CRISTIANE YURI HONNA

Obtenção e análise de mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* afetados na biossíntese de ramnolipídeos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2013

CRISTIANE YURI HONNA

Obtenção e análise de mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* afetados na biossíntese de ramnolipídeos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Honna, Cristiane Yuri.

Obtenção e análise de mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* afetados na biossíntese de ramnolipídeos / Cristiane Yuri Honna. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Obtenção de bioprodutos bacterianos: Biossurfactantes e PHA.

Versão do título para o inglês: Obtaining and analysis of mutants of *Pseudomonas aeruginosa* affected in rhamnolipids biosynthesis.

1. *Pseudomonas aeruginosa* 2. Biossurfactantes 3. Ramnolipídeo
4. Mutação por transposon I. Gomez, Prof. Dr. José Gregório Cabrera
II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0137/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Cristiane Yuri Honna.

Título da Dissertação: Obtenção e análise de mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* afetados na biossíntese de ramnolipídeos.

Orientador(a): Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 447/11 referente ao projeto intitulado: *“Obtenção e análise de mutantes de Pseudomonas aeruginosa afetados na biossíntese de polihidroxicanoatos ou ramnolipídios e avaliação da melhora na eficiência de produção desses compostos”* sob a responsabilidade de **Cristiane Yuri Honna**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 23 de março de 2011.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Aos meus pais, a toda a minha família e aos meus amigos,

pelo ajuda, paciência e companheirismo.

Vocês são a minha inspiração para continuar sonhando.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez, por me acolher em seu laboratório e pela oportunidade de fazer esse trabalho. Muito obrigada por todo o conhecimento, pela paciência, pela orientação e por todos os momentos que passei em seu laboratório.

À Dr^a. Prof^a. Luiziana Ferreira da Silva, pelos conselhos, por toda a ajuda e paciência que teve comigo ao longo desses anos de mestrado.

À Prof^a. Dr^a. Regina Lúcia Baldini, do Departamento de Bioquímica da Universidade de São Paulo, pela ajuda e pela disponibilização da linhagem *Escherichia coli* SM10 pir/pIT2 (IS*lacZ*/hah) abrigando o transposon utilizado neste trabalho

Ao Prof. Dr. Nilton Lincopan Huenuman do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo pelo auxílio e orientação na realização do antibiograma, apresentado neste trabalho.

Ao ICB e à USP, por me proverem toda a estrutura que necessitei para minha formação e desenvolvimento.

À minha família, que sempre esteve ao meu lado, aos meus pais, Rosa e Masakatu, minhas irmãs, Priscila e Cinthia, por todo apoio e incentivo. Só cheguei até aqui porque todos vocês estiveram sempre ao meu lado.

Em especial, agradeço a todos os companheiros de laboratório. Com certeza levarei sempre comigo todos os momentos, todos os conselhos, dicas, noites de muito trabalho, pizzas e reuniões de laboratórios! Eu realmente aprendi muito com cada um de vocês. Valeu galera!

Aos "vizinhos", por toda a ajuda e momentos inesquecíveis.

Aos meus amigos que, apesar de não estarem no laboratório, sempre estiveram comigo nos momentos bons e ruins que passei durante esse período. Vocês fazem a diferença na minha vida!

Finalmente, gostaria de agradecer à Capes pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

RESUMO

HONNA, C. Y. **Obtenção e análise de mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* afetados na biossíntese de ramnolipídeos**. 2013. 74 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Biossurfactantes são compostos tenso-ativos obtidos a partir do metabolismo de certos microrganismos. São compostos diversificados e devido as suas características químicas e biológicas podem ser empregados em setores como o industrial, ambiental, médico, entre outros, com a vantagem de serem ambientalmente amigáveis, biodegradáveis e poderem ser obtidos utilizando-se matérias primas renováveis. Dentre os biossurfactantes destacam-se os ramnolipídeos (RLs): compostos glicolipídicos contendo uma ou duas moléculas de ramnose, ligadas e uma ou duas moléculas de ácido graxo β -hidroxi, produzidos principalmente por *Pseudomonas aeruginosa*. Apesar das vantagens dos RLs frente aos surfactantes convencionais, advindo do petróleo, sua larga utilização ainda encontra empecilhos nos processos de produção, que os torna mais caros e menos competitivos. Visando a otimização e a melhor elucidação dos bioprocessos envolvidos na produção de RLs, o presente trabalho teve como objetivo a obtenção de mutantes afetados na biossíntese de RLs e de polihidroxialcanoatos (PHAs), uma vez que a bioprodução desses dois compostos competem por intermediários metabólicos. Foram obtidas linhagens mutantes de *P. aeruginosa* LFM634 utilizando o transposon ISlacZ/hah após conjugação da linhagem de *Escherichia coli* SM10 pir/pIT2 (ISlacZ/hah). Dos 9840 mutantes obtidos foram selecionados 196 afetados na biossíntese de PHAs e/ou RLs. Após análises de cultivos em meio mineral líquido, contendo como fonte de carbono glicose ou óleo de soja, foi realizada uma segunda seleção e, desta vez, foram selecionados os mutantes que apresentaram a capacidade de produção de compostos diferenciados, indicando que diferentes genes relacionados à biossíntese de PHAs e RLs podem ter sido afetados. Nesta segunda seleção foram selecionadas linhagens deficientes na produção de RLs, assim como linhagens superprodutoras (8,3 g/L) em relação à linhagem selvagem (2,1 g/L). Foram selecionadas também duas linhagens (p.09-13 e p. 12-39) para uma melhor caracterização, uma vez que ambas apresentaram deficiência na produção de ramnose mas não de 3-hidroxiácidos. Esta característica peculiar dessas linhagens foi utilizada para o estudo da possibilidade de se modular a composição monomérica deste composto conforme a fonte de carbono utilizada.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*. Biossurfactantes. Ramnolipídeo. Mutação por transposon.

ABSTRACT

HONNA, C. Y. **Obtainment and analysis of *Pseudomonas aeruginosa* mutants affected in rhamnolipids biosynthesis.** 2013. 74 p. Masters thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Biosurfactants are surface active compounds produced by certain microorganisms' metabolism. There are a wide diversity of these compounds and because of their chemical and biological characteristics it can have several applications, like industrial, environmental, medical, with the advantage of being environmentally friendly, biodegradable and able to be obtained using renewable raw materials. Among the biosurfactants it can be emphasize the rhamnolipids (RLs): glycolipids compounds containing one or two molecules of rhamnose linked to one or two molecules of β -hydroxy fatty acid produced mainly by *Pseudomonas aeruginosa*. Although the advantages of RLs against conventional surfactants, produced from oil, its production processes makes them more expensive and less competitive, complicating the widespread use of this compounds. Targeting a better understanding and optimization of bioprocesses involved in the production of RLs, the present work aimed for obtention of mutants affected in the biosynthesis of RLs and polyhydroxyalkanoates (PHAs), once the bioproduction of these two compounds compete for metabolic intermediates. Mutant strains were obtained from *P. aeruginosa* LFM634 using transposon IS*lacZ*/hah after conjugation with strain of *Escherichia coli* SM10 pir/pIT2 (IS*lacZ*/hah). Among 9840 mutants obtained were selected 196 affected in PHAs and/or RLs biosynthesis. After analyzing cultures in liquid mineral medium containing glucose or soybean oil as carbon source, a second selection was made, and this time, mutants that exhibited the ability to produce different compounds were selected, indicating that different genes related to biosynthesis of PHAs and RLs may have been affected. In this second selection deficient strains in the production of RLs, as well as highly productive strains (8.3 g/L) compared to the wild type strain (2.1 g/L) were selected. Two strain also have been choose (P.09-13 and p. 12-39) for further characterization, since both showed deficiency in the production of rhamnose but not 3-hydroxy. This peculiar characteristic of these strains was used to study the possibility of modulating the RLs produced by them.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*. Biosurfactants. Rhamnolipids. Mutation by transposon.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
3.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
3.2 Ramnolipídeos.....	14
3.2.1 <i>Estrutura química dos Ramnolipídeos</i>.....	15
3.2.2 <i>Aplicação dos Ramnolipídeos</i>	18
3.2.3 <i>Biossíntese de Ramnolipídeos</i>	19
3.3 Polihidroxialcanoatos	22
3.4 Interrelação das vias biossintéticas de ramnolipídeos e PHAs.....	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 Microrganismos	25
4.2 Meios Utilizados.....	25
4.2.1 <i>Meios Minerais</i>	25
4.2.2 <i>Meio de Pinzon e Ju (2009 a,b)</i>.....	26
4.3 Verificação da resistência da linhagem LFM634 ao antibiótico tetraciclina.....	27
4.4 Obtenção de mutantes	27
4.5 Avaliação da produção de PHAs e ramnolipídeos.....	28
4.5.1 <i>Avaliações visuais</i>	28
4.5.2 <i>Metodologias analíticas</i>	28
4.5.2.1 <i>Análises de PHAs</i>.....	29
4.5.2.2 <i>Análises de ramnolipídeos</i>.....	29
4.6 Antibiograma	30
4.7 Identificação dos genes afetados.....	31
4.7.1 <i>Extração do DNA genômico</i>.....	31
4.7.2 <i>Reações de amplificações (PCR) e primers</i>	31
4.7.3 <i>Reações de sequenciamento</i>	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 Avaliação da sensibilidade da linhagem LFM634 ao antibiótico tetraciclina.....	35
5.2 Antibiograma	36
5.3 Obtenção dos mutantes	39

5.4 Seleção de mutantes afetados na síntese de PHAs e/ou ramnolipídeos	40
5.5 Análise da produção de ramnolipídeos e PHAs por mutantes	42
5.6 Mutantes p09-13 e p12-39	49
5.7 Sequenciamentos.....	55
6 CONCLUSÃO.....	59
REFERÊNCIAS	61
APÊNDICE A.1 - - Produção e caracterização de ramnolipídeos e polihidroxicanoatos por mutantes de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LFM 634, utilizando glicose como fonte de carbono (20g/L).....	69
APÊNDICE A.1 Produção e caracterização de ramnolipídeos e polihidroxicanoatos por mutantes de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LFM 634, utilizando óleo de soja como fonte de carbono (20g/L).....	72

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Com a crescente preocupação sobre as questões ambientais, e com a possibilidade do esgotamento das reservas mundiais de petróleo, esforços no sentido de procurar alternativas novas e ambientalmente amigáveis, independentes da indústria petroquímica, vem ganhando força. Um dos produtos fortemente presentes em nosso cotidiano e que se encaixa nesse panorama são os surfactantes.

Compostos tensoativos provenientes do metabolismo de microrganismos são chamados biossurfactantes. Esses compostos podem ser obtidos a partir de substratos biodegradáveis e muitas vezes de baixo custo, podendo até mesmo serem resíduos industriais e agrícolas. Os biossurfactantes apresentam ótimo desempenho quando comparados aos surfactantes químicos, e por isso são considerados com possíveis substitutos destes (BANAT et al., 2010; NITSCHKE; PASTORE, 2003; ZHANG; MILLER, 1992).

Dentre as classes de biossurfactantes podemos destacar os glicolipídeos: compostos formados pela combinação de carboidratos com ácidos alifáticos de cadeia longa ou ácidos hidroxialifáticos. Os mais conhecidos e estudados dos glicolipídeos são os ramnolipídeos (RLs) (REHM, 2008).

Os RLs são glicolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* como um dos produtos secundários de seu metabolismo. São formados por uma (monorramnolipídeo) ou duas moléculas de ramnose (dirramnolipídeo), ligadas e uma ou duas moléculas de ácido 3-hidroxi-alcanóico (3HAs) (ABDEL-MAWGOUD; LÉPINE; DÉZIEL, 2010; LANG; WULLBRANDT, 1999).

Os RLs têm diversas aplicações, como por exemplo, podem ser fontes de L-Ramnose (LINHARDT, BAKHIT; DANIELS, 1989), composto utilizado na indústria de essências; na indústria farmacêutica; na medicina; na indústria petroquímica; no controle de pragas e na indústria de alimentos. (ABDEL-MAWGOUD; LÉPINE; DÉZIEL; 2010; BANAT et al., 2010; LINHARDT; BAKHIT; DANIELS, 1989; MAIER; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2000; NITSCHKE; COSTA, 2007; NITSCHKE; COSTA; CONTIERO, 2011; RODRIGUES et al., 2006).

Em termos de produção industrial, os RLs são considerados a classe de biotensoativos mais promissora pois, além da possibilidade de serem obtidos em concentrações elevadas,

ainda apresentam características físico-químicas e biológicas únicas (NITSCHKE ; COSTA; CONTIEIRO, 2005).

O grande empecilho para a utilização e comercialização em grande escala dos RLs é o custo, uma vez que a produção de 20-100 m³ de RLs, em biorreator, custa em média de 5 a 20 dólares por quilograma, enquanto que a produção industrial de surfactantes químicos gira em torno de 1 a 3 dólares por quilograma (LANG, WULLBRANDT, 1999). Essa desvantagem pode ser superada principalmente nos casos em que os benefícios do uso dos RLs são maiores do que os custos de sua produção, e também considerando que os RLs detêm características e ações únicas, não observadas nos surfactantes tradicionais.

Em vista do grande potencial apresentado pelos RLs, o presente trabalho teve como intuito a obtenção de mutantes afetados na biossíntese de RLs, e a verificação dos efeitos dessas mutações para que um melhor entendimento da síntese desses compostos pudesse ser obtido.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo global a obtenção de mutantes da linhagem *Pseudomonas aeruginosa* LFM634, utilizando o transposon *ISlacZ/hah*, afetados da biossíntese de polihidroxialcanoatos (PHAs) ou ramnolipídeos (RLs), a fim de elucidar os efeitos dessas mutações na produção desses compostos.

Para alcançar o objetivo global do trabalho, foram seguidos os seguintes objetivos específicos:

- Avaliação da suscetibilidade da linhagem selvagem aos antibióticos utilizados e escolha do melhor método de obtenção de mutantes;
- Conjugação da linhagem selvagem com linhagem de *Escherichia coli* SM10 pir/pIT2 (*ISlacZ/hah*), a fim de obter mutantes afetados na biossíntese de PHAs ou RLs;
- Caracterização da produção e da composição de PHAs e RLs pela linhagem selvagem LFM634 com duas fontes de carbono distintas: óleo de soja e glicose;
- Seleção dos mutantes afetados na produção de PHAs e RLs;
- Caracterização da produção e da composição de PHAs e RLs dos mutantes obtidos com duas fontes de carbono distintas: óleo de soja e glicose;
- Seleção dos melhores mutantes e confirmação dos dados obtidos no passo anterior;
- Seleção de mutantes afetados na produção de ramnose, cultivo com cinco óleos vegetais distintos como fonte de carbono e verificação das diferenças na composição dos RLs produzidos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Pseudomonas aeruginosa*

O gênero *Pseudomonas* é um grupo que abrange microrganismos altamente diversos, com grande capacidade e versatilidade biossintética. Esses microrganismos são capazes de colonizar um grande número de nichos, sendo facilmente encontrados em ambientes terrestres e marinhos, assim como em interações com animais e plantas. Essa diversidade do gênero sugere uma grande riqueza genética e adaptativa (KIIL et al., 2008). Dentre as espécies deste gênero, podemos destacar a espécie *Pseudomonas aeruginosa*.

Pseudomonas aeruginosa é uma γ -proteobactéria, Gram negativa e que apresenta seu corpo estruturado na forma de bacilo. Como todas as *Pseudomonas*, é conhecida por sua alta capacidade de adaptação, podendo metabolizar desde moléculas simples até compostos orgânicos complexos, sendo capaz de crescer na presença ou ausência de oxigênio, utilizando, neste último cenário, NO_3^- comoceptor final de elétrons. *P. aeruginosa* pode, ainda, crescer em uma ampla faixa de temperaturas (da temperatura ambiente até 42 °C), tendo seu crescimento máximo à 37 °C. No homem, *P. aeruginosa* é patógeno oportunista, sendo responsável por graves infecções hospitalares em pacientes imunocomprometidos, como os acometidos por queimaduras, fibrose cística, AIDS e câncer. Uma vez que infecções por *P. aeruginosa* se estabelecem, seu controle e erradicação são difíceis (HARDALO; EDBERG, 1997; KIIL et al., 2008).

P. aeruginosa também é conhecida pela capacidade de sintetizar inúmeros produtos de interesse industrial, como enzimas, piocianina, biossurfactantes (ramnolipídeos, viscosina), homo-serina lactonas, exopolissacarídeos (alginato) e polímeros de estoque intracelular (polihidroxialcanoatos - PHAs) (REHM, 2008). Aliada a essa gama de produtos, *P. aeruginosa* possui seu genoma completamente sequenciado (linhagens PAO1, PA14 e outras 9) (KIIL et al., 2008), o que a tornou um organismo modelo para o estudo de assuntos como a formação de biofilmes (MCDOUGALD et al., 2008) e a produção de alguns produtos de interesse biotecnológico, como é o caso dos ramnolipídeos (RLs) (HENKEL et al., 2012; REHM, 2008).

3.2 Ramnolipídeos

Biossurfactantes são compostos tensoativos produzidos por alguns microrganismos por meio de sua maquinaria biossintética. Esses compostos vêm atraindo cada vez mais interesse

por serem produtos gerados por vias independentes de processos petroquímicos, o que os torna prováveis substitutos para os tensoativos sintéticos, principalmente quando notícias sobre o esgotamento das atuais reservas mundiais de petróleo se tornam cada vez mais frequentes, assim como o aumento da consciência dos consumidores sobre as questões ambientais envolvidas no uso destes produtos (BANAT et al., 2010; NITSCHKE; PASTORE, 2003; RODRIGUES et al., 2006). A Tabela 1 resume as principais classes de biossurfactantes produzidos e os microrganismos produtores.

Tabela 1 - Principais classes de biossurfactantes sintetizados e os microrganismos produtores.

Tipo de Biossurfactante	Microrganismo
Glicolipídios	
- ramnolipídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
- soforolipídios	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apicola</i>
- trehalolipídios	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium sp.</i>
Lipopeptídios e lipoproteínas	
- Peptídio-lipídio	<i>Bacillus licheniformis</i>
- Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
- Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
- Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
- Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
- Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
- Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos graxos, lipídios neutros e fosfolipídios	
- Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
- Lipídios neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
- Fosfolipídios	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos	
- emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- liposan	<i>Candida lipolytica</i>
- carboidrato-lipídio-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
- manana-lipídio-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
Surfactantes particulados	
- vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- células	Várias bactérias

No texto, todos os elementos contendo "lipídio(s)" estão escritos como "lípeo(s)". Fonte: Nitschke e Pastore (2002).

Dentre as classes de biossurfactantes podemos destacar os glicolipídeos: compostos formados pela combinação de carboidratos com ácidos alifáticos de cadeia longa ou ácidos hidroxi-alifáticos. Os mais conhecidos e estudados glicolipídeos são os ramnolipídeos (RLs) (REHM, 2008).

3.2.1 Estrutura química dos Ramnolipídeos

Os RLs são glicolipídeos formados por uma (monorramnolipídeo) ou duas moléculas de ramnose (dirramnolipídeo), ligadas a uma ou duas moléculas de ácido 3-hidroxi-alcanoico (3HAs) (Figura 1). A ligação entre as duas moléculas de 3HAs é feita por uma ligação do tipo éster, originando a molécula 3-(3-hidroxi-alcanoiloxi)-alcanoato (HAA) (DÉZIEL et al.,

2003), estas são, então, ligadas à uma molécula de ramnose por uma ligação O-glicosídica (monorramnolipídeo); caso seja incorporado mais uma molécula de ramnose (dirramnolipídeo), se estabelecerá uma ligação α -1,2-glicosídica. A ação biotensoativa dos RLs se dá pela estrutura anfifílica de sua molécula, na qual se observa uma porção hidrofílica (ramnose) e um porção hidrofóbica (3HAs) (ABDEL-MAWGOUD; LÉPINE; DÉZIEL, 2010; LANG; WULLBRANDT, 1999; PINZON; JU, 2009 a).

Figura 1 - Estrutura química do monorramnolipídeo, dirramnolipídeo e do ácido graxo 3-(3-hidroxi- α -alcanoil-oxi)- α -alcanoato (HAA).

Fonte: Soberón-Chávez, Lépine e Déziel (2005).

Os RLs são produzidos principalmente por *Pseudomonas aeruginosa*, porém várias outras espécies são capazes de produzir esse composto, como por exemplo várias espécies de *Burkholderia*, *Renibacterium salmoninarum*, *Tetragenococcus koreensis*, *Myxococcus* sp, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pantoea* sp, outras espécies de *Pseudomonas*, entre outras, como revisado por Abdel-Mawgoud, Lépine e Déziel (2010).

Dados da literatura reportam que os RLs produzidos por *P. aeruginosa* são misturas de mono e dirramnolipídeos (RENDELL et al., 1990) de composição monomérica predominante de RL1(Rha₂C₁₀C₁₀), RL2(RhaC₁₀C₁₀), RL3(Rha₂C₁₀), RL4(RhaC₁₀) (Figura 2), porém, metodologias analíticas mais avançadas possibilitaram, ao longo do século vinte, a descoberta de novos tipos de RLs. Em revisão atual, Abdel-Mawgoud, Lépine e Déziel (2010) identificaram cerca de 60 tipos diferentes de RLs (Figura 3), demonstrando a diversidade de compostos possíveis de serem gerados por esses microrganismos.

Figura 2 - Estrutura química dos homólogos de ramnolipídeos mais comuns.

Fonte: Modificado de Nitschke, Costa e Contieiro (2005).

Figura 3 - Estrutura química dos diferentes congêneros e homólogos de ramnolipídeos identificados.

Nº	SÍMBOLO	FÓRMULA	M. P. M.	R ₁	n ₁	n ₂	R ₂	ESTRUTURA
Congênero Mono-ramno-mono-lipídico								
1	Rha-C ₈	C ₁₄ H ₂₆ O ₇	302.32	H	1(-4H)	-	H	
2	Rha-C ₉	C ₁₅ H ₂₈ O ₇	306.35	H	1	-	H	
3	Rha-C ₁₀	C ₁₆ H ₃₀ O ₇	334.41	H	3	-	H	
4	Rha-C _{12:2}	C ₁₈ H ₃₀ O ₇	358.43	H	5(-4H)	-	H	
5	Rha-C ₁₂	C ₁₈ H ₃₂ O ₇	362.46	H	5	-	H	
6	Rha-C _{14:2}	C ₂₀ H ₃₄ O ₇	386.48	H	7(-4H)	-	H	
Congênero Mono-ramno-di-lipídico								
7	Rha-C ₈ -C ₈	C ₂₂ H ₄₀ O ₉	448.55	H	1	1	H	
8	Rha-C ₈ -C _{10:1}	C ₂₄ H ₄₂ O ₉	474.58	H	1	3(-2H)	H	
9	Rha-C _{10:1} -C ₈	C ₂₄ H ₄₂ O ₉	474.58	H	3(-2H)	1	H	
10	Rha-C ₈ -C ₁₀	C ₂₄ H ₄₄ O ₉	476.60	H	1	3	H	
11	Rha-C ₁₀ -C ₈	C ₂₄ H ₄₄ O ₉	476.60	H	3	1	H	
12	Rha-C ₁₀ -C _{10:1}	C ₂₆ H ₄₆ O ₉	502.64	H	3	3(-2H)	H	
13	Rha-C ₁₀ -C ₁₀	C ₂₆ H ₄₆ O ₉	504.65	H	3	3	H	
14	Rha-C ₈ -C ₁₂	C ₂₆ H ₄₆ O ₉	504.65	H	1	5	H	
15	Rha-C ₁₂ -C ₈	C ₂₆ H ₄₆ O ₉	504.65	H	5	1	H	
16	Rha-C ₁₀ -C _{12:1}	C ₂₈ H ₅₀ O ₉	530.69	H	3	5(-2H)	H	
17	Rha-C _{12:1} -C ₁₀	C ₂₈ H ₅₀ O ₉	530.69	H	5(-2H)	3	H	
18	Rha-C ₁₀ -C ₁₂	C ₂₈ H ₅₂ O ₉	532.71	H	3	5	H	
19	Rha-C ₁₂ -C ₁₀	C ₂₈ H ₅₂ O ₉	532.71	H	5	3	H	
20	Rha-C ₁₀ -C _{14:1} ^a	C ₃₀ H ₅₄ O ₉	558.74	H	3	7(-2H)	H	
21	Rha-C ₁₂ -C _{12:1} ^a	C ₃₀ H ₅₄ O ₉	558.74	H	5	5(-2H)	H	
22	Rha-C ₁₀ -C ₁₄	C ₃₀ H ₅₆ O ₉	560.76	H	3	7	H	
23	Rha-C ₁₂ -C ₁₂	C ₃₀ H ₅₆ O ₉	560.76	H	5	5	H	
24	Rha-C ₁₂ -C ₁₄	C ₃₀ H ₅₈ O ₉	588.81	H	5	7	H	
25	Rha-C ₁₄ -C ₁₄	C ₃₀ H ₅₈ O ₉	616.87	H	7	7	H	
26	Rha-C ₁₄ -C ₁₆	C ₃₂ H ₆₀ O ₉	644.92	H	7	9	H	
27	Rha-C ₁₆ -C ₁₆	C ₃₂ H ₆₀ O ₉	672.97	H	9	9	H	
28	Rha-C ₁₀ -C ₁₀ -CH ₃	C ₂₇ H ₄₈ O ₉	518.68	H	3	3	CH ₃	
29	Decenoyl-Rha-C ₁₀ -C ₁₀	C ₂₈ H ₄₈ O ₉	656.89	b	3	3	H	
Congênero Di-ramno-mono-lipídico								
30	Rha-Rha-C ₈	C ₂₂ H ₃₈ O ₁₁	452.49	H	1	-	H	
31	Rha-Rha-C ₁₀	C ₂₂ H ₄₀ O ₁₁	480.55	H	3	-	H	
32	Rha-Rha-C _{12:1}	C ₂₄ H ₄₀ O ₁₁	506.58	H	5(-2H)	-	H	
33	Rha-Rha-C ₁₂	C ₂₄ H ₄₂ O ₁₁	508.60	H	5	-	H	
34	Rha-Rha-C ₁₄	C ₂₆ H ₄₆ O ₁₁	536.65	H	7	-	H	
Congênero Di-ramno-di-lipídico								
35	Rha-Rha-C ₈ -C ₈	C ₂₈ H ₅₀ O ₁₃	594.69	H	1	1	H	
36	Rha-Rha-C ₈ -C ₁₀	C ₂₈ H ₅₂ O ₁₃	622.74	H	1	3	H	
37	Rha-Rha-C ₁₀ -C ₈	C ₂₈ H ₅₂ O ₁₃	622.74	H	3	1	H	
38	Rha-Rha-C ₁₀ -C _{10:1}	C ₃₀ H ₅₄ O ₁₃	648.78	H	3	3(-2H)	H	
39	Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₀	C ₃₀ H ₅₆ O ₁₃	650.79	H	3	3	H	
40	Rha-Rha-C ₈ -C _{12:1}	C ₃₂ H ₅₈ O ₁₃	648.78	H	1	5(-2H)	H	
41	Rha-Rha-C _{12:1} -C ₈	C ₃₂ H ₅₈ O ₁₃	648.78	H	5(-2H)	1	H	
42	Rha-Rha-C ₁₀ -C _{12:1}	C ₃₄ H ₆₀ O ₁₃	676.83	H	3	5(-2H)	H	
43	Rha-Rha-C _{12:1} -C ₁₀	C ₃₄ H ₆₀ O ₁₃	676.83	H	5(-2H)	3	H	
44	Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₂	C ₃₄ H ₆₂ O ₁₃	678.84	H	3	5	H	
45	Rha-Rha-C ₁₂ -C ₁₀	C ₃₄ H ₆₂ O ₁₃	678.84	H	5	3	H	
46	Rha-Rha-C ₁₀ -C _{14:1}	C ₃₆ H ₆₄ O ₁₃	704.89	H	3	7(-2H)	H	
47	Rha-Rha-C ₁₂ -C _{14:1}	C ₃₆ H ₆₄ O ₁₃	704.89	H	5	5(-2H)	H	
48	Rha-Rha-C _{12:1} -C ₁₂	C ₃₆ H ₆₄ O ₁₃	704.89	H	5(-2H)	5	H	
49	Rha-Rha-C ₁₂ -C ₁₂	C ₃₆ H ₆₆ O ₁₃	706.90	H	5	5	H	
50	Rha-Rha-C ₁₂ -C ₁₄	C ₃₆ H ₆₈ O ₁₃	734.95	H	5	7	H	
51	Rha-Rha-C ₁₄ -C ₁₂	C ₃₆ H ₆₈ O ₁₃	734.95	H	7	5	H	
52	Rha-Rha-C ₁₄ -C ₁₄	C ₃₆ H ₇₀ O ₁₃	763.00	H	7	7	H	
53	Rha-Rha-C ₁₆ -C ₁₆	C ₃₆ H ₇₀ O ₁₃	791.06	H	9	9	H	
54	Rha-Rha-C ₁₆ -C ₁₄	C ₃₈ H ₇₂ O ₁₃	791.06	H	9	7	H	
55	Rha-Rha-C ₁₆ -C ₁₆	C ₃₈ H ₇₂ O ₁₃	819.11	H	9	9	H	
56	Rha-Rha-C ₁₄ -C ₁₄ -C ₁₄ ^(b)	C ₃₄ H ₁₀₀ O ₁₅	989.36	Structure drawn separately ^(b)				
57	Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₀ -CH ₃	C ₃₃ H ₆₀ O ₁₃	664.82	H	3	3	CH ₃	
58	Decenoyl-Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₀	C ₄₂ H ₇₄ O ₁₄	803.03	b	3	3	H	

Nota: abreviaturas: C_{x:1}- cadeia de ácido graxo de comprimento X com uma insaturação (-2H); C_{x:2} - cadeia de ácido graxo de comprimento X com duas insaturações (-4H); *Rha*- porção α-L-ramnosil; *b*- porção de α-decanoil retirado de congênero mono-ramno-di-lipídico; *d*- estrutura de di-RL triacilado produzido por *Burkholderia plantarii* (ANDRÃ et al., 2006 apud ABDEL-MAWGOUD; LÉPINE; DÉZIEL, 2010); ^a - a ordem exata da cadeia de ácidos graxos não foi definida diretamente pelo autor.

Fonte: Abdel-Mawgoud, Lépine e Déziel (2010).

3.2.2 Aplicações dos *Rhamnolipídeos*

Os RLs apresentam características interessantes que lhes conferem vantagens sobre os surfactantes convencionais como: maior eficiência e efetividade da atividade superficial e interfacial, diminuindo a tensão superficial com menores quantidades de biossurfactantes; tolerância e estabilidade em condições de temperatura, pH e força iônica mais extremas; biodegradabilidade em solos e água; baixa toxicidade e maior biocompatibilidade; a produção pode ser obtida com o uso de matérias-primas renováveis e de baixo custo, o que pode contribuir com a problemática da poluição ambiental; e origem biológica, independente do petróleo (ABDEL-MAWGOUD, LÉPINE, DÉZIEL, 2010; CAMEOTRA; MAKKAR, 1998; LANG; WULLBRANDT, 1999; NITSCHKE; PASTORE, 2002; NITSCHKE; PASTORE, 2003; NITSCHK; COSTA; CONTIERO, 2010; ZHANG; MILLER, 1992).

A produção de RLs pode servir como fonte de L-Ramnose (LINHARDT; BAKHIT; DANIELS, 1989), composto de grande interesse industrial por ser precursor de essências. Potencialmente, L-Ramnose pode ser utilizada como componentes quirais na síntese química (LANG; WULLBRANDT, 1999). Os RLs podem ainda ser usados: para a biorremediação de áreas afetadas por derramamentos de petróleo, pesticidas e metais pesados; para limpeza de reservatórios de óleos; recuperação de petróleo, auxiliando na maior recuperação do produto; em formulações para pesticidas e herbicidas; na mineração, para a flotação e separação de minérios; na fabricação de produtos de higiene e cosméticos; como agentes espessantes e emulsificantes de alimentos; na medicina, como agentes anti-adesivos para uso em próteses e sondas; e como fonte de substâncias com ação antimicrobiana (ABDEL-MAWGOUD; LÉPINE; DÉZIEL, 2010; BANAT et al., 2010; LANG; WULLBRANDT, 1999; NITSCHKE; COSTA, 2007; NITSCHKE; PASTORE, 2002; NITSCHKE; COSTA; CONTIERO; 2011; RODRIGUES et al., 2006; MAIER;SOBERÓN-CHÁVEZ, 2000).

Os RLs são considerados a classe de biotensoativos mais promissores em termos de produção industrial, por suas características físico-químicas e biológicas únicas, além de serem obtidos em concentrações mais elevadas quando comparado a outros biossurfactantes, contribuindo para a difusão do uso destas moléculas, principalmente quando os custos da produção são inferiores aos benefícios obtidos (NITSCHKE; COSTA; CONTIEIRO, 2005). Em um levantamento realizado por Henkel et al.(2012), várias linhagens de *P. aeruginosa* foram revisadas quanto a capacidade de produção de RLs e observou-se que algumas linhagens eram capazes de produzir altas concentrações de RLs, cerca ou acima de 40 g/L

(linhagem DSM 7107 – 78g/L de RLs; e PA01 – 39g/L de RLs) quando cultivadas em biorreator utilizando óleos vegetais como fonte de carbono.

Apesar das vantagens e de suas múltiplas aplicações, a produção comercial de RLs ainda enfrenta dificuldades para competir com os surfactantes químicos devido aos elevados custos de produção. O custo de produção de 20-100 m³ de RLs, em biorreator, é de 5 a 20 dólares por quilograma, enquanto que a produção industrial de surfactantes químicos gira em torno de 1 a 3 dólares por quilograma (LANG; WULLBRANDT, 1999). A fim de superar esse problema, ações com o intuito de otimizar a produção de RLs utilizando fontes renováveis e baratas como fontes de carbono estão sendo realizadas. Busca de métodos mais modernos e eficientes de tratamento e processamento para a purificação do RLs, assim como a obtenção de linhagens bacterianas mutantes super-produtoras capazes de crescer em uma grande gama de substratos baratos e renováveis também podem ajudar no sucesso comercial da produção dos RLs (BANAT et al., 2010; MAIER; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2000).

3.2.3 Biossíntese de Ramnolipídeos

RLs são metabólitos secundários produzidos por *P. aeruginosa* e, por isso, são sintetizados somente quando as células entram na fase estacionária de seu crescimento (COSTA et al., 2009; HAUSER; KARNOVSKY, 1954; MEDINA, JUÁREZ; SOBERÓN-CHAVEZ, 2003). A produção de RLs é regulada por fatores genéticos e ambientais. A biossíntese de RLs ocorre em três reações sequenciais (Figura 4). Primeiramente, RhlA catalisa a formação de uma ligação éster entre os intermediários de ácidos graxos, 3-hidroxicil-ACP, formando o 3-(3-hidroxicilcanoiloxi)-alcanoato (HAA), o qual corresponde ao componente lipídico dos RLs (DÉZIEL et al., 2003; ZHU ROCK, 2008.). Logo em seguida, a ramnosiltransferase I (RhlB) cataliza a formação de monorramnolipídeo utilizando como precursores (dTDP)-L-ramnose e HAA, unido-os por uma ligação O-glicosídica (HAUSER; KARNOVSKY, 1954; EDWARDS; HAYAHI, 1965; OSCHNER et al., 1994a; RAHIM et al., 2001). Pela ação de RhlC é adicionado a esse complexo mais um grupo ramnosil, utilizando com precursor outro (dTDP)-L-ramnose, por uma ligação α -1,2-glicosídica, formando o dirramnolipídeo (Figura 4) (EDWARDS; HAYAHI, 1965; RAHIM et al., 2001). No genoma de *P. aeruginosa* os genes *rhlAB* estão em um operon, enquanto que o gene *rhlC*, responsável pela adição do segundo grupo ramnosil ao monorramnolipídeo, se encontra em uma outra posição, juntamente com outro gene de função ainda desconhecida (ABDEL-MAWGOUD, LÉPINE; DÉZIEL, 2010; RAHIM et al., 2001). Os principais genes

para a produção de RLs estão organizados em um regulon, sendo que todos os genes estão transcritos na mesma direção, 5'-*rhlABRI*-3' (OCHSNER et al., 1994 a; OCHSNER; FIECHSTER; REISER, 1994 b; OCHSNER; REISER, 1995). A produção de RLs por *P. aeruginosa* está sujeita ainda a outros fatores como o mecanismos de resposta *Quorum Sensing* (QS), fatores de estresse; como falta de nutrientes, alterações no padrão de salinidade, temperatura, entre outros

Figura 4 - Esquema da rota metabólica da produção de ramnolipídeos.

Fonte: Modificado de Soberón-Chávez, Lépine e Déziel (2005).

O QS é o mecanismo do qual o microrganismo se utiliza para responder a certas alterações ambientais. No QS genes específicos são regulados em resposta a concentrações críticas de moléculas sinalizadoras da densidade populacional, gerando respostas multicelulares coordenadas. A resposta QS depende da produção de dois auto-indutores (AIs): *N*-butanoil-homoserina lactona (C_4 HSL) e *N*-3-oxododecanoil-homoserina-lactona (3O- C_{12} -HSL) que ativam, respectivamente, RhlR e LasR. Uma vez ativado, LasR promove a expressão do regulador transcricional RhlR que, ativado pela ligação com seu AI, promove a expressão, dentre outros, do operon *rhlAB* (Figura 5) (MEDINA et al., 2003 a; MEDINA et al., 2003b; MEDINA; JUAREZ; VALDERRAMA, 2003; NAKATA; YOSHIMOTO;

YAMADA, 1998; OCHSNER et al., 1994a; PEARSON; PESCI; IGLEWSKI, 1997; SOBERON-CHAVEZ; LÉPINE; DÉZIEL, 2005; e Revisado por SOBERÓN-CHAVEZ; AGUIRRE-RAMÍREZ; ORDÓÑEZ, 2005)

Figura 5 - Representação esquemática dos genes envolvidos na regulação da produção de ramnolipídeos, *rhlR* e *lasR*.

Nota: os genes *lasA* e *lasB* estão relacionados com a resposta quorum sensing de *P. aeruginosa* e codificam, respectivamente, elastases e proteases.

Fonte: modificado de Soberón-Chávez e Aguirre-Ramírez (2005).

Medina, Juárez e Soberón-Chávez (2003) demonstraram que a expressão de genes do operon *rhlAB* não é controlada somente pela ação de RhlR ligado ao AI, mas também necessita que a célula entre em fase estacionária de crescimento. Esse fato deve estar relacionado com a dependência transcricional parcial do fator sigma RpoS (σ^S). O fator sigma RpoN (σ^N) também parece ter influência positiva sobre a ativação de *rhlI* (HOFFMANN; REHM, 2004), o que mostra que a regulação da produção de RLs é complexa e depende de múltiplos fatores.

As condições de cultivo são importantes para a produção de RLs sendo que quantidades mais expressivas são conseguidas quando a bactéria é cultivada em meio com limitação de pelo menos um elemento essencial (como fósforo ou nitrogênio) e abundância da fonte de carbono (SOBERON-CHAVEZ; LÉPINE; DÉZIEL, 2005). Fatores ambientais e as condições de cultivo como pH, agitação, temperatura, oxigênio disponível, fonte de carbono oferecida, e linhagem utilizada também afetam a produção de RLs (ALMEIDA, 2011; DESAI; BANAT, 1997; SANTOS et al., 2002).

Em revisões recentes, Nitschke, Costa, Contiero (2005) e Henkel et al.(2012) citaram a produção de diferentes linhagens de *Pseudomonas* em diferentes fontes de carbono e formas de cultivo. A Tabela 2 ilustra alguns exemplos obtidos dos trabalhos desses dois grupo, nela podemos observar que as maiores produções de RLs foram obtidas quando foram utilizados óleos como fonte de carbono.

Tabela 2 - Produção de ramnolipídeos por linhagens de *Pseudomonas* utilizando diferentes fontes de carbono e métodos de cultivo.

Fonte de Carbono	Linhagem	RL _{máx} (g/L)
Etanol	IFO 3924	32,0
Glicerol	PA1	6,9
Glicose	DSM2659	1,5
Molases	EBN-8	1,5
n-hexadecano	PA1	1,3
Óleo de Babasu	PA1	2,0
Óleo de Canola	UW-1	11,0
Óleo de Colza	DSM 2874	45,0
Óleo de Girassol	PA01	39,0
Óleo de Milho	DSM 2659	8,9
Óleo de Oliva	DSM 7107	78,0
Resíduo de Ácido Graxo	AT10	9,5
Resíduo de óleo de Fritura	47T2	2,7
Resíduo de óleo de Soja	AT-10	1,1

Nota: RL_{máx}: produção máxima, em g/L de ramnolipídeos.

Fonte: Nitschke, Costa, Contiero (2005) e Henkel et al.(2012).

3.3 polihidroxialcanoatos (PHAs)

P. aeruginosa é capaz de produzir e acumular polímeros (Figura 6) na forma de grânulos intracelulares, os polihidroxialcanoatos (PHAs). Esses grânulos podem atingir até 80% da massa seca bacteriana, e servem como reserva de carbono e equivalentes redutores. Sua produção é verificada quando o microrganismo é cultivado em meio com excesso de fonte de carbono e limitação de ao menos um elemento essencial, como nitrogênio, magnésio, fosfato, entre outros (ANDERSON; DAWES, 1990; BRANDL et al., 1990; e STEINBÜCHEL; VALENTIN, 1995).

Figura 6 - Estrutura esquemática de polihidroxicarboxilatos (PHAs)

Nota: R: pode ser substituído por um átomo de H até 13 átomos de carbono, saturado ou não, cíclico, ou ramificado; n: pode variar de 1 a 4.

Fonte: Matsuda (2009).

Os polihidroxicarboxilatos (PHAs) produzidos por *P.aeruginosa* são polímeros contendo monômeros de cadeia média em sua composição, com 6 a 14 átomos de carbonos, e com diversas composições monoméricas, o que reflete na diversidade de compostos formados. Já foram identificados aproximadamente 150 monômeros participantes da composição de PHAs, que podem ser moduladas dependendo da linhagem, condições de cultivo e fonte de carbono utilizada (STEINBÜCHEL; VALENTIN, 1995; REHM; STEINBÜCHEL, 1999; QUEIROZ, 2007). Devido a essa diversidade estrutural, PHAs podem apresentar cristalinidade variando de 30% a 70% e temperatura de fusão variando entre 50 °C a 180 °C (REHM, 2010).

Os PHAs vêm despertando interesse devido às suas propriedades termoplásticas e/ou elastoméricas, por serem compostos biodegradáveis e poderem ser obtidos de fontes renováveis, como é o caso de resíduos industriais (BYROM, 1987; SILVA et al., 2007; REHM, 2010). Apesar das vantagens, a produção comercial de PHAs, assim como RLs, enfrenta problemas econômicos para sua vasta aplicação, uma vez que o custo de produção de PHAs é cerca de 5 a 10 vezes mais elevada em comparação aos plásticos sintéticos obtidos via petroquímica (REHM, 2010).

3.4 Interrelação das vias biossintéticas de Ramnolipídeos e PHAs.

Tanto a produção de PHA contendo monômeros de cadeia média, como de RLs utilizam a via *de novo* de biossíntese de ácidos graxos e, como esquematizado na Figura 7, detêm alguns precursores em comum. A partir de carboidratos, os PHAs produzidos consistem, principalmente, de 3-hidroxicarboxilato (3HD), que representa também o principal 3-hidroxiácido em ramnolipídeos (REHM; MITSKY; STEINBÜCHEL, 2001; STRELEC, 2006).

Uma vez que ramnolipídeos e PHAs podem ser produzidos simultaneamente (CHAYABUTRA; WU; JU, 2001; HORI et al., 2001; MARSUDI; UNNO; HORI, 2008;

PEIXOTO, 2008; STRELEC, 2006), as rotas de biossíntese devem competir por intermediários do metabolismo de ácidos graxos. De acordo com o que foi proposto por Zhu e Rock (2008), RhlA e PhaG (REHM; KRÜGER; STEINBÜCHEL, 1998) seriam responsáveis pela transferência de intermediários da biossíntese de ácidos graxos para a biossíntese de ramnolipídeos e PHAs, respectivamente. Espera-se que mutantes afetados na biossíntese de um desses compostos sejam capazes de produzir quantidades maiores do outro. Em trabalho recente, em que genes específicos da biossíntese de PHA ou ramnolipídeos foram inativados, foi demonstrado que a quantidade de PHA produzida pode ser aumentada com a inativação dos genes *rhlA*, *rhlB*, *rhlR* e *rhlI*, embora não se observou aumento expressivo da produção de ramnolipídeos com a inativação dos genes *phaC1*, *phaC2* ou *phaG* (CHOI et al., 2011). Esses dados indicam que a regulação da produção de RLs por *P. aeruginosa* deve envolver um complexo sistema de controle e que o fator limitante para o aumento da produção desses compostos não se restringe à competição por intermediários comuns com a via metabólica de produção de PHAs.

Assim, neste trabalho foram obtidos mutantes de *P. aeruginosa* afetados na biossíntese de PHA ou ramnolipídeos com o intuito de avaliar o efeito dessas mutações na produção desses compostos.

Figura 7 - Modelo metabólico representando a biossíntese de ramnolipídeos e polihidroxialcanoatos por *P. aeruginosa*.

Fonte: modificado de Zhu e Rock (2008).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismos

Neste estudo, foi utilizada a linhagem bacteriana *P. aeruginosa* LFM634 (ALMEIDA, 2011; PEIXOTO, 2008; STRELEC, 2006) pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Bioprodutos (Dep. de Microbiologia, ICB, USP). Também foi utilizada a linhagem bacteriana *Escherichia coli* SM10 pir/pIT2 que abriga o transposon (IS*lacZ*/hah) (JACOBS et al., 2003).

4.2 Meios utilizados

Foram utilizados os meios de cultura Luria-Bertani (LB), composto por triptona (10 g/L), extrato de levedura (5 g/L) e NaCl (5 g/L); o meio caldo nutriente (CN), composto por extrato de carne (3 g/L) e peptona (5 g/L); e o meio mineral (RAMSAY et al., 1990) para a avaliação da produção de RLs e PHAs. Foi também utilizado o meio Blue Agar (PINZON; JU, 2009 a,b) utilizando glicerol como fonte de carbono para a detecção de ramnolipídeos. Para a obtenção de meios sólidos foram adicionados 16 g/L de ágar aos meios.

4.2.1 Meios minerais

Os meios minerais (MM) utilizados foram de dois tipos, um segundo a formulação de Ramsay et al (1990), e outro modificado, utilizado para a verificação do acúmulo de PHA (meio sólido). O Quadro a seguir mostra os componentes e suas respectivas quantidades para o preparo de um litro de solução:

Quadro 1 - Composição dos meios minerais utilizados.

Componente		MM	MM*
por L			
(NH ₄) ₂ SO ₄	g	-	0,06
NaNO ₃	g	4	-
Na ₂ PO ₄	g	3,5	3,5
KH ₂ PO ₄	g	1,5	1,5
Sol. Traços	ml	1	1
Citr. Fe. NH ₄ ^a	ml	1	1
CaCl ₂ .2H ₂ O ^b	ml	1	1
MgSO ₄ .7H ₂ O ^c	ml	1	1
Fonte de carbono	ml	20	17

MM – meio mineral segundo Ramsay et al (1990); MM* - meio mineral MM modificado; Sol. Traços – solução com elementos traços; a – solução de 60 g/L; b – solução de 1%; c – solução de 20%. Composição da solução com elementos traços: H₃BO₃ (0,3 g/L), CoCl₂.6H₂O (0,2 g/L), ZnSO₄.7H₂O (0,1 g/L), MnCl₂.4H₂O (0,03 g/L), Na₂MoO₄.2H₂O (0,03 g/L), NiCl₂.6H₂O (0,02 g/L), CuSO₄.5H₂O (0,01 g/L).

4.2.2 Meio de Pinzon e Ju (2009a,b)

Para a análise visual da produção de ramnolipídeos, foi utilizado o meio de Pinzon e Ju (2009 a,b). O Quadro a seguir mostra os componentes e suas respectivas quantidades para o preparo de um litro de solução:

Quadro 2 - Composição do meio de Pinzon e Ju (2009 a,b).

Meio Pinzon e Ju (2009 a, b)	1L	
Componentes		
Fonte de Carbono	g	20,00
KH ₂ PO ₄	g	0,70
Na ₂ HPO ₄	g	0,90
NaNO ₃	g	2,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	g	0,40
CaCl ₂ .2H ₂ O	g	0,10
Solução de Elementos traços	ml	2,00
CTAB (Brometo de Cetil Trimetil Amônio)	g	0,20
Azul de metileno	g	0,01
Ágar	g	12,00

Sol. Traços – solução com elementos traços; a – solução de 60 g/L; b – solução de 1%; c – solução de 20%. Composição da solução com elementos traços: H₃BO₃ (0,3 g/L), CoCl₂.6H₂O (0,2 g/L), ZnSO₄.7H₂O (0,1 g/L), MnCl₂.4H₂O (0,03 g/L), Na₂MoO₄.2H₂O (0,03 g/L), NiCl₂.6H₂O (0,02 g/L), CuSO₄.5H₂O (0,01 g/L).

4.3 Verificação da resistência da linhagem LFM634 ao antibiótico tetraciclina

Colônias de *P. aeruginosa* LFM634 foram estriadas em placa de Petri contendo meio LB ou CN sólido e incubadas a 30 °C por 24 horas. Colônias isoladas foram utilizadas para estriar placas contendo meio mineral sólido com diferentes concentrações de tetraciclina e incubadas a 30 °C por até 168 horas. As concentrações de tetraciclina utilizadas foram (µg/mL): 12,5; 25; 50; 100; 150 e 200, e foram feitas anotações do crescimento nos períodos de 24, 48, 72 e 168 horas. A verificação da resistência ou não foi feita de forma visual através do crescimento nas placas: o crescimento de colônias indicava a resistência da linhagem ao antibiótico, e a ausência do crescimento, a sensibilidade.

4.4 Obtenção de mutantes

Os mutantes de *P. aeruginosa* LFM634 foram obtidos utilizando o transposon IS*lacZ*/hah (JACOBS et al., 2003), após a conjugação com a linhagem de *Escherichia. coli* SM10 pir/pIT2 (IS*lacZ*/hah) e *P. aeruginosa* LFM634. Para a conjugação, colônias de *E. coli* SM10 pir/pIT2 (IS*lacZ*/hah) e *P. aeruginosa* LFM634 foram estriadas em placas de Petri com LB ou CN por 24 horas, a 30 °C. Colônias isoladas das duas linhagens foram usadas para inocular frascos contendo LB líquido e crescidas em agitador rotativo por 24 horas, a 30 °C, 150 rpm. Os meios (sólidos e líquidos) utilizados para o crescimento e manutenção da linhagem *E. coli* SM10 pir/pIT2 (IS*lacZ*/hah) foram suplementadas com 12,5 µg/mL de tetraciclina. Cerca de 10 mL de cada uma das culturas foram filtradas em sistema de filtração a vácuo (Nalgene e Millipore) utilizando-se membranas em ésteres de celulose de 0,45 micra (Millipore). A filtração teve o intuito de aumentar a interação entre as células, facilitando o processo de conjugação e, conseqüentemente, a obtenção de um maior número de mutantes.

Ao final da filtração, a membrana contendo *E. coli* SM10 pir/pIT2 (IS*lacZ*/hah) e *P. aeruginosa* LFM634, foram transferidas para placas de Petri contendo LB suplementado com 12,5 µg/mL de tetraciclina e incubadas por 24 horas, à 37 °C. Após esse período, a membrana foi lavada com solução salina (NaCl 0,85%), com o auxílio de uma alça de Drigalski, e diluída 100 vezes em solução salina. Cerca de 100 µL da cultura mista diluída foram semeados em placas de Petri contendo MM com glicerol (20 g/L) e suplementadas com 150 µg/mL de tetraciclina, incubados de 48 a 72 horas, a 37 °C. As colônias capazes de crescer neste meio provavelmente detinham o transposon em seu genoma e por isso foram selecionadas como prováveis mutantes de LFM 634.

4.5 Avaliação da produção de PHA e ramnolipídeos

A avaliação da produção de PHA e RLs foi feita de duas formas distintas: visual, a partir de cultivos em meio sólido, e utilizando metodologias analíticas, a partir de cultivos em meio líquido.

4.5.1 Avaliações visuais

Colônias isoladas foram utilizadas para estriar placas de MM* ou de meio de Pinzon e Ju (2009 a,b).

No caso do acúmulo de PHA a análise dos resultados foi feita visualmente, segundo a opacidade da colônia, as placas de MM* com as colônias mutantes foram incubadas à 30°C por 120 horas. A coloração mais opaca das colônias mutantes em relação ao controle era um indício de que esses mutantes eram capazes de produzir e acumular quantidades maiores de PHA, e caso a coloração das colônias mutantes fossem menos opacas ou até mesmo translúcidas, isso indicava que os mutantes não produziam o polímero ou o acumulavam em pequenas quantidades.

A avaliação da produção de ramnolipídeos em placas contendo o meio Pinzon e Ju (2009 a,b) também foi feita de forma visual. Colônias mutantes eram incubadas em placas contendo esse meio por 48 horas à 30°C. O CTAB, contido nesse meio, é um surfactante catiônico e forma um complexo com as moléculas aniônicas dos RLs, gerando um precipitado. Graças à presença do corante azul de metileno no meio, é possível a visualização deste precipitado na forma de um halo azul ao redor das colônias produtoras de RLs (SIEGMUND; WAGNER, 1991). Assim, a produção de ramnolipídeos foi indicada pela intensidade e tamanho do halo de precipitação azul formado em volta das colônias, ou seja, caso a linhagem mutante apresentasse colônias com halos maiores e mais intensos do que o controle, isso era um indicativo de que a produção de ramnolipídeos seria maior; caso a linhagem mutante não apresentasse halos azuis, isso indicava que o mutante não era produtor do composto.

4.5.2 Metodologias analíticas.

P. aeruginosa LFM634 e os mutantes obtidos foram semeados em meio LB sólido e incubados por 24 horas a 30 °C. Colônias isoladas foram utilizadas para inocular 5 mL de

meio LB e incubadas em um tubo de ensaio por 24 horas em agitador rotativo a 150 rpm e 30°C. Um volume de 1,0 mL da cultura foi utilizado para inocular 25 mL de meio mineral (RAMSAY et al., 1990) contendo como fontes de carbono glicose ou óleo de soja (20 g/L) e NaNO_3 como fonte de nitrogênio (4 g/L). As células foram cultivadas por 96 horas e a cultura foi analisada quanto a: biomassa (massa seca celular), quantidade e composição de PHA e produção de ramnolipídeos.

O sobrenadante resultante do cultivo de cada isolado foi separado das células por centrifugação. Amostras das culturas (20 mL) foram centrifugadas (8000 rpm, 10 min., 4°C), ressuspensas em água destilada e submetidas a liofilização. Após a liofilização, as amostras foram pesadas e a massa seca celular (g/L) foi determinada gravimetricamente.

4.5.2.1 Análises de PHA

Para determinação de PHA, cerca de 10 mg de células liofilizadas foram submetidas à propanólise (RIIS; MAI, 1988). A concentração de propil-ésteres foi determinada por cromatografia gasosa em cromatógrafo Agilent 7890A equipado com uma coluna HP5, detectando-se os propil-ésteres por meio de ionizador de chama.

4.5.2.2 Análises de Ramnolipídeos

Para a determinação da quantidade e composição de ramnolipídeos produzidos foram analisados os 3HA e a ramnose presentes no sobrenadante. A presença de 3HA foi determinada colocando 5 mL do sobrenadante em tubos de ensaio com tampa e congelando-os. Após o congelamento, esse sobrenadante foi liofilizado e, por fim, analisado seguindo a metodologia de propanólise e análise por cromatografia gasosa descrita acima. A ramnose presente no sobrenadante foi determinada por meio de uma hidrólise em que 1 mL do sobrenadante foi colocado em tubos eppendorf, adicionados 100 μL de uma solução H_2SO_4 a 10 M e mantido a 98 °C por 5 horas. Ao final, a solução foi neutralizada com 100 μL de uma solução de NaOH (10 M) e sobrenadante, agora tratado, foi filtrado e submetido a análise por cromatografia líquida (HPLC) (ALMEIDA, 2011).

4.6 Antibiógrama

Como *P. aeruginosa* é um patógeno humano oportunista, foi realizado um teste para avaliar a resistência desse microorganismo a diferentes antibióticos. Para isso foi utilizado o teste de Sensibilidade por disco difusão Kirby-Bauer (BAUER et al., 1966) em ágar Müller-Hinton, de acordo com o Manual Clinical and Laboratorial Standards Institute (CLSI) de 2011.

A linhagem selvagem LGM634 foi estriada em placas contendo LB sólido e incubadas à 30 °C por 24 horas. Uma colônia isolada foi inoculada em 25 mL de LB líquido e cultivada à 30 °C por 24 horas. A cultura líquida foi diluída em solução salina (0,85%) até que fosse atingida a absorbância de 0,08-0,1 no comprimento de onda de 625nm. Com o auxílio de um swab estéril, foi coberta toda a extensão de uma placa contendo meio sólido de Müller-Hinton. Assim que foi observado, após alguns minutos, que a superfície da placa estava totalmente seca, foram colocadas, com o auxílio de uma pinça estéril, os discos contendo os antibióticos listados no Quadro 3.

Quadro 3 - Lista dos antibióticos usados, suas respectivas marcas e concentrações.

Antibiótico usado	Sigla	Marca	Quantidade (µg)
Cotrimoxazol	SUT	Sensifar	25,0
Piperaciclina + Tazobactan	PPT	Sensifar	110,0
Cefoperazone	CFP	Oxóid	75,0
Ceftazidima	CAZ	Sensifar	30,0
Cefepima	CPM	Sensifar	30,0
Aztreonama	ATM	Sensifar	30,0
Ticarciclina + Ác. Clavulânico	TIC	Sensifar	85,0
Ciprofloxacina	CIP	Sensifar	5,0
Gentamicina	GEN	Sensifar	10,0
Amicacina	AMI	Sensifar	30,0
Meropenen	MER	Sensifar	10,0
Imipenema	IPM	Sensifar	10,0

As placas com os discos contendo antibióticos foram incubadas à 37 °C por 24 horas. A placa, então, foi analisada quanto a presença ou não de halos com ausência de crescimento. Os diâmetros dos halos presentes foram medidos com o auxílio de uma régua, e esses valores foram interpretados conforme as recomendações do Manual Clinical and Laboratorial Standards Institute (CLSI) de 2011 para *Pseudomonas aeruginosa*.

4.7 Identificação dos genes afetados

A identificação dos genes afetados nos mutantes selecionados foi feita segundo Jacobs et al. (2003).

4.7.1 Extração do DNA genômico

O DNA genômico das amostras foram extraídos da seguinte maneira: colônias isoladas em LB sólido foram transferidas, com o auxílio de um palito estéril, para 30µL de água miliQ autoclavada e fervidas à 100°C por 8 minutos. Após a fervura os tubos foram centrifugados à 13.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante obtido foi utilizado como substrato para a primeira reação de amplificação (PCR).

4.7.2 Reações de amplificações (PCR) e primers usados.

As amostras de DNA extraídas das linhagens mutantes foram submetidas a dois rounds de PCR, uma reação de limpeza de resíduos dos PCRs e uma reação de sequenciamento antes de serem precipitadas e sequenciadas,

Para o primeiro round da reação de PCR foram utilizados os primers: CEKG2A, CEKG2B, CEKG2C e lac-Z-211 (Quadro 4). Para o segundo round de PRC foram usados os primers: CEKG4 e lac-Z-148. Para a reação de sequenciamento foi usado o primer lac-Z-124L.

Quadro 4 - Primers usados e suas respectivas sequências de nucleotídeos.

Primer	Sequência de nucleotídeos
CEKG2A	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNNNAGAG
CEKG2B	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNNNACGCC
CEKG2C	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNNNGATAT
CEKG4	GGCCACGCGTCGACTAGTAC
lacZ-211	TGCGGGCCTCTTCGCTATTA
lacZ-148	GGGTAACGCCAGGGTTTTCC
lacZ-124L	CAGTCACGACGTTGTAAAACGACC

Fonte: Jacobs et al. (2003).

O primeiro round de PCR foi realizado conforme os seguintes parâmetros: temperatura inicial de desnaturação de 94 °C por 12 minutos, seguida de uma etapa inicial de 6 ciclos de

desnaturação à 94 °C por 30 segundos, anelamento à 42 °C por 30 segundos, extensão à 72 °C por 3 minutos; após essa primeira etapa, outra etapa de 25 ciclos de desnaturação à 94 °C por 30 segundos, anelamento à 64 °C por 30 segundos, extensão à 72 °C por 3 minutos era efetuada, e a reação terminava com uma extensão final à 72 °C por 7 minutos. Para esse reação foi utilizado a seguinte reação:

PCR 1 - Para uma reação de PCR 1, algumas mudanças foram feitas em relação ao protocolo descrito por Jacobs et al, (2003). Assim, para um volume de 14,2 µL foram usados:

Kit Go Taq® Green Master Mix (Promega Corporation, Brasil)	6,0 µL
lac-Z-211 (10pmol/mL)	1,0 µL
CEKG2A (10pmol/mL)	0,34 µL
CEKG2B (10pmol/mL)	0,34 µL
CEKG2C (10pmol/mL)	0,34 µL
dNTPs (10mM - Fermentas)	0,2 µL
MgCL ₂ (10mM)	1,0 µL
Água livre de nuclease	0,5 µL
DMSO (Merck)	0,5 µL
DNA extraído conforme descrito no item 4.8.1	4,0 µL

O segundo round de PCR foi realizado conforme os seguintes parâmetros: temperatura inicial de desnaturação de 94 °C por 10 minutos, seguida de uma etapa inicial de 30 ciclos de desnaturação à 94 °C por 30 segundos, anelamento à 64 °C por 30 segundos, extensão à 72 °C por 3 minutos, terminando com uma extensão final à 72 °C por 7 minutos.

PCR 2 - Para uma reação de PCR 2, algumas mudanças foram feitas em relação ao protocolo descrito por Jacobs et al. (2003). Assim, para um volume de 21,3 µL foram usados:

Kit Go Taq® Green Master Mix (Promega Corporation, Brasil)	9,0 µL
lac-Z-148 (10pmol/mL)	1,5 µL
CEKG4 (10pmol/mL)	1,5 µL
dNTPs (10mM)	0,3 µL
MgCL ₂ (10mM)	1,5 µL
Água livre de nuclease	0,75 µL
DMSO (Merck)	0,75 µL
Produto obtido do PCR 1	6,0 µL

4.7.3 Reações de sequenciamentos

Antes de realizar a reação de sequenciamento, foi feita uma reação de limpeza (clean

up) para retirar possíveis impurezas das reações de sequenciamentos anteriores, conforme descrito por Jacobs et al. (2003) . Para tal, 5,0 µL do produto do PCR 2 foram misturados com 2,0 µL da enzima SAP (Shimp alkaline phosphatase - Fermentas) e 1,0 µL da enzima EXO I (Exonuclease I – Fermentas). Essa mistura foi submetida à 37 °C por 30 minutos para que a ação das enzimas pudesse ocorrer, seguida de 20 minutos à 80 °C para a inativação das mesmas. Após essa reação, foram adicionados de 10,0 a 20,0µL de água livre de nucleases. Feita a limpeza das amostras, foi realizada a reação de sequenciamento.

A reação de sequenciamento foi realizada conforme os seguintes parâmetros: desnaturação inicial à 94 °C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação à 94 °C por 30 segundos, anelamento à 50 °C por 10 segundos e extensão à 60 °C por 4 minutos. Para essa reação foi seguido o protocolo de Jacobs et al. (2003), utilizando o DNA Sequencing Kit dGTP Big Dye™ Terminator v3.0 (Applied Biosystems) Assim, para um volume de 16 µL foram usados:

Produto obtido da reação de clean up	3,0 µL
Água livre de nucleases	7,0 µL
Big Dye Ready Reaction Mix	2,0 µL
Tampão de diluição	2,0 µL
lac-Z-124L	2,0 µL

A composição do tampão de diluição utilizado foi: 400µM de TRIS (pH 9,0) e 100µM de Cloreto de Magnésio.

Os produtos da reação de sequenciamento foram, então, precipitados segundo o seguinte protocolo:

- a) Em um tubo eppendorf adicionou-se 25 µL de solução de precipitação (2750 µL de etanol 100%, gelado; 110 µL de Acetato de Sódio - 3 M com pH5,2; e 110 µL de glicogênio à 1mg/mL) aos 15 µL da reação de sequenciamento;
- b) Vortexar a mistura e manter em gelo por 15 minutos;
- c) Centrifugar à 4.000 rpm por 20 minutos, à temperatura ambiente;
- d) Inverter o tubo e descartar o sobrenadante, dando em seguida um pulso de 1.000 rpm com o tubo invertido;
- e) Adicionar 50 µL de etanol (70%) gelado e não vortexar;
- f) Repetir os passos 'c' e 'd', porém com 10 minutos de centrifugação;
- g) Secar o tubo por 1 hora, protegido da luz, ou por 1 minuto à 95 °C no termociclador, com a tampa aberta. Conservar à -20 °C.

As amostras, após a precipitação, foram sequenciados pelo Serviço de Sequenciamento de DNA (SSDNA) do Departamento de Bioquímica da Universidade de São Paulo (IQUSP). O equipamento utilizado foi o sequenciador capilar ABI PRISM 3100 e o método o de Sanger.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da sensibilidade da linhagem LFM634 ao antibiótico tetraciclina

A metodologia utilizada para a obtenção de mutantes de *P. aeruginosa* foi baseada no uso do transposon IS*lacZ*/hah (JACOBS et al., 2003), o qual é um cassete gênico que abriga o gene de resistência ao antibiótico tetraciclina (ver Figura 8). Sendo assim, foi necessário verificar a sensibilidade da linhagem selvagem *P. aeruginosa* LFM634 a esse antibiótico.

Figura 8 - Esquema de pIT2 abrigo o transposon IS*lacZ*/hah.

Tc^R - marca de resistência à Tetraciclina.; *lacZ* - gene β-galactosidase; *loxP* - sequência de reconhecimento *Cre*; *bla* - gene codificante para β-lactamase; *TraI* - referente ao gene para conjugação *tra*; IE - "inside end"; OE - "outside end".

Fonte: Modificado de Li e Lu (2009).

Essa avaliação da sensibilidade foi feita por meio do cultivo da linhagem LFM634 em placas contendo MM com diferentes concentrações do antibiótico. As concentrações testadas foram (em µg/mL): 12,5; 25; 50; 100; 150 e 200. As placas estriadas foram incubadas em estufa a 30 °C, por até 168 horas, sendo que o acompanhamento do crescimento microbiano foi feito nos períodos de 24, 48, 72 e 168 horas (Tabela 3).

Com esse teste foi possível verificar que a linhagem LFM634 era resistente a altas concentrações de tetraciclina, uma vez que se observou crescimento em concentrações de até 100 µg/mL de tetraciclina.

Tabela 3 - Sensibilidade de *P. aeruginosa* LFM634 ao antibiótico tetraciclina nas concentrações de 12,5; 25;50; 100; 150; e 200 µg/mL.

Estria nº	Concentração de tetraciclina (µg/ml)														
	12,5 µg/ml			25µg/ml			50 µg/ml			100 µg/ml			150 µg/ml		
	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3
1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	-	-	-	-
2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	-	+	-	-	-	-
3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	-	-	-	-	-	-
4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	-	+	-	-	-	-
5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	-	-	-	-
7	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+	-	-	-	-	-
8	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	-	-	-	-	-
9	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	-	+	+	-	-	-
11	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+	+	-	-	-	-
12	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+	+	-	-	-	-

Colônias de LFM634 foram estriadas em placas (P1, P2 e P3) incubadas a 30°C por 168 horas e seu crescimento foi monitorado em 24, 48, 72 e 168 horas.

Nota: -, ausência de crescimento; +, crescimento em colônias isoladas; ++, bom crescimento; +++, crescimento intenso.

Por fim, verificou-se que meios com concentração mínima de 150 µg/mL de tetraciclina são eficazes para inibir o crescimento de LFM634, sendo assim, essa concentração foi escolhida para prosseguir os experimentos.

A realização deste teste foi de fundamental importância para a obtenção dos mutantes, pois a linhagem LFM634 somente seria capaz de crescer em meios contendo uma concentração de tetraciclina de 150 µg/mL caso tivesse inserido em seu genoma o gene que codificasse para a resistência a esse antibiótico, ou seja, a resistência a esse antibiótico indicaria a inserção do transposon *ISlacZ/hah* no genoma desses microrganismos.

5.2 Antibiograma

Após a constatação da alta resistência da linhagem selvagem LFM634 à tetraciclina, achou-se por bem realizar a verificação da resistência desta linhagem á outros antibióticos, e por esse motivo foi realizado um antibiograma.

Assim como descrito nos materiais e métodos, a linhagem LFM634 foi estriada em ágar Müller-Hinton e, após a secagem do meio de cultura, discos dos diferentes antibióticos foram colocados na superfície do meio inoculado e incubados por 24 horas à 37 °C. A Figura 9 ilustra o aspecto do cultivo após a incubação.

Figura 9 - Antibiograma de *P. aeruginosa* LFM634 .

Nota: Os nome das antibióticos usados e suas siglas estão descriminados no Quadro 3 e na Tabela 4.

No cultivo mostrado na Figura 9, os halos formados ao redor dos discos indicam que o antibiótico inibiu o crescimento bacteriano ao redor do disco de antibiótico. Caso não haja formação de halo, o crescimento da bactéria não foi inibido e a bactéria é resistente ao antibiótico.

Para os discos de antibióticos que apresentaram a formação de halo, esses halos foram medidos, com o auxílio de uma régua, e foram analisados de acordo com o Manual Clinical and Laboratorial Standards Institute (CLSI) de 2011. Assim, as colônias foram classificadas como resistentes, intermediárias ou sensíveis aos antibióticos. Os resultados se encontram na Tabela 4.

Na placa mostrada na Figura 9, dois halos (MER - Meropenen e IPM - Imipenema) apresentaram pequenas colônias isoladas em seu interior. A fim de verificar se o inóculo estava realmente puro, foi feito outro antibiograma e o mesmo resultado foi observado. Esse resultados indicam que subpopulações mais resistentes a esses antibióticos podem emergir a partir da cultura original de *P. aeruginosa* LFM634.

Para verificar essa hipótese, essas colônias foram isoladas, crescidas em meio líquido e submetidas a um novo antibiograma, seguindo os mesmos padrões do anterior, porém somente com os antibióticos MER e IPM. A Figura 10 ilustra o resultado obtido.

Tabela 4 - Resultado da análise dos halos formados, de acordo com o Manual Clinical and Laboratorial Standards Institute (CLSI) de 2011, de antibiograma da linhagem LFM634.

Antibiótico usado	Sigla	Marca	Quantidade (µg)	Diâmetro de Halo (mm)	Resultado
Cotrimoxazol	SUT	Sensifar	25,0	sem halo	Resistente
Piperaciclina + Tazobactam	PPT	Sensifar	110,0	20	Intermediário
Cefoperazone	CFP	Oxóid	75,0	15	Intermediário
Ceftazidima	CAZ	Sensifar	30,0	15	Intermediário
Cefepima	CPM	Sensifar	30,0	15	Intermediário
Aztreonam	ATM	Sensifar	30,0	16	Intermediário
Ticarciclina + Ác.					
Clavulânico	TIC	Sensifar	85,0	20	Sensível
Ciprofloxacina	CIP	Sensifar	5,0	25	Sensível
Gentamicina	GEN	Sensifar	10,0	15	Sensível
Amicacina	AMI	Sensifar	30,0	24	Sensível
Meropenem	MER	Sensifar	10,0	28	Sensível*
Imipenem	IPM	Sensifar	10,0	20	Sensível*

Nota: (*) halos que continham colônias em seu interior.

Figura 10 - Antibiograma das colônias presentes nos halos dos antibióticos MER e IPM.

Nota: o nome e a sigla dos antibióticos utilizados se encontram no Quadro 3 e na Tabela 4.

Como ilustra a Figura 10, não houve a formação de halo em nenhum dos discos dos antibióticos MER e IPM, indicando que essas colônias são resistentes a esses antibióticos.

Esses resultados indicam que a linhagem selvagem LFM634 tem uma resistência intermediária na maioria dos antibióticos utilizados, e mesmo quando é sensível, em alguns casos, subpopulações resistentes podem emergir, como foi o caso dos antibióticos MER e IPM. Esse teste corrobora o resultado obtido com o antibiótico Tetraciclina (Tabela 3), no qual a linhagem LFM634 foi capaz de crescer em altas quantidades do antibiótico (100µg/mL). Uma vez que *P. aeruginosa* é patógeno humano oportunista, investigações acerca da resistência desta bactéria a antibióticos é de extrema importância na prevenção e tratamento de possíveis acidentes em projetos envolvendo o uso deste microrganismo na produção de RLs. Os resultados obtidos aqui mostram que a linhagem LFM634 é uma linhagem resistente a alguns tipos de antibióticos, porém é susceptível a outros, o que indica que, mesmo sendo capaz de infectar humanos, seu controle e tratamento são possíveis.

5.3 Obtenção dos mutantes

Verificada a concentração mínima de tetraciclina capaz de inibir o crescimento da linhagem LFM634 prosseguiu-se a obtenção de mutantes.

Primeiramente, foi realizada a conjugação entre a linhagem de *P. aeruginosa* LFM634 com uma linhagem de *Escherichia coli* SM10 pir/pIT2 (ISlacZ/hah), a qual continha um plasmídeo abrigando o transposon ISlacZ/hah (Figura 8). Esse procedimento possibilitou a transferência do plasmídeo de *E. coli* para a linhagem LFM634, e a posterior inserção do transposon ISlacZ/hah no genoma da última. As bactérias resultantes dessa conjugação foram cultivadas em meio mineral com tetraciclina (150 µg/mL), a fim de obter o crescimento apenas das colônias de *P. aeruginosa* que tivessem o transposon inserido em seu genoma, pois *E. coli* é incapaz de crescer em meio mineral. Cada uma das colônias mutantes foram submetidas a pelo menos um repique, e incubadas novamente em placa de MM com glicose e tetraciclina (150 µg/mL) para assegurar a estabilidade das colônias mutantes.

Ao final da etapa de conjugação, foram obtidas 9840 mutantes da linhagem LFM634, sendo que estes foram utilizados na próxima etapa do trabalho.

5.4 Seleção de mutantes afetados na síntese de PHA e/ou ramnolipídeos

Os 9840 mutantes obtidos na etapa anterior foram testados em placas contendo meio mineral modificado (MM*) com glicose para a detecção da produção de PHA, e o meio de Pinzon e Ju (2009 a,b) para a detecção da produção de ramnolipídeos. Foram selecionados aqueles que apresentaram um halo azul intenso, no caso da produção de ramnolipídeos, e a diferenciação de opacidade das colônias relativo ao acúmulo de PHAs. Em todas as placas analisadas, a linhagem selvagem LFM634 foi usada como controle. Também foram selecionados os mutantes negativos na produção de ramnolipídeos e/ou de PHAs. Detalhes sobre os critérios de seleção se encontram nos Materiais e Métodos.

As Figura 11 e 12 ilustram os aspectos das colônias cultivadas no meio de MM* e o meio de Pinzon e Ju (2009 a,b) para a produção de PHAs e RLs, respectivamente.

Figura 11 - Cultivo em MM* ilustrando o aspecto de colônias capazes e incapazes de acumular PHAs

Nota: Metade superior da placa: colônias brancas, produtoras e acumuladoras de PHAs; metade inferior da placa: colônias mais translúcidas, incapazes de acumular PHAs

Fonte: STRELEC (2006).

Figura 12 - Cultivo em Blue Ágar evidenciando o aspecto de colônias produtoras e não produtoras de ramnolipídeos.

Nota: colônias produtoras de RLs: colônias envolvidas por halo azul; colônias não produtoras de RLs: colônias opacas, sem halo, evidenciadas por retângulo preto.

Todos os 9840 mutantes obtidos foram incubados em ambos os meios, e submetidas às análises visuais, em placa, da produção de PHA e ramnolipídeo. Ao final foram selecionados cerca de 198 mutantes aparentemente afetados positivamente ou negativamente na biossíntese desses compostos.

Os mutantes selecionados foram submetidos a ensaios em meio líquido, assim como descrito nos materiais e métodos, sendo testadas duas fontes de carbono diferentes para os cultivos, óleo de soja e glicose, com a finalidade de se avaliar o efeito da mutação na composição química dos homólogos de ramnolipídeos e PHAs. As amostras geradas nesses ensaios foram analisadas e os dados referentes à produção e composição de PHAs e ramnolipídeos foram comparados e analisados com a linhagem selvagem (LFM634). Neste primeiro ensaio, em meio líquido, foi realizado uma pré-seleção dos mutantes utilizando como parâmetros a alta produção de ramnolipídeos e PHAs comparado com a linhagem selvagem e também a ausência da produção destes compostos. Os melhores dados destes cultivos estão demonstradas nos anexos e a seleção foi baseada nos dados da produção de RLs e/ou PHAs.

A partir dos dados obtidos dos cultivos em meio líquido, foram selecionados 61 mutantes, os quais foram submetidos a ensaios em meio líquido, em duplicata, para que se obtivesse uma maior qualidade dos dados obtidos.

5.5 Análise da produção de ramnolipídeos e PHAs por mutantes.

Os valores apresentados nas Tabelas 6 e 7 correspondem às médias dos valores obtidos nos ensaios em duplicata dos 61 mutantes selecionados, utilizando glicose e óleo de soja, como fontes de carbono, respectivamente. Como controle deste experimento, foi utilizada a linhagem selvagem *P. aeruginosa* LFM634.

Atualmente, existem poucos relatos sobre mutantes de *P. aeruginosa* identificados como superprodutores de RLs. Em 2004, Tahzibi e colaboradores publicaram a obtenção de mutante de *P. aeruginosa* capaz de sintetizar 10 vezes mais RLs (12,5 g/L) em comparação a linhagem mutante (1,2 g/L) utilizando N-metil-N'-nitrosoguanidina como agente mutagênico. Essa metodologia foi utilizada também por Giani e colaboradores (AKTIENGESELLSCHAFT, 1997) para a obtenção de mutante capaz de sintetizar concentrações de RLs entre 70 e 120 g/L, a maior concentração já descrita para a biossíntese de RLs por *P. aeruginosa* (patente pertencente a Hoechst Alktiengesellschaft, Alemanha). Em trabalho recente, Lovaglio (2011) relata a obtenção de mutante, por transposon, capaz de sintetizar até 33,1 g/L de RLs quando cultivado em biorretator e utilizando óleo de girassol como fonte de carbono. Apesar dos trabalhos acima relatarem a obtenção de linhagens superprodutoras de RLs, informações sobre os genes afetados não foram esclarecidas.

Para a análise dos mutantes foi considerado como valor de corte a produção de RLs ou PHAs em concentração (mg/L) média duas vezes maior ou duas vezes menor que o valor médio da concentração obtida com a linhagem controle (LFM634).

Tabela 5 - Produção e caracterização de ramnolipídeos e polihidroxicanoatos por mutantes selecionados da linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* LFM 634, utilizando glicose como fonte de carbono (20 g/L).

(Continua)

Linhagem	Polihidroxicanoatos										Ramnolipídios						
	FC	MSC (g/l)	Composição PHA (mol%)					PHA		Composição (mol%)				Concentração (mg/l)			3HA/Ram (mol/mol)
			3HHx	3HO	3HD	3HDdΔ5	3HDd	(%MSC)	(mg/l)	3HHx	3HO	3HD	3HDd	Ramnose	3HA	RL	
p01-37	G	1,50	4,09	28,23	55,86	4,75	7,05	18,08	271,20	1,14	6,90	82,71	9,24	914,00	2600,00	3514,00	2,74
p03-40	G	2,30	1,07	8,92	70,73	0,00	19,27	9,40	216,20	6,35	3,43	92,25	0,00	120,00	330,00	450,00	2,79
p04-41	G	2,80	0,00	25,05	59,63	6,27	9,09	18,58	520,24	0,00	3,16	90,62	6,22	3107,00	2850,00	5957,00	0,47
p04-56	G	2,50	1,31	21,59	62,63	6,08	8,38	19,63	490,75	3,46	5,67	81,58	9,39	2930,00	2100,00	5030,00	1,43
p05-30	G	2,30	3,43	26,42	58,98	4,56	6,60	20,96	482,08	0,71	7,27	82,53	9,47	1532,00	3130,00	4662,00	1,96
p05-33	G	2,20	2,60	8,61	58,04	2,53	28,20	8,04	176,88	0,48	5,79	67,72	16,72	1067,00	2470,00	3537,00	2,22
p07-28	G	2,10	2,79	22,90	58,92	7,36	8,04	23,16	486,36	0,00	6,84	81,97	11,20	492,00	922,00	1414,00	1,79
p07-39	G	2,90	0,00	23,96	60,40	6,32	9,32	18,88	547,52	0,00	5,71	89,71	4,58	131,00	510,00	641,00	3,60
p08-30	G	1,40	1,66	9,50	61,87	2,36	24,61	5,60	78,40	0,42	1,72	95,23	2,63	849,00	2400,00	3249,00	2,73
p09-13	G	1,90	0,78	7,19	61,11	2,21	28,70	12,14	230,66	6,01	13,60	74,39	6,01	8,00	1610,00	1618,00	193,59
p11-31	G	2,60	1,77	11,84	56,11	2,51	27,76	7,90	205,40	0,96	11,15	87,73	0,16	1209,00	2390,00	3599,00	1,92
p11-51	G	2,01	2,46	21,88	60,58	5,29	9,82	14,95	300,50	0,83	11,44	84,45	3,28	980,00	2620,00	3600,00	2,55
p12-39	G	2,40	2,14	17,25	67,50	4,44	8,66	18,17	436,08	0,00	1,38	95,65	2,97	9,00	1240,00	1249,00	128,58
p13-25	G	3,10	0,00	15,13	53,62	5,79	25,45	5,20	161,20	0,00	3,80	80,00	16,20	332,00	546,00	878,00	1,60
p14-35	G	2,30	3,06	21,33	60,19	5,03	10,39	12,32	283,36	0,60	9,67	86,74	2,98	1158,00	3350,00	4508,00	2,78
p15-15	G	3,20	5,46	41,19	41,16	1,84	10,36	20,11	643,52	0,87	9,94	85,68	3,51	470,00	1855,00	2325,00	2,78
p16-08	G	2,90	4,40	32,51	51,61	4,70	6,81	17,06	494,74	2,59	6,25	87,36	3,79	1099,00	3140,00	4239,00	2,75
p16-14	G	3,10	1,07	38,92	48,80	5,93	7,71	16,22	502,82	0,00	7,87	88,16	3,98	2273,00	3600,00	5873,00	1,52
p17-40	G	3,60	0,00	31,56	53,50	5,95	8,98	15,84	570,24	0,24	7,78	88,08	3,90	2743,00	3130,00	5873,00	1,18
p17-49	G	2,10	4,24	35,11	51,38	4,54	4,73	18,93	397,53	1,39	9,87	86,39	2,35	1458,00	2525,00	3983,00	1,67
p17-56	G	1,50	4,37	40,10	41,43	3,33	10,78	42,03	630,45	0,00	0,00	99,47	0,53	227,00	330,00	557,00	1,36
p18-29	G	1,90	4,05	32,48	52,51	4,51	6,43	18,53	352,07	0,67	9,56	86,44	3,34	1618,00	3070,00	4688,00	1,82
p18-30	G	1,80	2,91	21,61	60,28	4,91	10,30	12,33	221,94	0,87	11,48	84,31	3,34	930,00	2580,00	3510,00	2,67
p19-03	G	2,20	5,32	24,81	55,32	5,88	8,88	11,92	262,24	1,31	11,68	83,27	3,74	935,00	2770,00	3705,00	2,85
p19-15	G	2,40	3,43	30,78	52,11	5,14	8,53	15,59	374,16	0,00	7,04	89,66	3,30	1400,00	2320,00	3720,00	1,61
p19-57	G	2,90	1,74	23,99	64,94	1,41	6,66	21,83	633,07	16,07	16,31	61,11	6,52	26,50	375,00	401,50	29,98
p20-19	G	3,90	3,61	23,41	63,25	3,97	5,75	25,87	1008,93	2,46	19,79	74,50	3,26	307,00	635,00	942,00	3,05
p20-26	G	3,01	4,37	32,06	49,05	4,74	9,77	11,40	343,14	2,15	11,92	81,44	4,49	1089,00	2260,00	3349,00	2,00
p20-28	G	1,80	4,47	20,65	53,15	8,30	13,41	14,79	266,22	2,44	3,56	90,79	3,22	927,00	2230,00	3157,00	2,31
p21-37	G	2,50	4,35	32,60	50,95	4,36	7,74	15,11	377,75	1,14	10,55	84,28	4,03	1482,00	2080,00	3562,00	1,37
p23-15	G	2,60	0,00	34,06	52,93	3,81	9,19	17,98	467,48	0,00	8,87	87,02	4,11	1433,00	2100,00	3533,00	1,39

Tabela 5 - Produção e caracterização de ramnolipídeos e polihidroxicanoatos por mutantes selecionados da linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* LFM 634, utilizando glicose como fonte de carbono (20 g/L).

(Conclusão)

Linhagem	Polihidroxicanoatos									Ramnolipídios							
	FC	MSC (g/l)	Composição PHA (mol%)					PHA		Composição (mol%)				Concentração (mg/l)			3HA/Ram (mol/mol)
			3HHx	3HO	3HD	3HDΔ5	3HDD	(%MSC)	(mg/l)	3HHx	3HO	3HD	3HDD	Ramnose	3HA	RL	
p26-11	G	2,30	2,68	20,13	62,44	4,74	9,99	21,07	484,61	0,00	6,30	85,10	8,60	495,00	688,00	1183,00	1,33
p26-26	G	2,10	3,95	33,34	49,38	5,10	8,21	14,90	312,90	9,35	8,19	78,55	3,92	1370,00	2450,00	3820,00	1,72
p28-21	G	2,20	1,01	12,27	74,20	5,45	7,07	33,14	729,08	0,42	5,99	78,17	15,43	21,00	1900,00	2627,00	2,30
p28-37	G	2,90	9,49	23,78	47,32	2,85	16,54	8,69	252,01	0,21	5,81	81,35	12,63	727,00	1870,00	1891,00	2,30
p28-55	G	3,80	1,91	11,04	69,95	4,60	12,50	30,81	1170,78	0,00	6,15	38,00	55,85	38,00	100,00	138,00	0,87
p28-59	G	3,10	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00	12,17	377,27	0,00	0,00	68,64	31,36	0,00	20,00	20,00	0,00
p32-10	G	3,20	0,00	20,91	64,19	6,15	8,75	25,01	800,32	-	-	-	-	0,00	0,00	0,00	0,00
p32-20	G	2,50	2,22	20,26	60,13	6,76	10,62	16,93	423,25	0,00	5,60	81,90	12,60	274,00	407,00	681,00	1,40
p34-14	G	3,05	0,00	0,00	58,39	2,76	38,84	2,85	86,93	7,72	14,28	72,86	5,14	37,00	310,00	347,00	8,00
p36-55	G	2,50	3,42	29,60	54,62	4,80	7,55	26,57	664,25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
p42-12	G	2,40	2,48	27,17	56,05	5,13	9,17	13,17	316,08	0,00	6,50	83,20	10,30	587,00	1450,00	2037,00	2,40
p42-52	G	2,30	5,11	28,17	49,88	2,19	16,64	9,18	211,14	0,23	6,74	81,56	11,47	1125,00	1660,00	2785,00	3,77
p42-55	G	2,90	2,46	21,28	58,06	3,10	15,09	14,34	415,86	-	-	-	-	0,00	0,00	0,00	0,00
p43-36	G	2,80	6,03	4,38	68,46	2,07	19,05	10,31	288,68	0,00	14,56	67,16	18,28	9,00	30,00	39,00	3,39
p46-26	G	2,60	2,80	24,86	57,12	5,15	10,07	13,70	356,20	0,86	12,06	82,15	4,93	923,00	707,00	1630,00	0,70
p49-09	G	3,80	0,00	34,65	49,90	7,20	8,25	21,27	808,26	0,27	6,40	80,71	12,62	964,00	3140,00	4104,00	2,05
p49-57	G	2,30	3,13	7,77	68,90	4,53	15,65	11,59	266,57	0,00	10,25	48,00	41,76	ND	40,00	40,00	ND
p51-14	G	2,90	0,00	24,16	61,07	5,72	9,05	24,29	704,41	0,00	13,35	80,19	6,46	287,00	530,00	817,00	1,72
p53-30	G	3,40	2,15	25,08	59,19	5,82	7,76	20,71	704,14	0,00	10,39	65,94	23,67	22,00	10,00	32,00	4,78
p58-03	G	3,30	5,74	12,90	60,35	2,48	18,51	7,30	240,90	0,00	12,14	85,11	2,75	150,00	520,00	670,00	3,30
p58-07	G	3,20	5,55	25,61	48,33	2,55	17,95	8,51	272,32	0,74	11,04	84,61	3,61	827,00	2910,00	3737,00	3,39
p61-48	G	0,75	0,00	8,48	59,60	0,00	31,81	4,24	31,80	41,09	0,00	0,00	58,90	0,00	50,00	50,00	0,00
p63-25	G	1,90	0,00	27,13	59,91	5,69	7,25	20,71	393,49	ND	ND	ND	ND	150,00	520,00	670,00	3,30
p63-52	G	1,80	4,10	27,21	56,77	5,54	6,37	21,65	389,70	0,96	11,30	83,83	3,91	2249,00	3270,00	5519,00	1,41
p65-43	G	2,60	0,00	14,05	62,67	1,35	21,92	9,75	253,50	2,32	12,77	58,85	26,05	0,00	90,00	90,00	0,00
p66-22	G	2,20	2,50	24,94	59,14	5,91	3,99	22,47	494,34	2,81	9,91	82,79	4,49	3818,00	3080,00	6898,00	0,78
p67-47	G	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-	-	-	0,00	0,00	0,00	0,00
p74-43	G	2,90	3,01	28,99	55,85	5,28	6,87	23,26	674,54	0,00	11,09	85,53	3,38	206,00	740,00	946,00	3,41
p100-01	G	2,30	4,06	31,94	47,21	2,90	13,88	9,12	209,76	3,40	14,01	62,58	20,01	859,00	2890,00	3749,00	3,23
p103-35	G	4,90	0,00	10,31	64,08	3,11	19,89	10,01	490,49	-	-	-	-	0,00	0,00	0,00	0,00
Controle	G	3,10	0,00	44,58	44,48	1,93	9,01	19,89	616,59	0,00	10,09	89,74	0,17	1270,00	240,00	1510,00	0,18

Os dados apresentados representam a média dos valores experimentais obtidos em cultivos em meio líquido, em duplicata. Cultivos realizados à 30°C, com agitação de 150 rpm, por 96 horas

FC – fonte de carbono; G - Glicose; MSC – Massa seca celular; 3HHx – 3-hidroxihexanoato; 3HO – 3-hidroxi octanoato; 3HD – 3-hidroxidecanoato; 3HDΔ5 - 3-hidroxidecanoato; 3HDD – 3-hidroxidodecanoato; Ram – ramnose; 3HA - 3-hidroxiácidos; ND – não determinado.

Tabela 6 - Produção e caracterização de ramnolipídeos e polihidroxialcanoatos por mutantes selecionados da linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* LFM 634, utilizando óleo de soja como fonte de carbono (20 g/L).

(Continua)

Linhagem	Polihidroxialcanoatos										Ramnolipídios						
	FC	MSC (g/l)	Composição PHA (mol%)					PHA		Composição (mol%)				Concentração (mg/l)			3HA/Ram (mol/mol)
			3HHx	3HO	3HD	3HDdΔ5	3HDd	(%MSC)	(mg/l)	3HHx	3HO	3HD	3HDd	Ramnose	3HA	RL	
p01-37	OS	8,10	0,00	38,83	42,09	9,90	9,18	25,00	2025,00	0,99	9,85	79,81	9,35	1881,00	4480,00	6361,00	2,31
p03-40	OS	7,90	4,88	38,50	44,03	1,32	11,25	20,24	1598,96	1,27	7,37	82,98	8,38	1218,00	4700,00	5918,00	3,73
p04-41	OS	7,20	4,81	40,00	40,14	5,59	9,99	21,79	1568,88	2,04	4,71	85,75	7,50	1338,00	2875,00	4213,00	2,10
p04-56	OS	7,60	4,76	42,47	39,79	4,58	8,39	24,54	1865,04	1,17	6,00	83,55	9,28	1232,00	3195,00	4427,00	2,91
p05-30	OS	8,30	0,00	47,78	47,64	0,74	3,84	19,16	1590,28	0,61	6,51	75,09	17,79	1309,00	4450,00	5759,00	3,19
p05-33	OS	7,10	4,53	36,38	48,05	2,70	8,33	31,07	2205,97	0,45	3,62	86,83	9,09	960,00	3330,00	4290,00	3,32
p07-28	OS	6,90	4,48	36,51	42,91	4,25	11,53	19,19	1324,11	0,00	5,40	88,50	5,50	716,00	1687,00	2403,00	2,30
p07-39	OS	8,30	2,67	31,93	49,55	7,23	8,61	20,31	1685,73	2,03	9,25	79,75	8,97	1610,00	4370,00	5980,00	2,64
p08-30	OS	7,04	4,90	35,97	46,96	2,63	9,58	22,66	1595,26	1,45	3,79	86,30	8,46	897,00	4120,00	5017,00	4,48
p09-13	OS	9,20	3,41	32,78	50,49	3,15	10,16	18,04	1659,68	1,01	8,92	73,79	16,27	8,00	1490,00	1498,00	178,11
p11-31	OS	7,40	5,03	39,07	43,71	2,39	9,79	24,35	1801,90	1,15	4,22	84,28	10,35	1265,00	4555,00	5820,00	3,48
p11-51	OS	6,80	4,76	35,78	48,82	0,96	9,67	27,83	1892,44	1,74	7,28	81,04	9,94	781,00	4270,00	5051,00	5,29
p12-39	OS	6,60	4,31	36,55	47,72	1,52	9,89	16,62	1096,92	2,35	11,83	73,44	12,38	8,00	2205,00	2213,00	324,18
p13-25	OS	6,90	1,76	34,24	47,67	5,15	11,18	12,00	828,00	7,20	15,10	66,60	11,00	349,00	1236,00	1585,00	3,50
p14-35	OS	8,30	4,02	34,46	49,78	2,50	9,28	26,91	2233,53	1,37	8,45	80,42	9,75	1161,00	3250,00	4411,00	2,71
p15-15	OS	7,08	4,14	28,19	53,15	3,88	10,64	19,28	1365,02	1,91	4,97	82,15	10,98	1099,00	3140,00	4239,00	2,75
p16-08	OS	7,50	0,00	39,56	42,79	9,23	8,54	23,49	1761,75	0,40	6,60	83,53	9,47	1851,00	3730,00	5581,00	1,94
p16-14	OS	7,30	3,63	33,92	48,80	5,93	7,71	25,56	1865,88	0,00	4,39	84,82	10,79	870,00	1930,00	2800,00	2,12
p17-40	OS	7,60	1,08	32,35	54,35	3,96	8,25	23,55	1789,80	1,12	5,68	83,01	10,18	1469,00	3390,00	4859,00	2,22
p17-49	OS	8,30	0,00	38,66	43,17	10,31	8,75	33,54	2783,82	1,27	7,88	80,59	10,26	1363,00	4100,00	5463,00	2,89
p17-56	OS	8,60	4,65	40,64	37,91	7,64	9,14	17,43	1498,98	1,99	4,80	80,99	12,22	1232,00	2260,00	3492,00	1,76
p18-29	OS	7,60	0,00	43,65	40,48	8,46	7,39	22,65	1721,40	1,03	4,96	84,39	9,63	1242,00	2910,00	4152,00	2,25
p18-30	OS	7,30	5,12	36,05	37,65	2,32	18,85	24,21	1767,33	1,35	5,59	83,72	9,35	832,00	3865,00	4697,00	4,86
p19-03	OS	6,50	2,32	42,93	43,29	1,17	10,28	23,56	1531,40	1,48	5,04	83,92	9,57	1164,00	4050,00	5214,00	3,35
p19-15	OS	8,50	5,36	43,34	35,56	7,85	7,88	24,36	2070,60	0,94	3,76	81,79	13,51	1257,00	1610,00	2867,00	1,22
p19-57	OS	6,40	3,48	37,18	43,23	3,14	12,96	9,71	621,44	9,26	23,80	58,41	8,54	29,00	380,00	409,00	21,80
p20-19	OS	5,50	4,31	40,68	40,42	2,43	12,16	16,62	914,10	2,56	6,70	80,03	10,71	232,00	1160,00	1392,00	5,65
p20-26	OS	7,20	3,79	36,78	43,77	9,24	6,41	60,81	4378,32	1,43	10,03	79,92	8,63	1237,00	4150,00	5387,00	3,26
p20-28	OS	7,01	4,43	41,92	41,96	1,36	10,32	20,82	1459,48	1,80	2,89	83,58	11,73	748,00	2510,00	3258,00	3,10
p21-37	OS	8,50	0,00	38,45	46,64	2,38	12,52	23,28	1978,80	0,76	6,39	80,66	12,20	1385,00	3905,00	5290,00	2,74
p23-15	OS	8,30	0,00	33,02	52,58	4,81	8,10	23,56	1955,48	1,22	5,87	83,09	9,82	1633,00	3680,00	5313,00	2,17

Tabela 6 - Produção e caracterização de ramnolipídeos e polihidroxiálcanoatos por mutantes selecionados da linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* LFM 634, utilizando óleo de soja como fonte de carbono (20 g/L).

(Conclusão)

Linhagem	Políhidroxialcanoatos								Ramnolípídios								
	FC	MSC (g/l)	Composição PHA (mol%)					PHA		Composição (mol%)				Concentração (mg/l)			3HA/Ram
			3HHx	3HO	3HD	3HDdΔ5	3HDd	(%MSC)	(mg/l)	3HHx	3HO	3HD	3HDd	Ramnose	3HA	RL	(mol/mol)
p26-11	OS	5,90	4,84	36,15	43,65	3,01	12,35	14,21	838,39	0,00	4,50	86,20	9,40	842,00	2081,00	2923,00	2,40
p26-26	OS	6,90	5,51	41,67	36,33	8,33	8,16	23,02	1588,38	1,20	5,81	82,56	10,42	991,00	2480,00	3471,00	2,40
p28-21	OS	8,90	4,46	40,79	43,05	2,23	9,50	23,65	2104,85	1,44	3,47	85,15	9,95	951,00	5210,00	6161,00	5,20
p28-37	OS	5,50	4,34	42,49	41,76	2,15	9,56	36,67	2016,85	1,27	5,92	85,96	6,85	1100,00	4130,00	5230,00	0,28
p28-55	OS	7,03	0,00	51,86	35,79	0,00	12,39	4,62	324,79	1,89	6,05	76,91	15,16	305,00	800,00	1105,00	2,51
p28-59	OS	7,60	5,08	42,30	41,12	2,38	9,11	22,53	1712,28	0,00	4,20	87,40	8,40	1070,00	1961,00	3031,00	1,80
p32-10	OS	6,10	2,63	22,28	61,07	6,01	8,01	25,90	1579,90	0,00	0,00	0,00	100,00	46,00	80,00	126,00	1,44
p32-20	OS	6,60	3,93	37,29	48,79	1,78	8,21	22,01	1452,66	5,17	12,24	57,90	18,27	27,00	450,00	477,00	7,25
p34-14	OS	6,30	1,58	45,91	35,62	1,07	15,80	6,99	440,37	6,76	21,75	36,36	35,12	53,00	840,00	893,00	8,01
p36-55	OS	7,80	3,42	29,60	54,62	4,80	7,55	26,57	2072,46	0,00	22,40	69,80	7,80	14,00	360,00	374,00	26,70
p42-12	OS	5,90	3,73	39,78	42,78	2,35	11,36	26,09	1539,31	0,00	4,80	86,10	9,20	918,00	2120,00	3038,00	2,21
p42-52	OS	5,30	4,57	40,87	43,23	1,07	10,24	21,62	1145,86	1,03	9,47	81,23	8,27	1068,00	4200,00	5268,00	3,77
p42-55	OS	5,60	3,30	37,06	48,40	1,47	10,76	17,92	1003,52	12,38	29,81	43,56	14,25	21,00	450,00	471,00	22,14
p43-36	OS	5,10	4,08	34,32	40,85	10,65	10,08	17,43	888,93	8,34	33,59	53,26	4,81	77,00	443,00	520,00	7,20
p46-26	OS	7,40	5,17	40,44	45,38	0,00	9,00	26,66	1972,84	1,20	9,36	81,01	8,44	321,00	4960,00	5281,00	9,20
p49-09	OS	8,90	0,00	28,36	53,35	8,96	9,32	24,60	2189,40	1,30	8,20	80,12	10,38	1398,00	4010,00	5408,00	2,73
p49-57	OS	5,60	3,85	33,87	41,62	10,27	10,38	13,18	738,08	10,08	21,59	58,63	9,70	ND	440,00	440,00	ND
p51-14	OS	7,90	3,22	32,42	48,83	7,44	8,08	22,29	1760,91	2,97	8,14	78,71	10,18	1138,00	3320,00	4458,00	2,84
p53-30	OS	5,03	5,42	50,16	32,63	2,17	9,60	13,18	662,95	17,03	23,53	37,89	27,55	16,00	310,00	326,00	1,93
p58-03	OS	8,10	4,97	43,39	39,93	2,23	9,48	22,57	1828,17	1,26	4,25	86,49	7,99	835,00	2960,00	3795,00	2,73
p58-07	OS	8,30	4,63	44,81	39,29	1,96	9,31	22,77	1889,91	0,96	3,87	86,01	9,16	894,00	3110,00	4004,00	3,34
p61-48	OS	5,10	0,00	25,01	58,45	8,14	8,39	7,17	365,67	11,81	30,30	27,89	29,98	0,00	380,00	380,00	0,00
p63-25	OS	6,90	0,00	36,03	42,86	12,10	8,51	21,07	1453,83	ND	ND	ND	ND	835,00	2960,00	3795,00	2,73
p63-52	OS	8,80	4,57	38,71	46,82	0,66	9,22	31,90	2807,20	0,47	6,74	83,58	9,21	1845,00	4720,00	6565,00	2,48
p65-43	OS	5,60	0,00	13,35	33,48	0,00	53,16	1,43	80,08	1,30	8,72	79,48	10,50	106,00	3430,00	3536,00	0,05
p66-22	OS	5,90	4,83	33,41	43,06	10,78	7,91	26,45	1560,55	0,00	4,38	86,66	8,96	4533,00	3860,00	8393,00	0,82
p67-47	OS	0,65	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-	-	-	0,00	0,00	0,00	0,00
p74-43	OS	8,01	4,65	38,66	44,25	2,30	10,12	18,54	1485,05	1,33	6,92	84,65	7,10	849,00	3430,00	4279,00	4,62
p100-01	OS	7,20	4,54	40,57	44,61	0,97	9,29	24,92	1794,24	1,31	3,74	85,82	9,13	974,00	4000,00	4974,00	3,94
p103-35	OS	1,60	2,16	20,13	64,22	6,00	7,50	39,91	638,56	-	-	-	-	0,00	0,00	0,00	0,00
Controle	OS	6,90	2,15	41,22	40,24	8,54	7,84	23,96	1653,24	1,11	4,42	84,96	9,52	809,00	1360,00	2169,00	1,61

Os dados apresentados representam a média dos valores experimentais obtidos em cultivos em meio líquido, em duplicata. Cultivos realizados à 30°C, com agitação de 150 rpm, por 96 horas.

FC – fonte de carbono; OS - Óleo de Soja; MSC – Massa seca celular; 3HHx – 3-hidroxihexanoato; 3HO – 3-hidroxi octanoato; 3HD – 3-hidroxidecanoato; 3HDΔ5 - 3-hidroxí-5-dodecenoato; 3HDd – 3-hidroxidodecanoato; Ram – ramnose; 3HA - 3-hidroxiácidos; ND – não determinado.

Dos 61 mutantes analisados, apenas o mutante p20-26 apresentou produção de PHA correspondendo a mais que duas vezes a concentração atingida pela linhagem controle e somente quando cultivada com óleo de soja (Tabela 6). Esse mutante também apresentou um aumento na concentração de ramnolipídeo produzido, sobretudo da concentração de 3HA detectada, indicando que a mutação pode ter desencadeado uma utilização mais eficiente dos 3HAs, seja para produção de PHAs, seja para produção de RLs. A partir de glicose, o maior valor de produção de PHA atingido pelo mutante correspondeu a uma concentração cerca de 90% maior em relação à linhagem selvagem (p28-55, Tabela 5). Para o mutante p28-55 observou-se uma redução drástica na quantidade de ramnolipídeo produzido em relação à linhagem controle, sobretudo em relação à quantidade de ramnose, indicando que a mutação deve ter afetado a utilização da fonte de carbono para produção da ramnose, permitindo um maior fluxo desta para a síntese de PHA. É interessante destacar que o mutante p28-55, quando cultivado em óleo de soja, apresentou uma redução significativa em relação à linhagem controle com relação à produção de PHAs e RLs, indicando que o gene mutado afeta de forma diferente a produção de PHAs e RLs, dependendo da fonte de carbono utilizada.

Vinte e três mutantes apresentaram produção de PHAs correspondendo a menos da metade da concentração atingida pela linhagem selvagem quando cultivados em glicose. Em óleo de soja, esse número correspondeu a 9. Cinco mutantes apresentaram produção reduzida de PHAs, tanto em glicose, como em óleo de soja. Apenas para o mutante p67-47 não foi observada a produção de PHAs ou RLs quando cultivado em glicose ou óleo de soja. Entretanto, esse mutante não apresentou bom crescimento e deve estar afetado em algum gene que impede seu crescimento em meio mínimo. O mutante p28-59 apresentou-se seriamente afetado na produção de PHAs e RLs a partir de carboidratos, sem ter problemas no seu crescimento. Esse mutante apresenta uma produção normal de PHAs e RLs a partir de óleo de soja, assim deve estar afetado em gene relacionado à produção dos dois compostos especificamente a partir de carboidratos.

Quando glicose foi suprida como fonte de carbono, 11 mutantes apresentaram aumento na produção de RLs e redução na produção de PHAs. Entretanto, nenhum dos mutantes estava totalmente afetado na produção de PHAs. No futuro, será interessante direcionar o trabalho de mutagênese para obtenção de mutantes completamente afetados na produção de PHA e avaliar o efeito dessas mutações na produção de RLs.

Um total de 27 mutantes apresentaram uma produção de RLs correspondendo a mais que duas vezes o valor atingido pela linhagem controle (LFM634) quando cultivados com glicose. Com óleo de soja, este número foi para 26 mutantes. Destes, 19 apresentaram produção aumentada simultaneamente no cultivo com glicose e óleo de soja. Na maioria das vezes o aumento da produção de RL esteve associada a um aumento na concentração de 3HAs e em alguns casos também de ramnose, mas em nenhum dos mutantes o aumento da produção de RLs pode ser relacionado especificamente a um aumento na concentração de ramnose. Este resultado era esperado uma vez que as moléculas de ramnose apenas podem ser incorporadas às moléculas de 3HAA existentes. Destacou-se como linhagem superprodutora o mutante p66-22 que produziu RLs em concentração superior a 6,0 g/L em glicose e óleo de soja. Também merecem destaque os mutantes p01-37 e p63-52 que atingiram concentrações de RLs a partir de óleo de soja superior a 6,0 g/L, atingido uma produção a partir de glicose significativamente superior à linhagem selvagem (Tabelas 5 e 6). Os mutantes p03-40, p07-39 e p51-14 também apresentam um perfil interessante, pois, embora tenham superproduzido RLs a partir de óleo de soja, apresentam uma séria deficiência na produção desse composto a partir de carboidratos, indicando que os genes afetados nestes mutantes podem ter surtido efeitos na metabolização de carboidratos.

Dezenove mutantes apresentaram uma produção de RLs correspondendo a menos que a metade do valor atingido com a linhagem selvagem (LFM634) quando cultivados com glicose. Com óleo de soja, este número correspondeu a 12 mutantes. Onze mutantes apresentaram produção de RLs menor em glicose ou óleo de soja. A partir de carboidratos, há uma boa correlação entre a redução da produção de ramnolipídeos e a redução da ramnose detectada, embora em muitos dos mutantes a produção de 3HAAs também foi afetada. Utilizando óleo de soja, os mutantes com produção reduzida de ramnolipídeos foram afetados tanto na produção de ramnose como de 3HAAs.

Merece destaque como mutante deficiente na produção de RLs, p103-35, que embora tenha apresentado um bom crescimento e acúmulo de PHA, não foi detectada a produção de RLs. Os mutantes p32-10, p53-30 e p61-48 também se apresentam afetados na síntese de RLs tanto a partir de glicose como de óleo de soja, sendo detectado menos que 400 mg/L desse composto no cultivo desses mutantes.

Na maioria dos mutantes afetados na síntese de RLs, a produção de PHA diminuiu ou não parece ter sofrido grandes alterações com relação à linhagem selvagem. Uma exceção é o

mutante p28-55 que, em glicose, teve uma diminuição na produção de RLs e um aumento na produção de PHAs, embora este não foi maior que duas vezes a produção de linhagem controle. Esperava-se que mutantes deficientes na produção de RLs apresentassem um maior acúmulo de PHAs, pois as rotas de biossíntese desses dois compostos devem competir por intermediários do metabolismo de ácidos graxos. De acordo com o que foi proposto por Zhu e Rock (2008) (Figura 7), RhlA e PhaG (REHM; KRÜGER; STEINBÜCHEL, 1998) seriam responsáveis pela transferência de intermediários da biossíntese de ácidos graxos para a biossíntese de ramnolipídios e PHAs, respectivamente.

Vários outros mutantes apresentaram deficiência na produção de RLs, mas apenas em uma das duas fontes de carbono avaliadas. Trabalhos anteriores já vêm descrevendo a influência das fontes de carbono utilizadas nos cultivos na biossíntese de RLs (ALMEIDA, 2011; LOVAGLIO, 2011), sendo assim, o estudo destes mutantes pode contribuir para o melhor entendimento da influência e das rotas metabólicas seguidas pelos diferentes tipos de substratos utilizados como fontes de carbonos nos cultivos.

5.6 Mutantes p09-13 e p12-39

Os mutantes p09-13 e p12-39 apresentaram uma produção normal de 3HAAs dos RLs, porém apresentam uma redução expressiva na concentração de ramnose (Tabelas 5 e 6). A concentração de ramnose detectada pode mesmo corresponder a resíduos de ramnose não efetivamente ligadas a 3HAAs. Neste caso, o gene afetado nestes mutantes provavelmente corresponderia ao *rhlB* (CHOI et al., 2011; SOBERÓN-CHÁVEZ et al., 2005), cujo produto é responsável pela ligação da ramnose ao 3HAA na formação do mono-ramnolipídeo. Alternativamente, estes mutantes podem estar afetados em genes que reduzem significativamente a biossíntese de ramnose, impedindo que esta esteja disponível para a síntese de RLs.

Almeida (2011), em seu trabalho, demonstrou que a composição dos 3HAs presentes nos RLs produzidos por *P. aeruginosa* pode ser modulada conforme a fonte de carbono fornecida, ao contrário do proposto pela literatura. Nesse trabalho, a análise dos RLs produzidos com óleos vegetais como fonte de carbono, indicaram a presença do monômero 3HDd Δ_6 (3-hidroxi-6-dodecenoato), fato que indicaria a participação não só da biossíntese de ácidos graxos na produção de RLs, mas também a participação da β -oxidação de ácidos graxos. Para testar essa hipótese foram realizados experimentos utilizando óleos vegetais com

diferentes frações de ácido linoleico em sua composição e a presença e quantidade do monômero 3HDd Δ_6 (3-hidroxi-6-dodecenoato) foi analisada. Ao final, foi possível relacionar a quantidade de ácido linoleico provido com a quantidade do monômero 3HDd Δ_6 (3-hidroxi-6-dodecenoato) detectado, sendo que, maiores quantidades de ácido linoleico suprido geravam maiores quantidades deste monômero.

Uma vez que os mutantes p09-13 e p12-39 apresentam baixa quantidade de ramnose, mas ainda produzem 3HAA, são especialmente interessantes para avaliar a especificidade do produto do gene *rhlA* na ligação de 3HAs e observar se a composição dos RLs podem ser modulada, assim como em PHAs (SILVA-QUEIROZ et al., 2009).

Para se alcançar esse objetivo, estas duas linhagens mutantes foram cultivadas em diferentes óleos vegetais, com composições variadas, como mostra a Tabela 7.

Tabela 7 - Composição de ácidos graxos de óleos vegetais obtida a partir de análise de cromatografia gasosa.

Óleos	Composição de ácidos graxos (% m/m)										
Vegetais	C8	C10	C12	C14	C16	C18	C18:1	C18:2	C18:3	C18:1*	C18:3*
Arroz					16,79	3,96	36,99	39,77	2,49		
Canola	0,22	0,26	4,05	1,55	11,60	3,97	20,65	51,32	6,38		
Girassol				0,08	8,95	4,16	20,70	62,42	3,70		
Linhaça					11,29	3,26	21,29	57,30	6,86		
Milho	0,13	0,15	2,37	0,91	11,38	3,93	24,83	50,84	5,45		
Palma	0,02	0,02	0,25	0,82	41,42	4,99	42,35	9,89	0,24		
Soja					11,16	3,73	24,46	54,87	5,78		
Tungue					8,63	6,52	22,75	19,41	?		42,69

C8 – ácido octanóico, C10 – ácido decanóico, C12 – ácido láurico, C14 – ácido mirístico, C16 – ácido palmítico, C18 – ácido esteárico, C18:1 – ácido oleico, C18:2 – ácido linoleico, C18:3 – ácido linolênico, C18:1* - ácido ricinoleico, C18:3* - ácido α -eleostearico, ? – valores não determinados pois outros compostos apresentavam o mesmo tempo de retenção destes ácidos graxos. Modificado de Ávila-Léon e colaboradores (2007).

Esses cultivos foram realizados de forma semelhante aos cultivos de óleo de soja, porém, em triplicata. Os resultados obtidos estão sintetizados na Tabela 8.

Todos os cultivos com óleo vegetais revelam valores maiores da concentração média de PHA produzido pelo mutante p09-13 em relação à linhagem selvagem, embora em alguns casos essa diferença não seja significativa. Por outro lado, no cultivo em glicose, o mutante p09-13 apresenta uma redução na concentração de PHA em relação à linhagem selvagem. Quando óleos vegetais foram supridos, não foram observadas mudanças expressivas na

composição do PHA produzido pelo mutante p09-13 em relação à linhagem selvagem. A partir de glicose, há uma diferença expressiva na composição do PHA produzido pelo mutante p09-13 em relação à linhagem selvagem. Estes resultados indicam que uma mutação no gene *rhlB* não seria suficiente para explicar as alterações na composição e teor do PHA acumulado pelo mutante p09-13.

O comportamento do mutante p12-39 foi totalmente o inverso. Isto é, nos cultivos em óleos vegetais a concentração de PHA foi menor que aquela observada para a linhagem selvagem, exceto nos cultivos com óleo de canola. No cultivo utilizando glicose, observa-se um valor médio de concentração de PHA maior para o mutante p12-39 em relação à linhagem selvagem. Novamente, as alterações observadas nas concentrações de PHA produzidos não são facilmente explicadas pela mutação no gene *rhlB*, pois, em princípio, um menor direcionamento da fonte de carbono para produção de ramnose deveria aumentar a produção de PHA e não reduzir.

Tabela 8 - Produção e caracterização de ramnolipídeos e polihidroxicanoatos pelos mutantes p09-13 e p12-39, e da linhagem selvagem de *Pseudomonas aeruginosa* LFM 634, utilizando diferentes óleos vegetais e glicose como fonte de carbono (20 g/L).

		Polihidroxicanoatos										Ramnolipídios									
Fonte de Carbono	Linhagem	MSC (g/l)	Composição PHA (mol%)						PHA	PHA	Composição (mol%)						Concentração (mg/l)			3HA/Ram	
			3HHx	3HO	3HD	3HDdΔ5	3HDdΔ6	3HDd	(%MSC)	(mg/l)	3HHx	3HO	3HD	3HDdΔ5	3HDdΔ6	3HDd	Ramnose	3HA	RL	(mol/mol)	
Óleo de Arroz	634	4,40 ± 0,33 9,52 ± 0,57	7,57 ± 1,38 11,64 ± 1,49	30,76 ± 2,13 30,65 ± 0,54	37,14 ± 0,73 35,50 ± 1,85	9,69 ± 0,23 10,41 ± 0,34	0,00 ± 0,00 0,00 ± 0,00	14,84 ± 0,15 11,80 ± 1,11	41,73 ± 0,69 45,33 ± 3,65	1837,59 ± 105,34 4313,78 ± 20,87	1,45 ± 0,46 10,19 ± 4,43	4,94 ± 1,76 10,54 ± 3,61	76,77 ± 2,61 19,12 ± 7,02	6,11 ± 2,64 0,00 ± 0,00	3,09 ± 0,27 9,79 ± 19,60	7,65 ± 0,11 50,36 ± 19,60	1274,33 ± 223,10 5,33 ± 7,54	4173,22 ± 1060,90 288,80 ± 60,33	5447,55 ± 1271,81 294,14 ± 55,67	3,08 ± 0,36 14,12 ± 0,00	
	P.09-13	4,02 ± 0,63	6,02 ± 0,94	33,14 ± 2,69	44,34 ± 1,82	5,82 ± 0,26	0,00 ± 0,00	10,67 ± 0,08	20,30 ± 0,41	815,86 ± 2,58	3,89 ± 1,47	20,67 ± 2,55	54,81 ± 12,85	3,16 ± 1,59	5,38 ± 3,18	12,08 ± 4,33	4,33 ± 1,89	1387,08 ± 139,20	1391,41 ± 138,48	250,93 ± 196,36	
	P.12-39	3,86 ± 0,15 7,69 ± 1,45	6,19 ± 0,40 11,02 ± 2,78	33,45 ± 0,83 33,69 ± 2,92	38,84 ± 2,65 35,06 ± 1,85	10,00 ± 0,66 11,54 ± 2,23	0,00 ± 0,00 0,00 ± 0,00	11,52 ± 1,22 8,69 ± 1,67	33,43 ± 6,11 36,31 ± 9,59	1289,46 ± 9,37 2792,85 ± 138,68	1,69 ± 0,38 12,04 ± 6,84	7,02 ± 0,93 15,94 ± 7,53	76,75 ± 1,53 28,73 ± 18,05	2,99 ± 2,35 0,00 ± 0,00	4,52 ± 0,43 13,56 ± 13,69	7,03 ± 0,72 29,73 ± 12,71	976,67 ± 147,16 4,67 ± 6,60	3369,03 ± 641,31 490,29 ± 283,37	4345,69 ± 737,40 494,96 ± 289,33	3,33 ± 0,59 58,86 ± 0,00	
	Óleo de Canola	634	4,31 ± 0,60	6,62 ± 1,11	32,08 ± 1,33	38,94 ± 2,84	12,60 ± 1,18	0,00 ± 0,00	9,76 ± 1,19	30,10 ± 1,53	1298,12 ± 9,27	1,21 ± 0,47	5,70 ± 1,98	78,43 ± 5,44	3,44 ± 2,05	3,48 ± 3,60	7,73 ± 0,86	805,33 ± 77,81	2700,01 ± 837,04	3356,09 ± 996,83	2,96 ± 0,77
Óleo de Girassol	P.09-13	9,18 ± 0,58	12,97 ± 0,50	34,73 ± 0,94	31,86 ± 0,28	12,80 ± 0,13	0,00 ± 0,63	7,65 ± 0,72	37,16 ± 0,84	1955,21 ± 4,85	4,79 ± 0,63	10,33 ± 4,04	16,61 ± 4,90	0,68 ± 3,84	14,61 ± 0,33	52,98 ± 8,32	9,67 ± 2,83	256,10 ± 685,58	265,77 ± 683,18	10,62 ± 0,00	
	P.12-39	4,17 ± 0,58	5,35 ± 0,50	33,42 ± 0,94	39,85 ± 0,28	11,03 ± 0,13	0,68 ± 0,63	9,66 ± 0,72	14,35 ± 0,84	598,80 ± 4,85	3,14 ± 0,63	18,30 ± 4,04	50,31 ± 4,90	3,18 ± 3,84	7,49 ± 0,33	17,58 ± 8,32	2,00 ± 2,83	1548,16 ± 685,58	1550,16 ± 683,18	114,34 ± 0,00	
	Óleo de Linhaça	634	4,04 ± 0,46	6,61 ± 0,72	31,40 ± 1,43	38,87 ± 0,58	12,07 ± 1,02	0,00 ± 0,00	11,05 ± 0,96	32,26 ± 1,70	1303,17 ± 7,85	1,04 ± 0,18	4,41 ± 1,10	79,07 ± 5,66	4,41 ± 3,43	3,32 ± 2,13	7,76 ± 2,04	1147,50 ± 157,62	3516,34 ± 679,50	4663,84 ± 834,04	2,89 ± 0,19
	P.09-13	8,91 ± 2,48	10,93 ± 2,57	33,88 ± 6,78	33,54 ± 3,97	11,35 ± 8,56	0,00 ± 0,00	10,30 ± 1,99	37,22 ± 3,68	3314,13 ± 91,32	12,97 ± 8,80	14,42 ± 6,06	14,56 ± 2,09	0,00 ± 0,00	20,40 ± 22,92	37,65 ± 21,98	1,33 ± 1,89	170,25 ± 71,41	171,59 ± 73,27	61,69 ± 0,00	
Óleo de Milho	P.12-39	3,40 ± 0,58	5,58 ± 0,44	31,28 ± 0,72	39,15 ± 0,44	12,10 ± 0,78	1,53 ± 0,24	10,36 ± 0,18	17,78 ± 0,41	605,14 ± 2,37	3,00 ± 0,60	14,40 ± 1,06	55,40 ± 4,39	2,36 ± 3,33	10,99 ± 2,28	13,86 ± 3,28	3,67 ± 3,86	1717,49 ± 525,21	1721,16 ± 523,05	639,21 ± 514,93	
	634	3,96 ± 0,33	6,62 ± 0,29	32,21 ± 1,09	37,40 ± 0,34	11,49 ± 0,16	0,00 ± 0,00	12,27 ± 0,97	37,80 ± 0,78	1495,53 ± 2,58	1,16 ± 0,23	4,84 ± 1,77	78,00 ± 2,64	5,62 ± 1,59	2,70 ± 1,19	7,69 ± 1,74	1072,00 ± 188,02	3328,47 ± 1265,63	4400,47 ± 1442,26	2,87 ± 0,61	
	P.09-13	8,81 ± 1,63	10,89 ± 2,44	30,51 ± 3,91	34,79 ± 0,98	12,82 ± 3,08	0,00 ± 0,00	11,00 ± 3,00	42,13 ± 11,58	3712,04 ± 188,24	9,92 ± 10,98	9,87 ± 7,92	22,63 ± 11,80	0,00 ± 0,00	4,59 ± 6,49	53,00 ± 8,03	4,67 ± 6,60	159,60 ± 65,34	164,27 ± 60,41	5,88 ± 0,00	
	P.12-39	2,34 ± 0,37	6,37 ± 0,92	32,55 ± 1,46	35,09 ± 1,80	8,74 ± 0,56	3,51 ± 0,97	13,74 ± 1,94	12,78 ± 5,52	298,32 ± 20,18	3,22 ± 0,77	16,62 ± 4,21	46,33 ± 4,22	6,99 ± 8,23	11,69 ± 5,85	15,15 ± 3,87	2,33 ± 1,70	1103,64 ± 236,06	1105,97 ± 235,49	272,32 ± 34,49	
Glicose	634	2,66 ± 0,01	3,12 ± 0,39	22,53 ± 1,60	55,96 ± 0,41	7,42 ± 0,75	0,00 ± 0,00	10,97 ± 0,84	14,45 ± 1,17	383,63 ± 0,12	0,37 ± 0,02	6,06 ± 0,09	81,91 ± 0,33	4,53 ± 0,10	0,00 ± 0,00	7,14 ± 0,30	1722,33 ± 307,30	2657,18 ± 221,89	4379,51 ± 526,37	1,53 ± 0,18	
	P.09-13	3,63 ± 0,06	1,99 ± 3,45	8,50 ± 14,71	35,31 ± 4,50	11,65 ± 4,92	0,00 ± 0,00	42,56 ± 4,76	4,36 ± 2,09	158,33 ± 1,18	0,00 ± 0,00	5,48 ± 4,78	62,01 ± 13,71	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	32,50 ± 10,27	16,67 ± 14,57	69,67 ± 5,93	86,34 ± 17,53	2,60 ± 0,04	
	P.12-39	2,77 ± 0,10	1,95 ± 0,50	15,94 ± 1,89	62,33 ± 4,92	7,14 ± 0,33	0,00 ± 0,00	12,64 ± 3,04	19,22 ± 3,83	532,34 ± 3,67	0,55 ± 0,09	4,69 ± 0,16	76,62 ± 1,60	5,30 ± 0,43	0,00 ± 0,00	12,84 ± 1,50	1,67 ± 2,89	1604,29 ± 94,87	1605,95 ± 92,55	3212,16 -	
	634	3,88 ± 0,12	4,71 ± 1,00	37,52 ± 7,10	31,37 ± 5,11	2,74 ± 2,11	14,76 ± 12,29	8,90 ± 1,39	21,04 ± 1,73	816,09 ± 2,01	0,86 ± 0,57	3,64 ± 0,19	83,27 ± 1,20	3,94 ± 0,32	0,90 ± 0,88	7,38 ± 0,68	856,33 ± 183,84	2007,64 ± 275,54	2863,97 ± 456,14	2,26 ± 0,20	
Óleo de Soja	P.09-13	7,43 ± 2,47	7,92 ± 2,90	31,65 ± 11,50	28,11 ± 4,36	5,39 ± 9,34	18,87 ± 7,72	8,06 ± 1,37	33,60 ± 4,47	2496,22 ± 110,50	5,92 ± 0,65	10,98 ± 2,17	54,93 ± 4,33	0,00 ± 0,00	0,00 ± 6,33	28,17 ± 6,33	52,00 ± 17,78	176,86 ± 64,24	228,86 ± 80,55	3,28 ± 0,45	
	P.12-39	4,50 ± 0,66	4,07 ± 0,15	35,01 ± 2,40	39,79 ± 0,16	1,61 ± 1,51	8,89 ± 2,61	10,63 ± 0,91	16,24 ± 0,81	730,34 ± 5,35	2,33 ± 0,37	13,91 ± 1,04	64,09 ± 2,13	4,10 ± 1,21	6,40 ± 0,57	9,17 ± 0,38	2,00 ± 2,00	2018,55 ± 334,30	2020,55 ± 334,38	800,29 ± 504,11	

Os dados apresentados representam as médias e seus respectivos desvios padrões dos valores experimentais obtidos em cultivos em meio líquido, em triplicata. Cultivos realizados à 30 °C, com agitação de 150 rpm, por 96 horas.

634: Linhagem selvagem LFM634; MSC: Massa seca celular; 3HHx: 3-hidroxi-hexanoato; 3HO: 3-hidroxi-octanoato; 3HD: 3-hidroxi-decanoato; 3HDdΔ5: 3-hidroxi-5-dodecenoato; 3HDdΔ6: 3-hidroxi-6-dodecenoato; 3HDd: 3-hidroxi-dodecanoato; RL: ramnolipídeo; 3HA: 3-hidroxi-ácidos; %MSC: porcentagem da massa seca celular; (-): não determinado.

No caso das análises da produção de ramnolipídeos, claramente se observa uma redução expressiva da concentração de ramnose detectada nos cultivos utilizando as linhagens mutantes p09-13 e p12-39, quando comparados aos cultivos com a linhagem selvagem. Este resultado é compatível com a principal característica destes mutantes detectada nos experimentos prévios (Tabelas 5 e 6). Entretanto, em geral, também se observa uma redução na concentração de 3HAA detectada nos cultivos dos mutantes em relação à linhagem selvagem, que não havia sido observada nos cultivos prévios em glicose e óleo de soja (Tabela 5 e 6). Esta redução é mais expressiva em relação ao mutante p09-13 do que com o mutante p12-39. Como, em geral, para o mutante p09-13, observou-se um aumento na concentração de PHA produzido a partir de óleos vegetais, aparentemente esse mutante apresenta um direcionamento preferencial dos 3HA-CoA gerados na β -oxidação para produção de PHA em relação à RLs.

Claramente os mutantes p09-13 e p12-39 apresentam fenótipos distintos com relação à produção de PHA e RLs e que também se distinguem em relação à linhagem selvagem. Um melhor entendimento destes mutantes pode contribuir para uma maior compreensão do metabolismo e regulação do processo de biossíntese de ramnolipídeos e sua inter-relação com a biossíntese de PHA, permitindo, no futuro, não só a obtenção de linhagens mais eficientes na biossíntese destes produtos, mas também um controle mais eficiente da composição do produto formado.

Para avaliar os efeitos da composição do óleo vegetal na composição do ramnolipídeo produzido, foram correlacionados a fração de ácido linoleico presente nos óleos de arroz, canola, girassol e linhaça e fração molar de 3HDd Δ_6 presente nos 3HAA dos ramnolipídeos (Figura 13). O constituinte 3HDd Δ_6 deriva especificamente do ácido linoleico, após este sofrer três ciclos de β -oxidação.

Figura 13. Correlação entre a fração de ácido linoleico presente nos óleos vegetais e a fração molar de 3HDd Δ_6 presente nos ramnolipídeos.

Como pode ser observado na Figura 13, não há um aumento expressivo na fração molar de 3HDd Δ_6 (3-hidroxi-6-dodecenoato) com o suprimento de óleos vegetais contendo frações mais expressivas de ácido linoleico em sua composição para a linhagem selvagem. Um pequeno aumento pode ser observado, quando os óleos vegetais foram supridos para os mutantes p09-13 e p12-39. As frações molares de 3HDd Δ_6 presentes nos ramnolipídeos foram sempre maiores nos mutantes quando comparados à linhagem selvagem. Além disso, a fração desse constituinte foi maior para o mutante p09-13 quando comparada ao mutante p12-39. Os mutantes p09-13 e p12-39 apresentam uma produção menor de 3HAAs e também se observa uma alteração significativa na fração molar de 3HD detectada nos ramnolipídeos. Para o mutante p09-13 não foi detectado o constituinte 3HDd Δ_5 , exceto para o cultivo em óleo de girassol e em pequena quantidade. Destaca-se que o constituinte 3HDd Δ_5 é gerado especificamente na biossíntese de ácidos graxos. Assim, todos estes resultados são compatíveis com uma redução no direcionamento de intermediários da biossíntese de ácidos graxos para biossíntese de RLs, sobretudo no mutante p09-13. A redução significativa da produção de 3HAAs a partir de glicose pelo mutante p09-13 também sustenta essa hipótese. Por outro lado, esses efeitos são menos drásticos para o mutante p12-39 que ainda deve apresentar uma contribuição significativa da biossíntese de ácidos graxos para a biossíntese de RLs. A maior fração de 3HDd Δ_6 para o mutante p09-13 também é compatível com essa

ação molecular (YUSTE; ROJO, 2001; MORENO et al., 2007). Recentemente o produto do gene *crc* foi relacionado com a produção de PHA, sendo que a inativação desse gene levava a um aumento da produção desse composto (ROSA et al., 2013). A identificação desse gene como o gene afetado no mutante p09-13 é compatível com os resultados obtidos. A inativação desse gene parece ter aumentado a produção de PHA (em cultivos com óleos vegetais) assim como observado por Rosa e colaboradores (2013), além de ter alterado vários aspectos do metabolismo de *P. aeruginosa* e que resultam em uma redução da ramnose produzida, bem como do direcionamento de intermediários da biossíntese de ácidos graxos para biossíntese de RLs.

O mutante p12-39 também foi submetido ao sequenciamento da região de inserção do transposon e a sequência obtida foi usada na procura de sequências semelhantes na base de dados do NCBI (NCBI - National Center for Biotechnology Information). O melhor alinhamento obtido está representado na figura 16.

Figura 16 - Alinhamento das sequências da região de inserção do transposon no genoma de p12-39 e *Pseudomonas aeruginosa* PA1R

```

p12-39    1      CCGTGCCTGCTGGTACCTGGACAACCAGGACTGGGTGGCCAACGTAACCAGCGGTGCCTACC    60
            |||
PA1R    3457991  CCGTGCCTGCTGGTACCTGGACAACCAGGACTGGGTGGCCAACGTAACCAGCGGTGCCTACC    3458050

p12-39    61      -CGAGTGGGTGGGTAA    75
            |||
PA1R    3458051  GCGAGTGGGTGGGTAA    3458066

```

Assim como no caso de p09-13, a sequência obtida para o mutante p12-39 apresentou um baixo número de base nucleotídicas, porém o valor de identidade foi alto (99%) (NCBI - National Center for Biotechnology Information). Os melhores resultados obtidos na busca por sequências semelhantes na base de dados do NCBI identificou mais de 14 sequências de linhagens *Pseudomonas aeruginosa* com 99% de identidade.

O produto do gene afetado no mutante p12-39 correspondeu a uma dTDP-glicose 4,6-dehidratase, identificada como RlmB. Essa enzima está relacionada com a biossíntese do precursor da ramnose presente no RLs, a dTDP-L-ramnose a partir de glicose (RAHIM et al., 2000; KEGG). A identificação desse gene no mutante p12-39 é condizente com o fenótipo observado do mutante e também comprova que os dois mutante (p09-13 e p12-39) estão afetados em genes distintos, como esperado.

Esses resultados indicam que não somente os genes envolvidos diretamente na via de biossíntese de RLs ou de PHAs têm influência na produção e modulação dos RLs, sendo que

mais pesquisas sobre a regulação metabólica serão necessárias para um melhor entendimento da biossíntese de RLs.

O título original do trabalho foi alterado de: "Obtenção e análise de mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* afetados na biossíntese de polihidroxialcanoatos ou ramnolipídeos e avaliação da melhora na eficiência de produção desses compostos" para: “**Obtenção e análise de mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* afetados na biossíntese de ramnolipídeos**”, como sugerido e aceito no exame de qualificação. A mudança realizada foi restrita ao título do trabalho, sendo que todos os procedimentos e organismos utilizados permaneceram inalterados e por isso o certificado de isenção do comitê de ética, no qual consta o título antigo, não foi alterado para o título atual.

6. CONCLUSÃO

Como principais conclusões deste trabalho podemos apontar:

- A metodologia para a obtenção de mutantes utilizando o transposon *ISlacZ/hah* (JACOBS et al., 2003) foi altamente efetiva, sendo obtidos pelo menos 61 mutantes afetados no metabolismo de PHAs e/ou RLs dentre 9840 mutantes.
- Dentre os melhores mutantes obtidos, os afetados na biossíntese ramnolipídeos foram os mais abundantes e com a maior diversidade de fenótipos, uma vez que foram obtidos mutantes superprodutores de RLs e mutantes defectivos na produção desse composto.
- Mutantes afetados na biossíntese de PHAs foram mais escassos e mais difíceis de serem obtidos. O único mutante totalmente afetado na biossíntese de PHAs (p67-47), apresentou sérios problemas em seu crescimento, indicando estar afetado em gene não especificamente relacionando com a biossíntese ou regulação da biossíntese desse composto.
- Foram obtidos mutantes produtores de altas concentrações de RLs, em relação à linhagem selvagem LFM634, sendo que o mutante p66-22 chegou a produzir cerca de 4 vezes mais RLs, chegando na marca de 8,0 g/L de RLs.
- Os mutantes p09-13 e p12-39 foram cultivados em óleos vegetais apresentando diferentes frações de ácido linoleico e produziram ramnolipídeos com diferentes frações molares do constituinte 3HDdΔ₆ (3-hidroxi-6-dodecenoato), indicando que podem ser mais efetivos na modulação da composição de ramnolipídeos produzidos a partir de óleos vegetais ou misturas destes.
- O mutante p09-13 está afetado no gene *crc*, cujo produto é um regulador global. Esse é o primeiro trabalho a relatar o influência dos produto do gene *crc* na biossíntese de RLs. Estudos adicionais serão necessários para elucidar o papel desse regulador na redução da biossíntese de ramnose, bem como na redução da contribuição da biossíntese de ácidos graxos para biossíntese de ramnolipídeos em *P. aeruginosa*.
- O mutante p12-39 parece estar afetado no gene *rmlB* (dTDP-glucose 4,6-dehydratase), relacionado com a biossíntese de precursores da ramnose presente nos ramnolipídeos. Esse genótipo é compatível com a drástica redução na produção de ramnose observada nesse mutante.

- O presente trabalho alcançou seus objetivos uma vez que foi possível a formação de uma biblioteca de mutantes afetados na biossíntese principalmente de RLs, por transposon. A variedade de fenótipos e, provavelmente, genótipos poderá dar condições para que a biossíntese de RLs possa ser melhor estudada e compreendida.

REFERÊNCIAS¹

- ABDEL-MAWGOUD, A. M.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 86, p. 1323-1336, 2010.
- ALMEIDA, K. L. **Produção de ramnolipídeos por isolados de *Pseudomonas*: avaliação do efeito das fontes de carbono e nitrogênio na composição do ramnolipídio**. 2011. 102 f. Dissertação de Mestrado (Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiology**. V., 54, p. 450-472. 1990.
- AVILA-LEÓN, I. A.; SILVA-QUEIROZ, S. R.; SILVA, L. F.; GOMEZ, J. G. C. Modulação da composição de polihidroxialcanoatos produzidos por *Pseudomonas* a partir de óleos vegetais. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS (SINAFERM), v. 16., 2007, Curitiba. **Resumos**. Curitiba, PR: Universidade Federal do Paraná, 2007.
- AKTIENGESELLSCHAFT, H. Frankfurt am Main, Germany. *Pseudomonas aeruginosa* and its use in a process for the biotechnological preparation of L-rhamnose. GIANI, C.; WULLBRAND, D.; MEIWES, J. US, Int. Cl.6:C12N 1/20; C12P 19/02; C12P 19/44, US 5.658.793. Aug. 19, 1997.
- BANAT, I. M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M. G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T. J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 87, p. 427-444, 2010.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 36, p. 493-496, 1966.
- BRANDL, H.; GROSS, R. A.; LENZ, R. W.; FULLER, R. C. Plastics from bacteria and for bacteria: Poly(β -hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible and biodegradable polyesters. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.**, v. 41, p. 77-93, 1990.
- BYROM, D. Polymer synthesis by micro-organisms: technology and economics. **Trends Biotechnol.**, v. 5, p. 246-250, 1987.
- CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 50, p. 520-529, 1998.
- CHAYABUTRA, C.; WU, J.; JU, L. K. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* under denitrification: effects of limiting nutrients and carbon substrates. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 72, p. 25-33, 2001.

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CHOI, M.H.; XU, J.; GUTIERREZ, M.; YOO, T.; CHO, Y.H.; YOON, S.C. Metabolic relationship between polyhydroxyalkanoic acid and rhamnolipid synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Comparative ^{13}C NMR analysis of the products in the wild-type and mutants. **J. Biotech.**, v. 151, n.1, p. 30-32, 2011.

CLSI - Clinic and laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; twenty-first informational supplement. CSI document M100-S21. WAYNE, P. A.: clinical and laboratory standards institute, 2011.

COSTA, S. G. V. A. O.; LÉPINE, F.; MILOT, S.; DÉZIEL, E.; NITSCHKE, M.; CONTIEIRO, J. Cassava wastewater as a substrate for simultaneous production of rhamnolipids and polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 36, p. 1063-1072, 2009.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiol. Mol. Biol.**, v. 61, p. 47-64, 1997.

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**, v. 149, p. 2005-2013, 2003.

EDWARDS, J. R.; HAYASHI, J. A. Structure of a rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.111, p.415-421, 1965.

HARDALO, C.; EDBERG, S. C. *Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk from drinking water. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 23, p. 47-75, 1997.

HAUSER, G.; KARNOVSKY, M. L. Studies of the production of glycolipide by *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.**, v. 68, n. 6, p. 645-54, 1954.

HENKEL, M.; MÜLLER, M. M.; KÜGLER, J. H.; LOVAGLIO, R. B.; CONTIEIRO, J.; SYLDAK, C.; HAUSMANN, R. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: concepts for next-generation rhamnolipid production. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 1207-1219, 2012.

HOFFMANN, N.; REHM, B. H. A. Regulation of polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 237, p. 1-7, 2004.

HORI, K.; MARSUDI, S.; UNNO, H. Simultaneous production of polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. **Biotechnol. Bioengin.**, v. 78, p. 699-707, 2001.

JACOBS, M. A.; ALWOOD, A.; THAIPISUTTAKUL, I.; SPENCER, D.; HAUGEN, E.; ERNST, S.; WILL, O.; KAUL, R.; RAYMOND, C.; LEVY, R.; CHUN-RONG, L.; GUENTHNER, D.; BOVEE, D.; OLSON, M. V.; MANOIL, C. Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. **PNAS**, v. 100, n. 24, p. 14339-14344, 2003.

KYOTO ENCICLOPEDIA OF GENES AND GENOMES (KEGG). 1995. Disponível em <<http://www.genome.jp/kegg/>>. Acesso em: 26 Nov 2013.

KILL, K.; BINNEWIES, T. T.; WILLENBROCK, H.; HANSEN, S. K.; YANG, L.; JELSBÄK.; USSERY, D. W.; FRIIS, C. Comparative Genomics of *Pseudomonas*. In: REHM, B. H. A. (Ed.). *Pseudomonas*: model organism, pathogen, cell factory. New Zealand: Wiley-VCH, 2008. Cap. 1, p. 1-24.

LANG, S.; WULLBRANDT, D. Rhamnolipids - biosynthesis, microbial production and application potential. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 51, p. 22-32, 1999.

LI, C.; LU, C-D. Unconventional integration of the *bla* gene from plasmid pIT2 during IS*lacZ*/hah transposon mutagenesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Curr. Microbiol.**, v. 58, p. 472-477, 2009.

LINHARDT, R. J.; BAKHIT, R.; DANIELS, L.; MAYERL, F.; PICKENHAGEN, W. Microbially produced rhamnolipid as a source of rhamnolipids. **Biotechnol. Bioengin.**, v. 33, p. 365-368, 1989.

LOVAGLIO, R. B. **Produção de rhamnolipídeos por mutantes de *Pseudomonas aeruginosa*** LBI. 2011. 148 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2011.

MAIER, R. M.; SOBERÓN-CHÁVEZ, G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 54, p. 625-633, 2000.

MARSUDI, S.; UNNO, H.; HORI, K. Palm oil utilization for the simultaneous production of polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.78, p. 955-61, 2008.

MATSUDA, T. S. **Isolamento de bactérias produtoras de polihidroxialcanoatos de cadeia curta e média a partir de óleos vegetais**. 2009. 83 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MCDUGALD, D.; KLEBENSBERGER, J.; TOLKER-NIELSEN, T.; WEBB, J. S.; CONIBEAR, T.; RICE, S. A.; KIROV, S. M.; MATZ, C.; KJELLEBERG, S. *Pseudomonas aeruginosa*: a model for biofilm formation. In: REHM, B. H. A. (Ed.). *Pseudomonas*: model organism, pathogen, cell factory. New Zealand: Wiley-VCH, 2008. Cap. 9, p. 215-254.

MEDINA, G.; JUÁREZ, K.; SOBERÓN-CHAVEZ, G. The *Pseudomonas aeruginosa* *rhlA* operon is not expressed during the logarithmic phase of growth even in the presence of its activator RhlR and the autoinducer *N*-butyryl-homoserine lactone. **J. Bacteriol.**, v. 185, p. 377-380, 2003.

MEDINA, G.; JUÁREZ, K.; DIAZ, R.; SOBERÓN-CHAVEZ, G. Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* *rhlR*, encoding a quorum-sensing regulatory protein. **Microbiology**, v. 149, p. 3073-3081, 2003a.

MEDINA, G.; JUÁREZ, K.; VALDERRAMA, B.; SOBERÓN-CHAVEZ, G. Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* RhlR transcriptional regulation of the *rhlAB* promoter. **J. Bacteriol.**, v. 185, n. 20, p. 5976-5983, 2003b.

MORENO, R.; RUIZ-MANZANO, A.; YUSTE, L.; ROJO, F. The *Pseudomonas putida* Crc global regulator is an RNA binding protein that inhibits translation of the AlkS transcriptional regulator. **Molecular Microbiology**, v. 64, p. 665-675, 2007.

NAKATA, K.; YOSHIMOTO, A.; YAMADA, Y. Correlation between autoinducers and rhamnolipids production by *Pseudomonas aeruginosa* IFO 3924. **J. Ferment. Bioeng.**, v. 86, n.6, p. 608-610, 1998.

NATIONAL CENTER OF BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 18 Ago 2013.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O. Biosurfactants in Food Industry. **Trends in Food Science; Technology**, v. 18, p. 252-259, 2007.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O.; CONTIERO, J. Rhamnolipid Surfactants: An update on the general aspects of these remarkable biomolecules. **Biotechnol. Prog.**, v. 21, p. 1593-1600, 2005.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O.; CONTIERO, J. Structure and Applications of a rhamnolipid surfactant produced in soybean oil waste. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 160, p. 2066-2074, 2010.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O.; CONTIERO, J. Rhamnolipids and PHAs: recent reports on *Pseudomonas*-derived molecules of increasing industrial interest. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 621-630, 2011.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Quím. Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes a partir de resíduos agroindustriais. **Revista Biotecnologia e Desenvolvimento**, ed. 31, p. 63-67, Jul/Dez 2003.

OCHSNER, U. A.; FIECHSTER, A.; REISER, J. Isolation, characterization and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhlAB* genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 19787-95, 1994b.

OCHSNER, U.A.; KOCK, A.K.; FIECHTER, A.; REISER, J. Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 2044-2054, 1994a.

OCHSNER, U. A.; REISER, J. Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 92, p. 6424-6428, 1995.

PEIXOTO, R.M. **Bioprospecção de microrganismos do gênero *Pseudomonas* produtores de biossurfactantes**. 2008. 98f. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

PEARSON J. P.; PESCI, E. C.; IGLEWSKI, B. H. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* *las* and *rhl* quorum-sensing systems in control os elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. **J. Bacteriol.**, v. 179, n.18, p. 5756-5767, 1997.

PINZON, N. M. e JU, L. Analysis of rhamnolipid biosurfactants by methylene blue complexation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 82, p. 975-981, 2009a.

PINZON, N. M. e JU, L. Improved detection of rhamnolipid production using agar plates containing methylene blue and cetyl trimethylammonium bromide. **Biotechnol. Lett.**, v. 31, p. 1583-1588, 2009b.

QUEIROZ, S. R. S. **Estudo do metabolismo de ácido graxos em *Pseudomonas putida* visando à modulação da composição monomérica de elastômero biodegradável**. 2007. 98f. Dissertação (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

RAHIM, R.; BURROWS, L. L.; MONTEIRO, M. A.; PERRY, M. B.; LAM, J. S. Involvement of the *rml* locus in core oligosaccharide and O polysaccharide assembly in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiol.**, v. 1469, p. 2803-2814, 2000.

RAHIM, R.; OCHSNER, U.A; OLVERA, C.; GRANINGER, M.; MESSNER, P.; LAM, J.S.; SÓBERON-CHÁVEZ, G. Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhlC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. **Mol. Microbiol.**, v. 40, p. 708–718, 2001.

RAMSAY, B. A.; LOMALIZA, K.; CHAVARIE, C.; DUBE, B.; BATILLE P.; RAMSAY, J. A. Production of poly- β -hydroxybutyric- β -hydroxyvaleric acids. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, p. 2093–2098, 1990.

REHM, B. H. A. Biotechnological relevance of pseudomonads. In REHM, B.H.A. (editor). ***Pseudomonas*: Model organism, pathogen, cell factory**. New Zealand: Wiley-VCH, 2008. Cap. 14, p. 377-395.

REHM, B. H. A. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 578-591, 2010.

REHM, B. H.; KRÜGER, .; STEINBÜCHEL, A. A new metabolic link between fatty acid *de novo* synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 24044-24051, 1998.

REHM, B. H. A.; MITSKY, T. A.; STEINBÜCHEL, A. Role of fatty acid de novo biosynthesis in polyhydroxyalkanoic acid (PHA) and rhamnolipid synthesis by *Pseudomonads*: pathway for PHA biosynthesis in *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, n. 7, 2001.

REHM, B. H. A.; STEINBÜCHEL, A. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 25, p. 3-19, 1999.

RENDEL, N. B.; TAYLOR, G. W.; SOMERVILLE, M.; TODD, H.; WILSON, R.; COLE, P. J. Characterisation of *Pseudomonas* rhamnolipids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1045, p. 189-193, 1990.

RIIS, V.; MAI, W. Gas chromatography determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass-ester hydrochloric acid propanolysis. **J. Chromatogr.**, v. 445, p. 285-289, 1988.

RODRIGUES, L.; BANAT, I. M.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R. Biosurfactants: potential application in medicine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, p. 609-618, 2006.

ROSA, R. L.; DE LA PEÑA, F.; PRIETO, M. A.; ROJO, F. The Crc protein inhibits the production of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* under balanced carbon/nitrogen growth conditions. **Environ. Microbiol.**, *in press*, 2013.

SANTOS, A. S.; SAMPAIO, A. P. W.; VASQUEZ, G. S.; SANTA ANNA, L. M.; JR, N. P.; FREIRE, D. M. G. Evaluation of Different Carbon and Nitrogen Sources in Production of Rhamnolipids by a Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 98, p. 1025-1034, 2002.

SIEGMUNG, I.; WAGNER, F. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. **Biotechnol. Tech.**, v. 5, n. 4, p. 265-268, 1991.

SILVA, L. F.; GOMEZ, J. C.; ROCHA, R. C. S.; TACIRO, M. K.; PRADELLA, J. G. C. Produção biotecnológica de poli-hidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. **Quim. Nova**, v. 30, n. 7, p. 1732-1743, 2007.

SILVA-QUEIROZ, S. R.; SILVA, L. F.; PRADELLA, J. G. C.; PEREIRA, E. M.; GOMEZ, J. G. C. PHA_{MCL} biosynthesis systems in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* strains show differences on monomer specificities. **J. Biotechnol.**, v. 143, p. 111-118, 2009

SOBERÓN-CHAVEZ, G.; AGUIRRE-RAMÍREZ, M. A.; ORDÓÑEZ, L. Is *Pseudomonas aeruginosa* only "sensing quorum"? **Critical Reviews in Microbiology**, v. 31, p. 171-182, 2005.

SOBERÓN-CHAVEZ, G.; AGUIRRE-RAMÍREZ, M. A.; SÁNCHEZ, R. The *Pseudomonas aeruginosa* RhlA enzyme is involved in rhamnolipid and polyhydroxyalkanoate production. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 32, p. 675-677, 2005.

SOBERÓN-CHAVEZ, G.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl. Microbiol. Biotech.**, v. 68, p. 718-725, 2005.

STEINBÜCHEL, A.; VALENTIN, H. E. Diversity for bacterial polyhydroxyalkanoic acids. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 28, p. 128-219, 1995.

STRELEC, T. **Isolamento de bactérias produtoras de biossurfactantes ramnolipídeos e polihidroxialcanoatos e avaliação da relação metabólica no processo de síntese.** 2006. 81 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Pesquisas Tecnológicas, Instituto Butantan, São Paulo, 2006.

TAHZIBI, A.; KAMAL, F.; ASSADI, M. M. Improved production of rhamnolipids by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant. **Iran. Biomed. J.**, v. 8, n. 1, p. 25-31, 2004.

WINSOR, G. L.; LAM, D. K.; FLEMING, L.; LO, R.; WHITESIDE, M. D.; YU N., Y.; HANCOCK, R. E.; BRINKMAN, F. S. *Pseudomonas* Genome database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes. **Nucleic Acids Res.**, v. 39, p. D596-600, 2011.

YUSTE, L.; ROJO, F. Role of the *crc* Gene in Catabolic Repression of the *Pseudomonas putida* GPo1 Alkane Degradation Pathway. **J. Bacteriol.**, v. 183, n. 21, p. 6197-6206, 2001.

ZHANG, Y.; MILLER, R. M. Effect of *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. **Appl. Environ. Microbiol.** No. 60, 2101:2106, 1994.

ZHU, K.; ROCK, C. O. RhIA converts β -hydroxyacyl-acyl carrier protein intermediates in fatty acid synthesis to the β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate component of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.**, v. 190, p. 3147–3154, 2008.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Caracterização de RLs e PHAs produzidos por linhagens mutantes de LFM634.

Tabela A.1 - Produção e caracterização de ramnolipídeos e polihidroxicanoatos por mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* LFM 634, utilizando glicose como fonte de carbono (20 g/L).

(Continua)

Mutante	Polihidroxicanoatos							Ramnolipídios								
	Composição PHA (mol%)					PHA (%MSC)	PHA (mg/l)	Composição (mol%)						Concentração (mg/l)		
	3HHx	3HO	3HD	3HDΔ5	3HDd			3HHx	3HO	3HD	3HDΔ5	3HDΔ6	3HDd	3HA	Ramnose	RL
P.01-37			31,65		68,35	1,66	0,19	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	ND
p.01-55	1,7	17,69	53,34	5,7	21,57	17,65	2,52		7,25	83,07	3,78		5,9	1780	572	2352
P.03-40			32,88		67,12	1,55	0,17	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	120	ND
P.04-41	ND	ND	ND	ND	ND	18,50	2,10			100				20	2191	2211
P.04-56	ND	ND	ND	ND	ND	803,00	19,60	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	24	24
P.05-30	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			93,44			6,56	3260	19	3279
P.05-33	ND	ND	ND	ND	ND	8,00	1,00	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	0
p.05-37		26,12	57,87		16,01	9,12	1,35		6,92	87,37			5,71	1570	335	1905
P.07-28			36,21		63,79	11,36	1,15		6,84	81,97	4,83		6,37	920	0	920
p.07-33		35,87	51,17		12,96	12,22	1,33		7,01	86,27			6,72	1600	323	1923
p.07-37	2,31	17,67	57,27	7,21	15,54	16,26	2,42	0,39	6,04	79,61	5,95	8,01		1640	727	2367
P.07-39	2,31	17,67	57,27	7,21	15,54	16,27	2,43		5,33	82,03			12,65	290	ND	ND
p.07-55		30,37	55,82		13,81	10,59	1,38		7,5	87,03			5,47	1570	520	2090
p.07-56		28,42	58,5		13,08	11,42	1,48		7,37	87,37			5,26	1400	310	1710
p.08-30		32,69	57,28		10,03	22,97	2,56		7,04	87,29			5,67	1630	344	1974
p.09-13			28,08		71,92	2,54	0,19		6,46	56,41	14,78		22,35	140	0	140
P.11-31	3,36	27,82	58,92		9,91	10,69	1,13	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	ND
P.11-51			33,67		66,37	1,49	0,16	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1	ND
p.12-33	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,35	6,34	83,07	4,01		6,23	1500	590	2090
p.12-39		13,2	69,53	5,92	11,35	11,24	1,2		12,69	81,26			6,05	1400	0	1400
P.13-25			33,17		66,83	1,43	0,17		3,97	81,18	4,9		9,95	1580	0	1580
p.14-27	2,1	18,77	58,37	6,47	14,29	14,68	1,92	0,35	5,88	84	3,86		5,91	1520	676	2196
P.14-35			100			0,35	0,03		6,73	87,38			5,89	1810	12	1822
p.15-15		31,28	53,48		15,24	10,11	1,16		6,73	87,38			5,89	1810	364	2174
p.15-27		30,69	55,51		13,8	11,75	1,75		7,44	87,05			5,51	1730	362	2092
p.15-54		14,73	45,79		39,48	8,8	1,2		7,5	86,29			6,21	1150	192	1342
p.16-05		30,82	53,65		15,53	9,41	1,14		6,88	87,49			5,63	1650	323	1973
P.16-08	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		7,28	83,21	3,87		5,64	1960	745	2705
p.16-14		23,02	76,98			6,94	0,95		6,82	87,2			5,98	1890	1160	3050
p.16-15		38,18	48,3		13,52	10,62	1,21		6,91	87,42			5,67	1840	358	2198
p.16-23		37,53	48,32		14,15	10,41	1,33		7	87,28			5,72	1390	290	1680
p.17-02		36,97	49,11		13,92	10,69	1,21		6,65	87,44			5,91	1800	346	2146
p.17-03		25,85	54,32		19,83	8,2	1,23		5,33	87,92			6,75	1210	228	1438
p.17-05		28,23	55,06		16,71	8,71	1,16		7,04	87,1			5,86	1390	410	1800
p.17-11	2,61	19,54	60,97	5,29	11,59	9,35	1,23		6,78	80,16	6,07		6,99	1740	677	2417
p.17-39		23,57	76,43			7,23	1,09	3,75	5,32	76,41	9,55	4,97		2000	530	2530
p.17-40		24,26	75,74			6,95	0,71		6,98	87,2			5,82	1190	276	1466
P.17-49			31,24		67,12	2,45	0,25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	29	ND
P.17-56	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		12,28	56,2	12,56		18,96	210	2141	2351
p.17-58		33,36	56,46		10,18	28,48	3,1		6,76	87,49			5,75	1600	390	1990
p.18-27		37,72	49,44		12,84	11,01	1,67		6,9	87,37			5,73	1510	294	1804

Tabela A.1 - Produção e caracterização de ramnolipídeos e polihidroxicanoatos por mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* LFM 634, utilizando glicose como fonte de carbono (20 g/L).

(Continuação)

Mutante	Polihidroxicanoatos							Ramnolipídios							Concentração (mg/l)		
	Composição PHA (mol%)					PHA (%MSC)	PHA (mg/l)	Composição (mol%)					3HDd6	3HDd	3HA	Ramnose	RL
	3HHx	3HO	3HD	3HDd5	3HDd			3HHx	3HO	3HD	3HDd5	3HDd6					
p.18-28		20,94	67,28		11,78	8,56	1,14		6,74	87,37			5,89		1320	187	1507
P.18-29	ND	ND	ND	ND	ND	18,50	2,90	ND	ND	ND	ND	ND	ND		ND	22	ND
p.18-30		25,82	58,97		15,21	9,51	1,11		6,81	87,54			5,65		1570	344	1914
p.18-32		21,49	67,07		11,44	8,73	1,20		6,63	87,52			5,85		1370	458	1828
p.18-34		33,82	52,22		13,96	10,73	1,26		6,76	87,47			5,77		1390	316	1706
P.19-03	ND	ND	ND	ND	ND	11,90	1,40	ND	ND	ND	ND	ND	ND		ND	4	ND
P.19-15	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			100					10	5	15
P.19-57	ND	ND	ND	ND	ND	21,80	2,70	ND	ND	ND	ND	ND	ND		ND	13	ND
P.20-19			32,82		67,18	1,73	0,16	ND	ND	ND	ND	ND	ND		ND	2	ND
p.20-26		30,97	50,97		18,06	9,61	1,07		6,77	87,5			5,73		1670	620	2290
P.20-28			68,39		31,61	3,6	0,59	ND	ND	ND	ND	ND	ND		ND	0	ND
p.21-34		31,3	55,68		13,02	9,98	1,2		7,04	87,42			5,54		1570	373	1943
p.21-37	2,78	19,28	62	5,79	10,15	11,28	1,47		5,76	79,02	8,03		7,19		1780	737	2517
p.23-15	2,57	18,91	59,83	5,27	13,42	7,52	1,15	0,39	6,34	82,6	4,33		6,34		1530	375	1905
p.24-24		29,27	35,38		35,35	3,66	0,55		5,24	87,36			7,4		650	128	778
P.26-11			56,11		63,89	2,03	0,22		6,32	85,11	5,25	3,32	3,32		690	16	706
p.26-25		19,91	54,03		26,06	3,36	0,44		28,77	61,25	4,5		5,48		1210	0	1210
P.26-26	2,78	19,01	57,29	5,22	15,7	7,8	1,02	2,83	19	58,3	4,97		14,9		750	5	755
p.28-21	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	2,76	7,56	72,74	4,39		12,55		100	0	60
P.28-37	ND	ND	ND	ND	ND					100					20	9	29
P.28-55			32,1		67,9	1,69	0,17		12,29	35,65	11,37		40,69		130	0	130
P.28-59					100	0,47	0,01	54,85	45,15						60	0	60
P.32-10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	20,39	43,76	20,42			15,43		40	0	40
P.32-20			32,15		67,85	1,73	0,21	0,64	4,71	79,36	5,65		9,64		650	274	924
P.34-14		25,4	46,34		27,75	4,97	0,49	ND	ND	ND	ND		ND		ND	425	ND
p.36-21			49,04		50,96	3,73	0,49		0,82	81,32	5,23	12,63			110	55	165
p.36-55			28,56		71,44	2,09	0,23	ND	ND	ND	ND	ND	ND		0	15	15
p.37-34	2,62	20,16	63,2	6,04	7,98	15,7	2,08	0,35	5,47	72,39	15,54		6,25		1800	643	2443
p.38-32		15,45	40,82		43,73	3,28	0,38		5,01	85,55			9,44		420	165	585
p.42-12		13,51	43,15		43,34	3,33	0,49		5,49	86,61			7,9		450	209	659
p.42-52		19,63	46,83		33,54	3,65	0,65			100					10	91	101
p.42-55			49,24		50,76	2,7	0,4			35,83			64,17		80	170	250
p.42-56			71,14		28,86	7,11	0,38						100		20	10	30
p.43-36	ND	ND	ND	ND	ND	0	0		29,13	34,31	36,56				50	109	119
p.44-06		6,37	52,54		41,09	4,41	0,51		6,19	80,02			13,79		400	144	544
p.45-46	2,52	21,27	60,42	5,99	9,8	12	1,88	0,38	5,82	82,83	4,23		6,74		1710	315	2025
p.46-20		23,2	35,81		40,99	2,99	0,46		5,15	86,88			7,97		430	181	611
P.46-26	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		6,72	81,1	5,48		6,7		2450	26	
p.48-15			54,36		45,64	3,06	0,5								1300	203	1503
p.48-25			42,33		57,67	2,72	0,33		5,38	86,36			8,26		320	265	585
p.48-27		20,5	64,74		14,76	6,96	1,14	0,4	6,27	83,21	4,05		6,07		1610	534	2144
P.49-09		25,9	46,34		27,75	4,97	0,44	ND	ND	ND	ND	ND	ND		ND	245	ND

Tabela A.1 - Produção e caracterização de ramnolipídeos e polihidroxicanoatos por mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* LFM 634, utilizando glicose como fonte de carbono (20 g/L).

(Conclusão)

Mutante	Polidroxialcanoatos							Ramnolipídios									
	Composição PHA (mol%)					PHA (%MSC)	PHA (mg/l)	Composição (mol%)					Concentração (mg/l)				
	3HHx	3HO	3HD	3HDdΔ5	3HDd			3HHx	3HO	3HD	3HDdΔ5	3HDdΔ6	3HDd	3HA	Ramnose	RL	
p.49-57		9,18	66,11	6,49	18,22	7,02	0,81			50,02	49,98				30	0	30
p.51-14	2,6	20,7	61,78	5,52	9,4	13,57	1,48			19,07	72,41	3,44		5,08	1910	347	2257
p.51-27	2,53	21,17	60,98	5,98	9,34	12,26	1,86	0,34	5,95	82,35	4,33		7,03	1520	409	1929	
p.52-19		21,97	37,65		40,38	3,25	0,41	0,54	5,16	81,4	4,65	8,25		940	174	1114	
p.53-30	2,04	16,5	53,12	12,36	15,98	17,68	2,77			100				20	0	20	
p.54-04		24,95	66,12		8,93	16,17	2,37		7,65	85,82			6,53	1090	210	1300	
p.55-31		21,35	66,94		11,71	8,91	1,23		6,76	87,12			6,12	1140	49	1189	
p.58-01		16,49	63,55		19,96	4,5	0,59	0,39	6,26	82,5	4,46		6,39	1400	623	2023	
p.58-03	3,13	21,68	60,7	5,68	8,81	13,03	1,77		6,52	83,48	4,31		5,69	1730	680	2410	
P.58-07	ND	ND	ND	ND	ND	14,3	2,01	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	678	ND	ND
P.61-48	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		41,04	58,96				30	0	30	
p.62-22		22,77	69,47		7,76	17,02	2,33		7,19	87,24			5,57	1490	366	1856	
p.62-44	2,84	22,36	58,25	8,07	8,48	16,14	1,92	0,4	6,38	83,05	4,18		5,99	1680	698	2378	
p.63-25		21,31	66,8		11,89	10,05	1,06		7,82	85,76			6,42	980	246	1226	
p.63-52	2,65	20,94	55,91	8,07	14,43	19,43	3,36	0,44	6,7	81,9	4,35		6,61	1480	731	2211	
p.65-43			49,88	10,7	39,42	1,85	0,15			47,32	30,5		22,18	60	137	197	
p.66-22	2,52	21,44	62,28	6,26	7,5	20,34	2,23	1,04	7,4	82,36	3,54		5,66	2290	570	2860	
P.67-47	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		5,23	78,16	7,42		9,19	450	0	450	
p.69-59	2,38	19,02	56,32	6,55	15,73	19,81	2,33	0,32	6,15	83,24	3,89		6,4	1650	486	2136	
p.70-51		22,27	67,97		9,76	14,81	1,65		6,84	87,31			5,85	1150	350	1500	
p.72-40		19,98	64,13		15,89	7,41	0,83		6,57	86,45			6,98	1420	143	1563	
p.72-57		19,81	63,45		16,74	6,33	0,84		6,67	87,21			6,12	1130	266	1396	
p.74-43		19,29	70,6		10,11	19,37	2,49		7,29	85,76			6,95	1100	236	1336	
p.92-09			56,67		43,33	2,61	0,34		7,02	86,43			6,55	1010	110	1120	
p.97-09			61,66		38,34	5,17	0,59	0,89	3,32	70,34	11,36	14,09		410	605	1015	
p.97-47			58,55		41,45	4,87	0,56	0,76	7,2	78,4	7,09		6,55	1280	559	1839	
p.100-01			44,17	30,81	25,01	8,81	0,89			82,83	6,37		10,8	400	ND	ND	
p.100-14	17,65		47,12		35,23	4,58	0,53			81,7	6,24		12,06	440	ND	ND	
p.100-28			33,72		66,28	2,71	0,29	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	6	6	
p.101-31			60,67		39,33	4,76	0,53			83,57	6,14		10,29	390	135	525	
p.101-35			64,49		35,51	4,81	0,56		3,08	82,77	5,79	8,36		520	194	714	
p.101-50			34,98		65,02	1,98	0,38		8,11	91,89				60	182	242	
p.102-50			36,35		63,65	1,93	0,34						100	20	124	144	
p.103-10	0,43	1,94	6,57		91,06	45,29	4,75	0,57	6,65	79,36	4,49		8,93	1520	611	2131	
p.103-21			52,65		47,35	5,74	0,7			84,4	5,64		9,96	460	202	202460	
p.103-35			46,39		53,61	2,97	0,45			76,6			23,4	110	44	154	
p.103-44			36,5		63,5	2,72	0,31			61,93			38,07	90	17	107	
p.103-54	2,69	20,2	59,55	5,76	11,8	9,94	1,39	1,08	8,34	81,91	2,97		5,7	3640	752	4392	
p.107-17		20,6	62,55	5,92	10,93	10,79	1,57	2,1	11,43	76,7	4,3		5,47	1630	751	2381	
LFM634			65,39		34,61	4,38	0,56		6,93	67,1	19,27		6,7	1390	227	1617	

Cultivos realizados à 30°C, com agitação de 150 rpm, por 96 horas

3HHx – 3-hidroxi-hexanoato; 3HO – 3-hidroxi-octanoato; 3HD – 3-hidroxi-decanoato; 3HDd5 – 3-hidroxi-5-dodecanoato; 3HDd – 3-hidroxi-dodecanoato; Ram – ramnose; 3HA – 3-hidroxiácidos; ND – não determinado.

Tabela A.2 - Produção e caracterização de ramnolipídeos e polihidroxialcanoatos por mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* LFM 634, utilizando óleo de soja como fonte de carbono (20 g/L).

(Continua)

Mutante	Polihidroxialcanoatos							Ramnolipídios								
	Composição PHA (mol%)					PHA (%MSC)	PHA (mg/l)	Composição (mol%)						Concentração (mg/l)		
	3HHx	3HO	3HD	3HDdΔ5	3HDd			3HHx	3HO	3HD	3HDdΔ5	3HDdΔ6	3HDd	3HA	Ramnose	RL
p.01-37			66,32		33,68	11,45	0,67		5,19	89,5		5,31		830	86	916
P.01-55	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,45	11,64	71,63	0,17		5,6	2710	355	3065
p.03-40	4,71	39,4	43,92		19,13	17,79	2,19	1,52	5,82	79,12	2,1	5,62	5,82	4990	9	4999
p.04-41	ND	ND	ND	ND	ND	21,70	3,30	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	346	346
p.04-56	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,88	10,52	75,6	3,8	8,2		2790	260	3050
p.05-30	ND	ND	ND	ND	ND	19,10	2,60	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	173	173
P.05-33	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		10,66	89,16			5,18	3300	445	3745
p.05-37		42,01	42,14		15,85	8,82	1,16		8,73	86,6			4,67	3160	196	3356
P.07-28	2,57	14,24	70,22		6,16	19,42	2,87		6,84	81,97	4,83		6,37	920	15	935
p.07-33		52,19	35,68		12,13	10,25	1,13		8,92	86,18			4,9	2390	204	2594
p.07-37	3,48	28,91	52,89	3,71	11,01	17,83	2,64	1,14	10,83	76,43	3,9		7,69	23,6	57	80,6
P.07-39	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2,2	7,381	84,54	4,34		1,11	4410	0	4410
p.07-55		50,36	37,85		11,79	5,87	0,74		4,35	90,66			4,99	2020	196	2216
p.07-56		100				11,52	1,44		10,79	83,83			5,38	3090	137	3227
p.08-30		48,51	38,68		12,81	11,31	1,35		9,53	89,64			0,83	2380	326	2706
p.09-13		46,92	43,55		9,53	6,39	1,02	4,43	25,68	52,67			17,22	360	0	360
P.11-31	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		7,87	86,79			5,34	600	111	711
p.11-51	3,56	34,95	48,94		12,55	4,36	0,57		41,15	42,25		16,6		70	17	87
p.12-33	4,43	33,77	49,17	2,73	9,9	22,94	3,55	1,03	7,44	58,53	26,95		6,05	4540	449	4989
p.12-39	4,3	40,7	45,67		9,33	13,11	1,36		50,71	49,29				50	0	50
p.13-25		23,4	58,9		17,7	1,35	0,1		100					20	7	27
p.14-27	4,08	34,08	46,89	3,59	11,35	23,73	4,91	1,13	6,89	81,94	3,93		6,86	3140	ND	ND
p.14-35	4,26	36,62	46,63		12,49	10,22	1,27		17,86	52,82		29,32		80	0	80
p.15-15		45,08	42,96		11,96	24,53	2,82		8,32	84,91			6,77	2800	221	3021
p.15-27		54,81	45,19			2,23	0,32		3,84	74,64			21,52	1620	167	1787
p.15-54	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		27,58	72,42				450	66	516
p.16-05		19,07	61,23		19,7	2,55	0,31		3,8	88,38			7,82	1750	171	1921
p.16-08	4,55	34,43	46,11	3,62	11,29	20,21	3,17	1,24	9,84	80,5	3,14		5,28	3840	590	4430
p.16-14	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,84	4,26	81,93	5,24		4,74	2890	176	3066
p.16-15		47,02	39,49		13,49	15,05	1,79		11,53	80,98			7,49	2690	171	2861
p.16-23		43,76	39,67		16,57	8,18	0,84		9,28	83,66			7,06	2760	225	2985
p.17-02		44,61	42,13		13,26	38,5	2,39		6,16	85,13			8,71	2710	242	2952
p.17-03		29,62	59,57		10,81	7,24	1,09		22,1	77,9				120	225	345
p.17-05		56,76	31,48		11,76	14,06	1,88		5,45	87,73			6,82	2240	203	2443
p.17-11	4,96	37,05	45,21	2,61	10,17	20,46	3,04	1,12	14,14	74,67	3,5		6,58	3840	119	3959
p.17-39	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4,88	33,98	52,56		8,58		590	590	1180
p.17-40	4,51	32,47	42,76	3,73	16,53	21,58	2,48	1,08	7,56	83,32	2,51	5,33		3220	166	3386
p.17-49	7,45	44,87	34,88		12,8	12,89	1,37	1,02	30,58	52,7		15,7		100	46	146
P.17-56	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,3	8,48	80,35	4,34		5,52	4780	ND	ND
p.17-58		47,38	35,56		17,06	12,13	1,64		8,6	83,28			8,12	2940	155	3095
p.18-27		42,99	40,77		16,24	11,99	1,56		7,18	86,65			6,17	3500	218	3718

Tabela A.2 - Produção e caracterização de ramnolipídeos e polihidroxicanoatos por mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* LFM 634, utilizando óleo de soja como fonte de carbono (20 g/L).

(Continuação)

Mutante	Políhidroxialcanoatos							Ramnolipídios									
	Composição PHA (mol%)					PHA (%MSC)	PHA (mg/l)	Composição (mol%)					Concentração (mg/l)				
	3HHx	3HO	3HD	3HDdΔ5	3HDd			3HHx	3HO	3HD	3HDdΔ5	3HDdΔ6	3HDd	3HA	Ramnose	RL	
p.18-28	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			11,2	83,02			5,78	1360	ND	ND
P.18-29	ND	ND	ND	ND	ND	22,60	2,80	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	ND
p.18-30		48,42	38,41		13,17	61,2	7,39			6,72	88,01			5,27	2810	156	2966
p.18-32	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			11,36	80,47			8,17	2110	165	2275
p.18-34		44,56	35,61		19,83	11,99	1,54			9,42	84,2			6,38	2900	198	3098
P.19-03	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			12,66	81,56			5,78	2300	221	2521
P.19-15	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	5,73		38,53	51,11			4,63	780	54	834
P.19-57	ND	ND	ND	ND	ND	9,70	1,60	ND		ND	ND	ND	ND	ND	ND	242	ND
p.20-19	3,72	27,73	58,83		9,72	13,25	1,37	2,3		41,01	45,05			11,64	60	37	97
p.20-26		49,51	37,97		12,52	12,38	1,36			5,77	89,12			5,11	2830	208	3038
P.20-28	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			44,64	32,85			22,51	210	114	324
p.21-34	4,17	32,52	47,06	3,03	13,22	19,17	3,29			11,98	81,62			6,4	2800	216	3016
p.21-37	4,33	32,32	45,62	3,51	14,22	21,12	2,95	0,95		11,88	79,05	3,06		5,06	3710	673	4383
p.23-15	4,43	37,3	45,4	2,36	10,51	30,63	4,74	1,53		9,08	79,59	3,7		6,1	3530	457	3987
p.24-24		46,47	40,2		13,33	7,24	0,81	1,35		7,23	84,86			6,56	1210	216	1426
p.26-11	2,32	24,12	59,14		14,42	10,38	1,45			14,88	85,12				70	99	169
p.26-25		36,57	53,05		10,38	6,87	1,21			9,28	79,42	3,89		7,41	620	86	706
p.26-26	5,02	37,25	45,66	2,74	9,33	21,58	2,93	1,14		7,89	79,87	3,55		7,55	3930	108	4038
p.28-21	3,29	28,23	56,88		11,6	11,82	0,91			29,46	56,45			14,09	60	53	113
P.28-37	ND	ND	ND	ND	ND	36,60	4,70	1,83		10,81	77,61	3,46	6,29		2100	219	2319
P.28-55	3,53	29,23	57,88		9,37	12,31	4,6	4,67		19,81	62,05	7,23		6,25	770	39	809
p.28-59	2,08	16,83	67,67		13,42	4,55	0,61			18,07	81,93				60	18	78
p.32-10	4,63	35,6	47,26		12,51	11,15	1,42	1,02		18,5	45,1			35,38	150	26	176
p.32-20	3,07		74,1		22,83	5,38	1,01			40,69	59,31				60	7	67
P.34-14	ND	ND	ND	ND	ND	6,90	1,00	ND		ND	ND	ND	ND	ND	ND	40	ND
p.36-21		49,2	49,76		10,05	10,57	20,1	ND		ND	ND	ND	ND	ND	ND	11	ND
p.36-55		42,82	41,84		15,34	8,97	1,09			22,42	69,75			7,83	360	14	374
p.37-34	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,04		14,93	76,17	2,95		4,9	2890	597	3487
p.38-32		32,22	43,44		13,34	19,71	2,54	ND		ND	ND	ND	ND	ND	ND	310	ND
P.42-12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		ND	ND	ND	ND	ND	ND	1063	ND
p.42-52		44,47	43,76		11,77	18,96	2,55			100					20	19	39
p.42-55		42,74	42,96		14,3	22,89	3,44	1,88		11,88	76,16	3,54	6,54		1480	256	1736
p.42-56	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			78,45	15,7			5,85	270	824	1094
P.43-36	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	7,73		13,8	67,23	2,82		8,43	890	13	903
p.44-06		41,11	44,67		14,22	8,88	1,11	2,33		11,2	82,6			3,87	1920	335	2255
p.45-46	3,33	26,93	43,63	3,31	22,8	23,2	2,55			8,38	81,5	3,73		6,39	3390	524	3914
p.46-20		10,31	69,95		19,74	4,58	0,44			5,64	89,09			5,27	830	345	1175
P.46-26	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,53		10,87	78,23	3,44		5,93	4520	332	4852
p.48-15		41,88	43,89		14,23	11,35	1,33	2,56		8,74	78,98	4,26	5,46		2250	353	2603
p.48-25		43,34	44,01		12,65	13,08	1,37			11,97	81,72			6,31	1250	275	1525
p.48-27	4,95	37,59	45,26	2,52	9,68	23,3	3,33	1		7,98	84,51	3,16		3,35	4270	803	5073
P.49-09		39,54	46,07		14,39	5,44	0,8	ND		ND	ND	ND	ND	ND	ND	419	ND

Tabela A.2 - Produção e caracterização de ramnolipídeos e polihidroxiálcanoatos por mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* LFM 634, utilizando óleo de soja como fonte de carbono (20 g/L).

(Conclusão)

Mutante	Polihidroxiálcanoatos								Ramnolipídios								
	Composição PHA (mol%)						PHA (%MSC)	PHA (mg/l)	Composição (mol%)						Concentração (mg/l)		
	3HHx	3HO	3HD	3HDdΔ5	3HDd				3HHx	3HO	3HD	3HDdΔ5	3HDdΔ6	3HDd	3HA	Ramnose	RL
P.49-57	ND	ND	ND	ND	ND		ND	ND	14,59	21,45	55,47	3,12		5,37	440	ND	ND
P.51-14	3,99	30,66	53,7	2,77	8,88		22,43	2,62	1,61	7,56	80,46	5,26		5,11	4170	526	4696
p.51-27	4,45	36,44	48,22	2,33	8,56		14,63	2,03	1,23	8,45	75,71	3,97		10,64	3640	478	4118
p.52-19		43,53	43,59		12,88		16,28	1,96		13,36	81,79			4,85	2110	245	2355
P.53-30	ND	ND	ND	ND	ND		ND	ND	6,1	49	36,8	2,99		5,11	910	52	962
p.54-04	ND	ND	ND	ND	ND		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	188	ND
p.55-31	ND	ND	ND	ND	ND		ND	ND		11,35	80,13			8,52	1900	177	2077
p.58-01	4,43	37,05	46,69	2,54	9,29		15,86	2,14	0,94	5,75	52,51	35,6		5,2	4690	311	5001
p.58-03	3,48	33,16	49,75	3,62	9,99		28,66	2,83	1,12	9,59	80,72	3,1		5,47	2990	715	3705
p.58-07	4,26	33	49,39	2,83	10,52		19,51	2,69	1,05	8,68	80,43	3,46		6,38	3630	782	4412
P.61-48	ND	ND	ND	ND	ND		ND	ND	33,55	19,42	29,65	8,36		9,02	230	ND	ND
p.62-22	ND	ND	ND	ND	ND		ND	ND		13,54	81,01			5,45	840	158	998
p.62-44	ND	ND	ND	ND	ND		ND	ND	1,07	13,66	76,84	3,08		5,34	3560	808	4368
P.63-25	ND	ND	ND	ND	ND		21,00	3,80	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
p.63-52	5,1	33,01	47,07		14,82		10,33	1,87	1,41	10,9	77,08	4,34		6,27	2610	172	2782
p.65-43		8,77	44,17		47,06		1,38	0,19	1,31	18,23	62,09			18,37	100	9	109
P.66-22	ND	ND	ND	ND	ND		ND	ND	2,09	10,36	74,45	2,89	4,49	5,72	4570	1730	6300
P.67-47	ND	ND	ND	ND	ND		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	52	ND
p.69-59	4,17	36,29	46,59	2,58	9,83		18,67	2,02	1,41	9,86	80,97	2,87		4,89	2810	ND	ND
p.70-51	ND	ND	ND	ND	ND		ND	ND		12,22	87,29			0,49	2120	222	2342
p.72-40	ND	ND	ND	ND	ND		ND	ND		11,86	83,46			4,68	1630	162	1792
p.72-57	ND	ND	ND	ND	ND		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	146	ND
P.74-43	ND	ND	ND	ND	ND		18,50	2,60	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	143	ND
p.92-09	ND	ND	ND	ND	ND		ND	ND		11,29	82,95			5,76	2040	86	2126
p.97-09	5,24	41,15	43,17		10,44		16,14	1,7	1,78		87,73	4,5		5,99	1390	460	1850
p.97-47	3,2	31,99	52,12		12,69		15,15	1,9		6,27	84,28	4		5,45	1270	325	1595
p.100-01	6,13	34,57	45	3,15	11,15		23,65	3,62	1,76		88,98	4,4		4,86	2640	865	3505
p.100-14	5,06	44,31	39,66		10,97		18,52	2,76	3,65	1,9	84,89	4,31		5,25	1590	300	1890
p.100-28	5,6	45,64	36,33		12,43		5,95	0,72			78,04	11,39		10,57	480	15	495
p.101-31	4,77	43,17	38,5	2,08	11,48		22,62	4,3	1,75	2,1	86,14	4,26		5,75	1610	552	2162
p.101-35	4,53	39,93	42,72		12,82		16,77	2,05			90,77	3,71		5,52	103520	0	103520
p.101-50	3,05	30,92	53		13,03		14,76	1,66	0,98		90,35	3,73		4,94	2520	746	3266
p.102-50		14,1	74,22	4,22	7,46		10,37	2,28	1,63	8,74	82,66	2,96		4,01	1170	218	1388
p.103-10	ND	ND	ND	ND	ND		ND	ND	5,19	36,15	48,96		9,7		680	416	1096
p.103-21	4,8	40,8	39,57	2,57	12,26		20,66	3,51	1,52	8,55	81,32	3,78		4,83	2200	586	2786
p.103-35		43,89	46,62		9,49		9,61	1,29	3,63	27,72	60,64	3,15		4,86	850	81	931
p.103-44		33,24	58,17		8,59		7,83	1,15	6,99	2,59	79,8	4,81		5,81	640	76	716
p.103-54	ND	ND	ND	ND	ND		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	688	ND
p.LFM634	ND	ND	ND	ND	ND		ND	ND	2,48	29,05	58,14		10,33		260	290	550
LFM634		46,31	39,74		13,95		12,61	2,76	1,04	5,62	74,41	12,9		6,03	2090	172	2262

Cultivos realizados à 30 °C, com agitação de 150 rpm, por 96 horas

3HHx – 3-hidroxi-hexanoato; 3HO – 3-hidroxi-octanoato; 3HD – 3-hidroxi-decanoato; 3HDdΔ5 - 3-hidroxi-5-dodecenoato; 3HDd – 3-hidroxi-dodecanoato; Ram – ramnose; 3HA - 3-hidroxi-ácidos; ND – não determinado.