Olvera C, Treviño LG, Déziel E, Lépine F, et al. Monorhamnolipids and 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanoic acids (HAAs) production using *Escherichia coli* as a heterologous host. Appl Microbiol Biotechnol 2006;73:187–94. <u>http://dx.doi.org/10.1007/s00253-006-0468-5</u>.
 [80] Han L, Liu P, Peng Y, Lin J, Wang Q, Ma Y. Engineering the biosynthesis of novel
- [80] Han L, Liu P, Peng Y, Lin J, Wang Q, Ma Y. Engineering the biosynthesis of novel rhamnolipids in *Escherichia coli* for enhanced oil recovery. J Appl Microbiol 2014;117:139–50. <u>http://dx.doi.org/10.1111/jam.12515</u>.
- [81] Mercade ME, Manresa Ma, Robert M, Espuny MJ, De Andres C, Guinea J. Olive oil mill effluent (OOME). New substrate for biosurfactant production. Bioresour Technol 1993;43:1–6. <u>http://dx.doi.org/10.1016/0960-8524(93)90074-L</u>.
- [82] Ochsner UA, Koch AK, Fiechter A, Reiser J. Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas* aeruginosa. J Bacteriol 1994;176:2044–54.
- [83] Ernst H. The use of patent data for technological forecasting: the diffusion of CNC-technology in the machine tool industry. Small Bus Econ 1997;9:361–81. <u>http://dx.doi.org/10.1023/A:1007921808138.</u>
- [84] Meyer P. Bi-logistic growth. Technol Forecast Soc Change 1994;47:89–102. http://dx.doi.org/10.1016/0040-1625(94)90042-6.
- [85] Chakrabarty Ananda M, Karns Jeffrey S BS. Pseudomonas bacteria, emulsifying composition comprising Pseudomonas bacteria and method of producing a composition comprising Pseudomonas bacteria. EP19850104565 19850416, 1985.
- [86] L KOG. Microbiological rhamnolipid surfactant prepn. by continuously cultivating Pseudomonas species microorganisms under submerged aerobic conditions with limitation or growth. EP135099A2, 1985.
- [87] Daniels, Lacy, Coralville I, Linhardt, Robert J, Iowa City I, Bryan, Barbara A, Glenview I, Mayerl, Friedrich, Thonex C, Pickenhagen, Wilhelm, Chavannesdes-Bois C. Method for producing rhamnose United States 1990.
- [88] W DLLRJBBAMFP. Rhamnose and 3hydroxydecanoic acid prodn by hydrolysis of rhamnolipid produced by Pseudomonas strain. EP282942-A, 1988.
 [89] Werner Dr. 6240 Koenigstein De Aretz UD 6230 FDH. Inducing rhamno:lipid
- [89] Werner Dr. 6240 Koenigstein De Aretz OD 6230 FDH. Inducing frammonipud synthesis in Pseudomonas aeruginosa – with glyceric acid ether lipid, to form intermediate for rhamnose which is used in synthesis of chiral cpds., 1993.
- [90] L J. Production of biological products e.g. biosurfactants, viscous biopolymers, proteins and enzymes under aerobic or anaerobic conditions using an alternative oxidant source other than oxygen. WO200029604-A, 2000.
- [91] Araujo Kronemberger Frederico De, FREIRE Denise Maria GUIMARÃES, De Castro Aline Machado, Santa Anna Lidia Maria Melo BCP. Sistema para obtenção de bioprodutos, 2012.

- [92] L KNMDACDMJAPR. Solid state fermentation method for production of rhamnolipids, involves using strains of Pseudomonas species. BR200701366-A2, 2009.
 [93] Giani C, Wullbrandt D, Rothert R MJ. Pseudomonas aeruginosa and its use in a
- process for the biotechnological preparation of L-rhamnose. US 5501966 A, 1996.
- [94] Strelec T, Cabrera Gomes JG, Keico Taciro M, Da Cruz Pradella JG. Rhamnolipids producing method for use in field of bioremediation, cosmetics and pharmaceuticals, involves using bacterial strains, where carbohydrates, such as disaccharides or polysaccharides are hydrolysed into glucose or fructose. BR200705327A2, n.d.
- [95] Dr. Schaffer Steffen, Nadine Stein, Anja Thiessenhusen DWM. Zellen und Verfahren zur Herstellung von Rhamnolipiden, 2012.
- [96] Huisman GW, Wonink E, Meima R, Kazemier B, Terpstra P. Poly(3-hydroxyalk-anoates) (PHAs) by *Pseudomonas oleovorans*. Biochemistry 1991;2191–8.
 [97] Schaffer S, Thiessenhusen AWM. New cell capable of forming rhamnolipid
- [97] Schaffer S, Thiessenhusen AWM. New cell capable of forming rhamnolipid compound, which is useful for the production of cosmetic, dermatological or pharmaceutical formulations, of plant protection formulations and of care and cleaning agents and surfactant concentrates. DE102012201360, 2013.
- [98] Blank L, Rosenau F, Wilhelm S, Wittgens ATT. Means and Methods for Rhamnolipid Production; 2013.