

KAREN LOPES ALMEIDA

**Produção de ramnolipídios por isolados de
Pseudomonas: avaliação do efeito das fontes de
carbono e nitrogênio na composição do
ramnolípido.**

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. Versão original se encontra arquivada no Serviço de Comunicações do ICB

**São Paulo
2011**

RESUMO

ALMEIDA, K. L. **Produção de ramnolipídios por isolados de *Pseudomonas*: avaliação do efeito das fontes de carbono e nitrogênio na composição do ramnolipídio.** 2011. 102 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; São Paulo, 2011.

Ramnolipídios (RHLs) são biossurfactantes, formados por carboidratos combinados a ácidos hidroxialifáticos, produzidos por *Pseudomonas*. Este trabalho avaliou o potencial de produção de ramnolipídios por isolados de *Pseudomonas*, considerando os efeitos das fontes de carbono e nitrogênio sobre a concentração e composição do produto-alvo. 47 isolados bacterianos foram avaliados de forma qualitativa quanto à capacidade de produzir ramnolipídios. Foram selecionados cinco isolados para avaliação em experimentos quantitativos de produção de ramnolipídios. Os cultivos foram realizados em 48 combinações diferentes de meio mineral (16 fontes de carbono e 3 fontes de nitrogênio). A produção de polihidroxialcanoatos (PHAs) também foi avaliada, de forma a verificar se a produção destes poliésteres de alguma forma afeta a produção de ramnolipídios. Óleos de linhaça, canola e glicose foram as fontes de carbono que promoveram a formação de maiores quantidades de ramnolipídios. A partir de óleos vegetais, nitrato de sódio se mostrou a melhor fonte de nitrogênio para a produção de ramnolipídios. Algumas variações nas concentrações dos monômeros de 3-hidroxiácidos (3HAs) foram observadas, porém o 3-hidroxi-decanoato foi o principal constituinte em RHLs. Considerando os isolados avaliados nesse estudo, tanto fontes de carbono hidrofílicas quanto hidrofóbicas parecem favorecer a formação de RHLs, ao invés de PHAs. Nitrato de sódio e ureia também favoreceram uma maior produção de RHLs quando comparados com a produção de PHAs. A análise de PHAs e de RHLs purificados revelou a presença de 3-hidroxi-6-dodecanoato (3HDd₆), um composto proveniente exclusivamente da β -oxidação do ácido linoleico. Na biossíntese de PHAs a partir de óleo de linhaça, a β -oxidação de ácidos graxos parece contribuir cerca de 3 vezes mais com monômeros quando comparada à biossíntese de ácidos graxos. Por outro lado, β -oxidação e biossíntese de ácidos graxos contribuem igualmente na geração de 3HAs para biossíntese de RHLs. Esses resultados indicam que essas duas vias de metabolismo de ácidos graxos contribuem com intermediários metabólicos para a biossíntese de ramnolipídios, ao contrário ao reportado na literatura, demonstrando que é possível controlar a composição de 3-hidroxiácidos presentes nos RHLs pela oferta de óleos vegetais contendo diferentes ácidos graxos, como já havia sido reportado para PHAs.

Palavras-chave: Ramnolipídios. *Pseudomonas*. Biossurfactantes.

ABSTRACT

ALMEIDA, K. L. **Rhamnolipids production by *Pseudomonas* isolates: assessment of carbon and nitrogen sources effects on the rhamnolipids composition.** 2011. 102 p. Masters thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; São Paulo, 2011.

Rhamnolipids (RHLs) are biosurfactants, composed of carbohydrates combined with hydroxyaliphatic acids, produced by *Pseudomonas*. This study evaluated the production of rhamnolipids by *Pseudomonas* isolates, considering the effects of carbon and nitrogen sources on the concentration and composition of the target-product. 47 bacterial isolates were qualitatively evaluated for their ability to produce rhamnolipids. Five isolates were selected for further quantitative evaluation. The cultures were performed in 48 different mineral medium compositions (combining 16 carbon sources and 3 nitrogen sources). The production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) was also evaluated to verify its influence on the production of rhamnolipids. Linseed oil, canola oil and glucose were the carbon sources that yielded the largest amounts of rhamnolipids. From plant oils, sodium nitrate proved to be the best nitrogen source for rhamnolipids production. Despite some variations in the molar fraction of 3-hydroxyacids (3HAs) were observed, 3-hydroxydecanoate was always the main constituent in RHLs. Considering the isolates in this study, both hydrophilic and hydrophobic carbon sources seem to favor the formation of RHLs instead of PHAs. Sodium nitrate and urea also favored a greater production of RHLs compared with the production of PHAs. The analysis of purified PHA and RHL revealed the presence of the 3-hydroxy-6-dodecanoate, a compound derived exclusively from β -oxidation of linoleic acid. In the biosynthesis of PHAs from linseed oil, the β -oxidation of fatty acids seems to contribute channeling about 3 times more monomers when compared with the contribution of the fatty acids biosynthesis. On the other hand, β -oxidation and biosynthesis of fatty acids equally contribute to the generation of 3HAs for RHLs biosynthesis. These results indicate that both fatty acids metabolic pathways contribute with intermediates for the biosynthesis of rhamnolipids, contrary to what is reported in the literature, demonstrating that it is possible to control the composition of 3-hydroxyacids present in RHLs by supplying plant oils containing different fatty acids, as had been reported for PHAs.

Key words: Rhamnolipids. *Pseudomonas*. Biosurfactants.

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Biossurfactantes constituem um grupo diverso de moléculas com atividade tensoativa sintetizadas por micro-organismos, tais como bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Até o presente, a maioria dos compostos usados no mercado é de origem química; entretanto, com a compatibilidade ambiental se tornando um fator cada vez mais importante na seleção de produtos químicos industriais, o interesse em surfactantes biológicos tem aumentado (DELEU e PAQUOT, 2004). Uma das mais importantes vantagens dos biossurfactantes quando comparados aos surfactantes químicos é sua aceitabilidade ecológica, devido à baixa toxicidade, natural biodegradabilidade e alta efetividade em extremas temperaturas, pH e salinidade (FIECHTER, 1992; ISHIGAMI, 1993; ROSENBERG, 1993).

Algumas aplicações ambientais têm sido atribuídas aos biossurfactantes, como biorremediação de hidrocarbonetos (BANAT, 1995; GEORGIOUS et al., 1992), poluentes orgânicos e solos contaminados com metais pesados, descontaminação de áreas impactadas com óleos e tratamento de derrames de petróleo (HESTER, 2001; O'CONNOR, 2002). Além do uso ambiental, estes compostos podem ser utilizados em uma ampla variedade de aplicações na indústria alimentícia, cosmética, farmacêutica e química (BANAT et al., 2000; GEORGIOUS et al., 1992; ISHIGAMI, 1993).

Ramnolipídios são biossurfactantes produzidos principalmente por bactérias do gênero *Pseudomonas* (SOBERÓN-CHÁVEZ et al., 2005), os quais representam uma das mais importantes classes de surfactantes microbianos, demonstrando um alto rendimento de produção e conseqüentemente um ótimo potencial para exploração comercial (NITSCHKE et al., 2005a). Está entre os três biossurfactantes disponíveis comercialmente, junto com soforolipídios e surfactina, porém é o único aprovado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos para aplicação em produtos alimentícios, cosméticos e farmacêuticos (NITSCHKE e COSTA, 2007).

Esses biossurfactantes são classificados como glicolipídios, pois são formados por carboidratos em combinação com ácidos hidroxialifáticos. As principais misturas encontradas são ramnosil- β -hidroxialcanoil- β -hidroxialcanoato (mono-ramnolipídio) e ramnosil-ramnosil- β -hidroxialcanoil- β -hidroxialcanoato (di-ramnolipídio) (DESAI e BANAT, 1997; SOBERÓN-CHÁVEZ et al., 2005). As propriedades do ramnolipídio dependem da composição e distribuição dos homólogos, as quais variam de acordo com a linhagem bacteriana, condições de cultivo e composição do meio de cultura (GUERRA-SANTOS et al., 1984).

Atualmente, o fator econômico é o principal empecilho para o amplo uso de biossurfactantes (NITSCHKE e COSTA, 2010), o custo estimado de produção de RHLs é de 5 a 20 US\$/kg, enquanto o custo de produção de surfactantes químicos, como o alquilpoliglicosídeo, está entre 1 e 3 US\$/kg (REIS et al., 2011). Uma vantagem dos ramnolipídios é que eles podem ser produzidos a partir substratos hidrofílicos ou hidrofóbicos relativamente baratos, tais como carboidratos, óleos vegetais, ou ainda resíduos da indústria alimentícia (NITSCHKE et al., 2005a). O uso alternativo de substratos de baixo custo é uma importante estratégia para facilitar o desenvolvimento industrial para produção de biossurfactantes (NITSCHKE e COSTA, 2007).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi explorar o potencial de produção de ramnolipídios por isolados de *Pseudomonas* obtidos em trabalhos anteriores. Os isolados foram selecionados tanto com relação à capacidade de produzir maiores quantidades de ramnolipídios como com relação à maior produtividade. Além disso, diferentes fontes de carbono (hidrofílicas e hidrofóbicas) e nitrogênio foram testadas com a finalidade de estabelecer condições para a produção de ramnolipídios de composições variáveis de forma controlada.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível obter as seguintes conclusões:

- Óleo de linhaça e óleo de canola foram as fontes de carbono hidrofóbicas que promoveram a formação de maiores quantidades de ramnolipídios;
- A glicose foi a fonte de carbono hidrofílica que permitiu a produção das maiores quantidades desse biossurfactante;
- Nos cultivos utilizando óleos vegetais, nitrato de sódio se mostrou uma fonte de nitrogênio interessante para produção de grandes quantidades de ramnolipídios;
- Embora os resultados gerais indiquem algumas fontes de carbono e nitrogênio como mais interessantes para a produção de RHLs, a produção desses tensoativos é fortemente dependente da linhagem bacteriana, determinando que em cada caso deverá ser selecionada a combinação linhagem bacteriana/fonte de carbono/fonte de nitrogênio mais adequada;
- Em geral, observou-se valores altos de 3HA/Ram, sugerindo que além de mono e di-ramnolipídios uma importante parcela de 3HAAs constitui os compostos tensoativos produzidos;
- A partir de óleo de mamona um pico diferente foi detectado em altas concentrações tanto em RHLs como em PHAs, podendo corresponder ao ácido 4-hidroxidecanoato;
- Para os cultivos utilizando óleo de tungue, dois picos diferentes foram observados em PHAs, podendo corresponder ao 3-hidroxi-3,5-decenoato (3HDA_{3,5}) e ao 3-hidroxi-3-octenoato (3HO₃);
- Nos cultivos utilizando óleos vegetais que continham em sua composição mais de 9% de ácido linoleico foi detectada a presença de 3-hidroxi-6-dodecenoato (3HDd₆) nos sobrenadantes, sugerindo que a β -oxidação de ácidos graxos deve estar contribuindo direta ou indiretamente para a biossíntese de RHLs;
- Tanto a biossíntese quanto a β -oxidação de ácidos graxos podem contribuir com intermediários metabólicos para a biossíntese de ramnolipídios. Na biossíntese de PHAs a partir de óleo de linhaça, a β -oxidação de ácidos graxos contribuiria cerca de 3 vezes mais com monômeros quando comparada à biossíntese de ácidos graxos. Por outro lado, β -oxidação e biossíntese de ácidos graxos contribuiriam igualmente na geração de 3HAs para biossíntese de RHLs. Esses resultados demonstram que é possível controlar a composição de

3-hidroxiácidos presentes nos RHLs pela oferta de óleos vegetais contendo diferentes ácidos graxos, como já havia sido demonstrado para PHAs;

- Considerando os isolados avaliados nesse estudo, tanto fontes de carbono hidrofílicas quanto hidrofóbicas parecem favorecer a formação de RHLs, ao invés de PHAs;

- Nitrato de sódio e ureia também favoreceram uma maior produção de RHLs quando comparados com a produção de PHAs;

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Aprimorar a análise da composição dos RHLs e PHAs para identificação dos diferentes compostos detectados;
- Melhorar o processo de produção de RHLs para obtenção de maiores concentrações desse produto, permitindo melhor caracterizar os efeitos de sua composição nas propriedades tensoativas.

REFERÊNCIAS*

- AAGOT, N.; NYBROE, O.; NILSEN, P., JOHNSEN, K. An altered *Pseudomonas* diversity is recovered from soil by using nutrient-poor *Pseudomonas*-selective soil extract media. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, p. 5233-5239, 2001.
- ABALOS, A.; PINAZO, A.; INFANTE, M. R.; CASALS, M.; GARCIA, F. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. **Langmuir**, v. 17, p. 1367-1371, 2001.
- 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.
- ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiol.**, v. 54, p. 450-472. 1990, Review.
- ANDRÄ, J.; RADEMANN, J.; HOWE, J.; KOCH, M. H. J.; HEINE, H.; ZÄHRINGER, U.; BRANDENBURG, K. Endotoxin-like properties of a rhamnolipid exotoxin from *Burkholderia (Pseudomonas) plantarii*: immune cell stimulation and biophysical characterization. **Biol. Chem.**, v. 387, p. 301-310, 2006.
- ARINO, S.; MARCHAL, R.; VANDECASTEELE, J. P. Identification and production of a rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas* species. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 45, p. 162-168, 1996.
- AVILA-LEÓN, I. A.; SILVA-QUEIROZ, S. R.; SILVA, L. F.; GOMEZ, J. G. C. Modulação da composição de polihidroxicanoatos produzidos por *Pseudomonas* a partir de óleos vegetais. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS (SINAFERM), 16., **Resumos**, Curitiba, PR: Universidade Federal do Paraná, 2007.
- BANAT, I. M. Biosurfactants Production and Possible Uses in Microbial Enhanced oil Recovery and oil pollution Remediation. **Bioresour. Technol.**, v. 51, p. 1-12. 1995. Review.
- BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 53, p. 495-508, 2000.
- BAPTIST, J. N. Process for preparing poly- β -hydroxybutyric acid. US patent application. US 3036959. 1962.
- BERGSTRÖM, S.; THEORELL, H.; DAVIDE, H. On a metabolic product of *P. pyocyanea*, pyolipidic acid, active against *M. tuberculosis*. **Ark. Chem. Mineral Geol.**, v. 23(A), p. 1-12, 1946a.
- BERGSTRÖM, S.; THEORELL, H.; DAVIDE, H. Pyolipic acid. A metabolic product of *P. pyocyanea*, active against *Mycobacterium tuberculosis*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 10, p. 165-166, 1946b.

*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

BJARNSHOLT, T.; JENSEN, P.O.; BURMOLLE, M.; HENTZER, M.; HAAGENSEN, J.A.J. *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent. **Microbiology**, v. 151, p. 373-383, 2005

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.

BURGER, M. M.; GLASER, L.; BURTON, R. M. The enzymatic synthesis of a rhamnosecontaining glycolipid by extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Biol. Chem.**, v. 238, p. 2595-2601, 1963.

CHANDRASEKARAN, E. V.; BEMILLER, J. N. In: Whistler, R. L. (ed) **Methods Carbohydr. Chem.**: Academic., v. 8., , p. 89, 1980.

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.

CHEN, C. Y.; Baker, S. C.; Darton, R. C. The application of a high throughput analysis method for the screening of potential biosurfactants from natural sources. **J. Microb. Methods**, v. 70, p. 503-510, 2007.

CHEN, S. Y.; WEI, Y. H.; CHANG, J. S. Repeated pH-stat fed-batch fermentation for rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* S2. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 76, p. 67-74, 2007.

CHEN, G. Q. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. **Chem. Soc.**, v. 38, p. 2434-2446, 2009. Review.

CHOI, M. H.; XU, J. GUTIERREZ, M.; YOO, T.; CHO, Y.; YOON, S. C. Metabolic relationship between polyhydroxyalkanoic acid rhamnolipid synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: comparative ¹³C NMR analysis of the products in wild-type and mutants. **J. Biotech.** 2010.

COSTA, S. G. V. A. O; NITSCHKE, M.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. N.; CONTIERO, J. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian natives oils. **Process Bioch.**, v. 41, p. 483-488, 2006.

COSTA, S. G. V. A. O; SOUZA, S. R.; NITSCHKE, M.; FRANCHETTI, S. M. M.; JAFELICCI-JR, M.; LOVAGLIO, R. B.; CONTIERO, J. Wettability of aqueous rhamnolipids solutions produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **J. Surfact. Deterg.**, v. 12, p. 125-130, 2009a.

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

COSTA, S. G. V. A. O. **Estudo da produção de metabólitos por *Pseudomonas aeruginosa*: rhamnolipídios e polihidroxicanoatos.** 138f. Tese (Microbiologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP. 2010

DAVIES, D. G.; PARSEK, M. R.; PEARSON, J. P.; IGLEWSKI, B. H.; COSTERTON, J.W. The involvement of cell-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science**, v. 280, p. 295-298, 1998.

DE KONING, G. J. M.; WITHOLT, B. A process for the recovery of poly(3-hydroxyalkanoates) from pseudomonads. 1. Solubilization. **Bioprocess Engineering**, v. 17, p. 7-13, 1997.

DELEU, M.; PAQUOT, M. From renewable vegetable resources to microorganisms: new trends in surfactants. **C. R. Chim.**, v. 7, p. 641-646, 2004.

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

DÉZIEL, E.; LÉPINE, F.; DENNIE, D.; BOISMENU, D.; MAMERO, A.; VILLEMUR, R. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1440, p. 244-252, 1999.

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-hydroxyalkanooyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. **Microbiology**, v. 149, p. 2005-2013, 2003.

DUBEAU, D.; DÉZIEL, E.; WOODS, D.; LÉPINE, F. *Burkholderia thailandensis* harbors two identical *rhl* gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids. **BMC Microbiol.**, v. 9, p. 263, 2009.

DUBOIS, M.; GILLES, J. K.; HAMILTON, P. A.; REBERS; SMITH, F. Colorimetric Method for determination of sugars and Related Substances. **Analyt. Chim.**, v. 28, p. 350-356, 1956.

DUSANE, D. H.; ZINJARDE, S. S.; VENUGOPALAN, V. P.; MCLEAN, R. J. C.; WEBER, M. M.; RAHMAN, P. K. S. M. Quorum sensing: implications on rhamnolipid biosurfactant production. **Biotechnol. Gen. Eng.**, v. 27, p. 159-184, 2010. Review.

EGGINK, G.; WAARD, P.; HUIJBERTS, G. N. M. Formation of novel poly(hydroxyalkanoates) long-chain fatty acids. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BACTERIAL POLYHYDROXYALKANOATES, 4., 1995, Montreal, **Abstracts**. Montreal: Canadian Journal of Microbiology, 1995. p. 14-21, Suppl. 1.

FIECHTER, A. Biosurfactants: moving towards industrial application. **Trends Biotechnol.**, v. 10, p. 208-217, 1992.

FUQUA, W.C.; GREENBERG, E.P. Self perception in bacteria: molecular mechanisms of stimulus-response coupling. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 1, p. 183-189, 1998.

GAMBELLO, M. J.; IGLEWSKI, B. H. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* gene, a transcriptional activator of elastase expression. **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 3000-3009, 1991.

GEORGIU, G.; LIN, S.C.; SHARMA, M.M. Surface-active compounds from microorganisms. **Bio/Technol.**, v. 10, p. 60-65, 1992.

GIANE, C.; WULLBRANDT, D.; ROTHERT, R.; MEIWES, J. *Pseudomonas aeruginosa* and its use in process for the biotechnological preparation of L-rhamnose. **United States Patent**, v. 5, p. 658-793, 1997.

GOMEZ, J. G. C. **Produção por *Pseudomonas* sp. de polihidroxicanoatos contendo monômeros de cadeia média a partir de carboidratos:** avaliação da eficiência, modificação da composição e obtenção de mutantes. 155 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

GUERRA-SANTOS, L.; KAPELLI, O.; FIECHTER, A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. **Appl. and Environ. Microbiol.**, v. 48(2), p. 302-305, 1984.

GUNTHER, N. W.; NUÑEZ, A.; FETT, W. SOLAIMAN, D. K. Y. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a nonpathogenic bacterium. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, p. 2288-2293, 2005.

GUNTHER, N. W.; NUÑEZ, A.; FORTIS, L.; SOLAIMAN, D. K. Y. Proteomic based investigation of rhamnolipid production by *Pseudomonas chlororaphis* strain NRRL B-30761. **J. Ind. Microbiol. Biotech.**, v. 33, p. 914-920, 2006.

HAFERBURG, D.; HOMMEL, R.; KLEBER, H.P.; KLUGE, S.; SCHUSTER, G. Antiphytoviral activity of a rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa*. **Acta Biotechnol.**, v. 7, p. 353-356, 1987.

HÄUSSLER, S.; NIMTZ, M.; DOMKE, T.; WRAY, V.; STEINMETZ, I. Purification and characterization of a cytotoxic exolipid of *Burkholderia pseudomallei*. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 1588-1593, 1998.

HAUTHAL, H. G. L-Rhamnose als Zuckerbaustein. **Nachr. Chem. Technol. Lab.**, v. 42, p. 285. 1994.

HENTZER, M.; TEITZEL, G. M.; BALZER, G. J.; HEYDORN, A.; MOLIN, S. Alginate over-production affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 5395-5401, 2001.

HESTER, A. IB Market forecast. **Indust. Bioprocess.**, v. 23, p. 3, 2001.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E. M. H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 63, p. 3233-3241, 1997.

HEYD, M.; KOHNERT, A.; TAN, T. H.; NUSSER, M.; KIRSCHHÖFER, K.; BRENNER-WEISS, G.; FRANZRED, M.; BERENSMIEIER, S. Development and trends of biosurfactant analysis and purification using rhamnolipids as an example. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 391(5), p. 1579-1590, 2008.

HORI, K.; MARSUDI, S.; UNNO, H. Simultaneous production of polyhydroxialcanoates and rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 78 (6), p. 699-707, 2002.

ISHIGAMI, Y. Biosurfactants face increasing interest. **Inform**, v.4, p. 1156-1165, 1993.

ITOH, S.; HONDA, H.; TOMOTA, F.; SUZUKI, T. Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on n-paraffin. **J. Antibiot.**, v. 24, p. 855-859, 1971.

JARVIS, F. G.; JOHNSON, M. J. A glyco-lipide produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 71, p. 4124-4126, 1949.

KIM, E. J.; SABRA, W.; ZENG, A. P. Iron deficiency leads to inhibition of oxygen transfer and enhanced formation of virulence factors in culture of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Microbiology**, v. 149, p. 2627-2634, 2003.

KING, A. T.; DAVEY, M. R.; MELLOR, I. R.; MULLIGAN, B. J.; LOWE, K. C. Surfactant effects on yeast cells. **Enz. Microb. Technol.**, v. 13, p. 148-153, 1991.

KÖHLER, T.; CURTY, L.K.; BARJA, F.; VAN DELDEN, C.; PECHERE, J.C. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 5990-5996, 2000.

KÖHLER, T.; DUMAS, J. L.; VAN DELDEN, C. Ribosome protection prevents azithromycin mediated quorum sensing modulation and stationary phase killing of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 51, p. 4243-4248, 2007.

KOSARIC, N.; GRAY, N. C. C.; CAIRNS, W. L. Biosurfactants and Biotechnology: **Surfactant Sci. Series**, Marcel Dekker. New York, v. 25, p. 1-19, 1983.

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

LEE, K. M.; HWANG, S. H.; HA, S. D.; JANG, J. H.; LIM, D. J.; KONG, J. Y. Rhamnolipid production in batch and fed-batch fermentation using *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 KCTC 18012P. **Biotechnol. Bioproc. Eng.**, v. 9, p. 267-273, 2004.

LÉPINE, F.; DEZIEL, E.; MILOT, S.; VILLEMUR, R. Liquid chromatographic/mass spectrometric detection of the 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acid precursors of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. **J. Mass Spect.**, v. 37, p. 41-46, 2002.

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

MANRESA, M. A.; BASTIDA, J.; MERCADE, M. E.; ROBERT, M.; DEANDRES, C.; ESPUNY, M. J.; GUINEA, J. Kinetic-studies on surfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*-44T1. **J. Ind. Microbiol.**, v. 8, p. 133-136, 1991.

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. 955–961, 2008.

MATA-SANDOVAL, J. C.; KARNS, J. TORRENTS, A. Effect of nutritional and environmental conditions on the production and composition of rhamnolipids by *P. aeruginosa* UG2. **Microbiol. Res.**, v. 155, p. 249-256, 2001

MÜLLER, M. M.; HÖRMANN, B.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 as a model for rhamnolipid production in bioreactor systems. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 87, p. 167-174, 2010.

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

NAYAK, A. S.; VIJAYKUMAR, M. H.; KAREGOUDAR, T. B. Characterization of biosurfactant produced by *Pseudoxanthomonas* sp PNK-04 and its application in bioremediation. **Int. Biodeterior. Biodegrad.**, v. 63, p. 73-79, 2009.

NEALSON, K. H.; PLATT, T.; HASTINGS, J. W. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. **J. Bacteriol.**, v. 104, p. 313-322, 1970.

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

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O.; HADDAD, R.; GONÇALVES, L. A. G.; EBERLIN, M. N.; CONTIERO, J. Oil waste as unconventional substrates for rhamnolipid biodurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Biotechnol. Prog.**, v. 21, p. 1562-1566, 2005b.

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. Struture and applications of ramnolipid surfactant produced in soybean oil waste. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 160, p. 2066-2074, 2010.

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., 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.** 269: 19787–95. 1994b.

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.

O'CONNOR, L. Market forecast: microbial biosurfactants. **Ind. Bioprocess**, v. 24, p. 10-11, 2002.

OLIVEIRA, F. J. S.; VAZQUEZ, L. DE CAMPOS, N. P. DE FRANÇA, F. P. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas alcaligenes* strain. **Process. Biochem.**, v. 44, p. 383-389, 2009.

OBASLI, D.; ASLIM, B. Biosurfactant production in sugar beet molasses by some *Pseudomonas* spp. **J. Environ. Biol.**, v. 30, p. 161-163, 2009.

PAJARRON, A. M.; DEKOSTER, C. G.; HEERMA, W.; SCHMIDT, M.; HAVERKAMP, J. Structure identification of natural rhamnolipid mixtures by fast-atom-bombardment tandem mass-spectrometry. **Glycoconj. J.**, v. 10, p. 219–226, 1993.

PASSADOR, L.; COOK, J. M.; GAMBELLO, M. J.; RUST, L.; IGLEWSKI, B. H. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. **Science**, v.260, p. 1127-1130, 1993.

PEIXOTO, R. M. **Bioprospeção de microrganismos do gênero *Pseudomonas* produtores de biosurfactantes**. 98 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

PELCZAR, Jr.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N. R. **Microbiology: concepts and applications**. New York: McGraw Hill. p. 896, 1993.

PIETRO, L. M.; MICHELON, M.; BUKERT, J. F. M.; KALIL, S. J.; BURKET, C. A. V. The production of rhamnolipid by a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a southern coastal zone in Brazil. **Chemosphere**, v. 71, p. 1781-1785, 2008.

RAHMAN, P.; LUNGUT, A.; IDOWU, J.; OLEA, M. Biosurfactant production using novel bacteria from Northeast England. **BUILDING BUSINESS ON BIOSCIENCE SUSTAINABLE INNOVATION CONFERENCE**, Edinburgh: Heriot-Watt University, 2009.

RAHIM, R.; OCHSNER, U. A.; OLVERA, C.; GRANINGER, M.; MESSNER, P.; LAM, J. S.; SOBERÓN-CHÁVEZ, G. Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa 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.

RAZA, Z. A.; KHALID, Z. M.; BANAT, I. M. Characterization of rhamnolipids produced by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant strain grown on waste oils. **J. Environ. Sci. Health Part A**, v. 44, p. 1367-1373, 2009.

REHM, B. H. A. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. **Nature**, v. 8, p. 578- 592, 2010. Review.

REIS, R. S.; PEREIRA, A. G.; NEVES, B. C.; FREIRE, D. M. G. Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa*. **Bioresour. Technol.**, v. 102, p. 6377-6384, 2011. Review.

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.

RONEY, A. P.; PRICE, N. P.; RAY, K. J.; KUO, T. M. Isolation and characterization of rhamnolipid-producing bacterial strains from a biodiesel facility. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 295, p. 82-87, 2009.

ROSENBERG, E. Exploiting microbial growth on hydrocarbons – new markets. **Trends Biotechnol.**, v. 11, p. 419-424, 1993.

SABRA, W.; KIM, E. J.; ZENG, A. P. Physiological responses of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to oxidative stress in controlled microaerobic and aerobic cultures. **Microbiology**, v. 148, p. 3195-3202, 2002.

SANCHEZ, R. J.; SCHRIPEMA, J.; SILVA, L. F.; TACIRO, M. K.; PRADELLA, J. G. C.; GOMEZ, J. G. C. Medium-chain-length polyhydroxyalkanoic acids (PHAMcl) produced by *Pseudomonas putida* IPT 046 from renewable sources. **Eur. Polym. J.**, v. 39, p. 1385-1394, 2003.

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(4), p. 265–268, 1991.

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

SILVA-QUEIROZ, S.R.; SILVA, L.F.; PRADELLA, J.G.C.; GOMEZ, J.G.C. PHAMCL biosynthesis systems in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* strains show differences on monomer specificities. **J. Bacteriol.**, v.143, p.111-118, 2009.

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

SOBERÓN-CHÁVEZ, G.; **Biosurfactants: from genes to applications**. Microbiology Monographs, Berlin: Springer, 2010. 216 p.

STANGHELINI, M. E.; MILLER, R. M. Biosurfactants: Their Identity and Potential Efficacy in the Biological Control of Zoosporic Plant Pathogens. **Plant Disease**, v. 81, p. 4-12, 1997.

STEINBÜCHEL, A. Polyhydroxyalkanoic acids. In: Byrom D. (ed). **Biomaterials novel materials from biological sources**. New York: Macmillan Publishers Basingstoke., 1991, p. 123-213.

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 biosurfactantes ramnolipídios e polihidroxicanoatos e avaliação da relação metabólica no processo de síntese**. 81 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Pesquisas Tecnológicas, Instituto Butantan, Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo, 2006.

SYLDATK, C.; LANG, S.; MATULOVIC, U.; WAGNER, F. Production of four interfacial active rhamnolipids from n-alkanes or glycerol by resting cells of *Pseudomonas species* DMS 2874. **Z. Naturforsch.**, v. 40c, p.61-67, 1985.

TODER, D. S.; GAMBELLO, M. J.; IGLEWSKI, B. H. *Pseudomonas aeruginosa* LasA: a second elastase gene under transcriptional control of LasR. **Mol. Microbiol.**, v. 5, p. 2003-2010, 1991.

TORTORA, G. J.; BERDELL, R. F.; CHRISTINE L. C. **Microbiologia**. 8ª ed., Porto Alegre: Editora Artmed, 2005, 312 p.

VAN ALST, N. E.; PICARDO, K. F.; IGLEWSKI, B. H.; HAIDARIS, C.G. Nitrate sensing and metabolism modulate motility, biofilm formation, and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection and Immunity**, v. 75 (8), 3780-3790, 2007.

VENKATA RAMANA, K.; KARANTH, N.G. Factors affecting biosurfactant production using *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 under submerged conditions. **J. Chem. Tech. Biotechbol.**, v. 45, p. 249-257, 1989.

WEI, Y. H.; CHOU, C. L.; CHANG, J. S. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petro-chemical wastewater. **Biochem. Eng. J.**, v. 27, p. 146-154, 2005.

WILLIAMS, P.; WINZER, K.; CHAN, W. C.; CAMARA, M. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacteria world. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci.**, v. 362, p. 1119-1134, 2007.

WINZER, K.; FALCONER, C.; GARBER, N. C.; DIGGLE, S. P.; CAMARA, M.; WILLIAMS, P. The *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL e PA-IIL are controlled by quorum sensing and by RpoS. **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 6401-6411, 2000.

WITHOLT, B.; KESSLER, B. Perspectives of medium chain length poly(hydroxialkanoates), a versatile set of bacterial bioplastics. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v.10(3), p. 279-285, 1999.

WUBBOLTS, M. G.; WITHOLT, B. Selected industrial biotransformations. ATKINSON, T.; SHERWOOD, R. F. (Eds) **Biotech. Handbooks 10 – Pseudomonas**. New York:: Plenum Press. 1998. p. 271-329.

ZHU, K.; ROCK, C. O. RhlA 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(9), p. 3147–3154, 2008.