

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA PARA A SUSTENTABILIDADE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E MONITORAMENTO
AMBIENTAL

Gabriela Fiori da Silva

**BIOMASSA RESIDUAL FRUTÍCOLA: UMA ABORDAGEM METAGENÔMICA DA
MICROBIOTA AUTÓCTONE E SUA UTILIZAÇÃO NA PRODUÇÃO DE
BIOSURFACTANTES**

Sorocaba

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA PARA A SUSTENTABILIDADE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E MONITORAMENTO
AMBIENTAL

Gabriela Fiori da Silva

**BIOMASSA RESIDUAL FRUTÍCOLA: UMA ABORDAGEM METAGENÔMICA DA
MICROBIOTA AUTÓCTONE E SUA UTILIZAÇÃO NA PRODUÇÃO DE
BIOSURFACTANTES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental.

Orientação: Profa. Dra. Iolanda Cristina Silveira Duarte

Coorientação: Prof. Dr. Tiago Palladino Delforno

Financiamento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Sorocaba

2023

Fiori da Silva, Gabriela

Biomassa residual frutícola: uma abordagem metagenômica da microbiota autóctone e sua utilização na produção de biossurfactantes / Gabriela Fiori da Silva -- 2023.
116f.

Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba

Orientador (a): Iolanda Cristina Silveira Duarte

Banca Examinadora: Lais Albuquerque Giraldi, Roberta Barros Lovaglio, Valéria Maia Merzel, Franciele Pereira Camargo

Bibliografia

1. Biossurfactantes. 2. Metagenômica. 3. Bioprospecção.
I. Fiori da Silva, Gabriela. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano -
CRB/8 6979



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

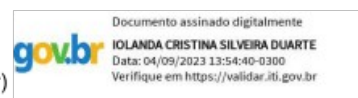
Centro de Ciências e Tecnologias Para a Sustentabilidade
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Gabriela Fiori da Silva, realizada em 04/09/2023.

Comissão Julgadora:

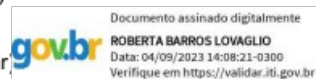
Profa. Dra. Iolanda Cristina Silveira Duarte (UFSCar)



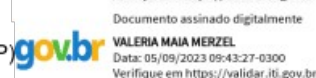
Profa. Dra. Lais Albuquerque Giraldi (USP)

Assinado digitalmente por LAIS ALBUQUERQUE GIRALDI:
37053474895
Data: 2023.09.04 19:05:49-0300

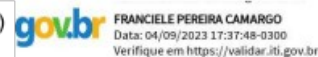
Profa. Dra. Roberta Barros Lovaglio (UFSCar)



Profa. Dra. Valéria Maia Merzel (UNICAMP)



Profa. Dra. Franciele Pereira Camargo (UNESP RC)



O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles que, de alguma forma, permitiram que este trabalho se tornasse realidade.

À minha orientadora Profa. Dra. Iolanda Cristina Silveira Duarte, agradeço todo o apoio, os ensinamentos e a esta oportunidade. E que, nos momentos mais difíceis da pandemia COVID-19, demonstrou preocupação e compreensão às dificuldades enfrentadas para o andamento do projeto.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Tiago Palladino Delforno, pela paciência, dedicação e por me apresentar à bioinformática e me ensinar muito sobre esta área.

Ao Prof. Dr. Daniel Huson e seu aluno Anupam Gautam da Universidade de Tübingen por me receberem na Alemanha, por me ajudarem e me ensinarem muito sobre análises metagenômicas e por toda hospitalidade.

A todos os meus colegas do laboratório LMA, pelo incentivo e apoio, em especial à Mariana por toda a ajuda e atenção durante as análises e testes. À Natália e Fernanda por todo o desenvolvimento do projeto. À Amanda pela prontidão em auxiliar nos testes finais e ao Vitor por me auxiliar no laboratório e a otimizar nosso tempo.

Ao Rafael de Souza, que está presente em todos os momentos da minha vida, me apoiando, me incentivando e desejando o meu sucesso. Aos meus pais e minhas irmãs por sempre desejarem o melhor para mim e estarem sempre ao meu lado. Sem esquecer de mencionar a minha irmã Marina pela ajuda na elaboração e correção de todas figuras desta tese e de artigos.

À CAPES pela bolsa de doutorado. Este trabalho foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código 001.

RESUMO

Biossurfactantes são compostos multifuncionais de origem microbiana de interesse industrial e ambiental devido as suas propriedades tensoativas e emulsificantes de natureza biodegradável e baixa toxicidade. Diferentes meios de cultivo e fontes de carbono são utilizadas na produção desses compostos, bem como uma ampla diversidade de microrganismos, isolados de múltiplos ambientes. Portanto, o presente trabalho teve por objetivo promover uma bioprospecção na microbiota associada a resíduos de frutas (laranja, manga e *mix* de frutas) visando identificar a composição genética da microbiota relacionada à biossíntese de biossurfactantes. Para isso, os resíduos foram avaliados através de uma abordagem metagenômica, onde determinou-se o potencial genético associado à biossíntese de biossurfactantes. Os resíduos apresentaram um *common core* que inclui os gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter* e *Escherichia* e perfis funcionais similares, relacionados à biossíntese de biossurfactantes, apresentando um potencial genético principalmente para a biossíntese de lipopeptídeos, com destaque para genes relacionados à biossíntese de putisolvinas, micosubutilina e iturina A. As atribuições taxonômicas aos genes presentes em maior abundância nas amostras estavam relacionadas ao *common core* encontrado. A análise metagenômica evidenciou que os resíduos de frutas podem ser utilizados como fonte de microrganismos pois sua microbiota associada apresentou um potencial genético para a biossíntese de biossurfactantes. A partir do metagenoma, foram recuperados 34 genomas (MAGs), sendo 10 em alta qualidade, que foram avaliados quanto aos genes relacionados à produção de biossurfactantes. Os MAGs apresentaram potencial genético para a biossíntese de biossurfactantes, especialmente lipopeptídios, corroborando com a análise metagenômica. O MAG OB01 identificado taxonomicamente como *Brevibacillus laterosporus* destacou-se pela quantidade de genes atribuídos. Posteriormente, o microrganismo isolado de resíduo de manga, identificado como *Brevibacillus borstelensis* ISM04 foi utilizado no processo fermentativo para a produção de biossurfactante utilizando glicerol como fonte de carbono. O biossurfactante produzido apresentou atividade emulsificante de 67 % em querosene e apresentou estabilidade térmica até 80 °C e entre pH 6 e 10, além disso, não apresentou toxicidade em sementes de tomate e alface. O composto produzido foi parcialmente caracterizado e as análises sugerem ser um biossurfactante de natureza lipopeptídica.

Palavras-chave: genética; biotensoativos; biorremediação; antimicrobianos; bioprospecção.

RESUMO EM LÍNGUA ESTRANGEIRA

Biosurfactants are multifunctional compounds of microbial origin of industrial and environmental interest due to their surfactant and emulsifying properties of biodegradable nature and low toxicity. Several culture media and carbon sources are used in the production of these compounds, as well as a wide variety of microorganisms, isolated from multiple environments. The present work aims to promote a bioprospection in the microbiota associated with fruit residues (orange, mango and fruit mix) in order to identify the genetic composition of this microbiota related to the biosynthesis of biosurfactants. For this, the residues were evaluated through a metagenomic approach, where the genetic potential of their associated microbiota for biosurfactant biosynthesis was determined. The residues presented a common core that includes the genera *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter* and *Escherichia* and similar functional profiles related to biosurfactant biosynthesis, presenting a genetic potential mainly for lipopeptide biosynthesis, with emphasis on genes related to the biosynthesis of putisolvins, mycosubtilin and iturin A. The taxonomic assignments to the genes present in higher abundance in the samples were related to the common core found. From the metagenome, 34 genomes (MAGs) were retrieved, 10 of which were of high quality, which were evaluated for genes related to the production of biosurfactants. MAGs showed genetic potential for the biosynthesis of biosurfactants, especially lipopeptides, corroborating the metagenomic analysis. The MAG OB01 taxonomically identified as *Brevibacillus laterosporus* stood out for the number of assigned genes. Subsequently, the microorganism isolated from mango residue, identified as *Brevibacillus borstelensis* ISM04, was used in the fermentation process for the production of biosurfactant using glycerol as a carbon source. The produced biosurfactant showed an emulsifying activity of 67 % in kerosene and showed thermal stability up to 80 °C and at pH range between 6 and 10, in addition, it did not show toxicity in tomato and lettuce seeds. The compound produced was partially characterized and the analyzes suggest that it is a lipopeptide biosurfactant.

Keywords: genetics; biotensioactives; biorremediation; antimicrobials; bioprospecting.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	7
OBJETIVOS	9
REFERÊNCIAS	10
CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
1.1 SURFACTANTES.....	12
1.2 BIOSSURFACTANTES.....	15
1.3 APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DOS BIOSSURFACTANTES.....	17
1.4 PRODUÇÃO A PARTIR DE SUBSTRATOS DE BAIXO CUSTO DE ORIGEM RENOVÁVEL.....	21
1.5 ABORDAGEM METAGENÔMICA NA PESQUISA COM BIOSSURFACTANTES.....	24
1.6 REFERÊNCIAS.....	26
CAPÍTULO 2 - ANÁLISE INTERATIVA DE BIOSSURFACTANTES EM AMOSTRAS DE FERMENTAÇÃO DE RESÍDUOS DE FRUTAS USANDO BIOSURFDB E MEGAN	35
2.1 INTRODUÇÃO.....	36
2.2 METODOLOGIA.....	37
2.2.1 Amostragem e fermentação autóctone.....	37
2.2.2 Extração de DNA e sequenciamento metagenômico.....	38
2.2.3 Representação do BioSurfDB no MEGAN.....	38
2.2.4 Análises DIAMOND+MEGAN.....	39
2.2.5 Análise centrada no gene.....	40
2.3 RESULTADOS.....	40
2.3.1 Análise taxonômica.....	40
2.3.2 Análise funcional.....	44
2.4 DISCUSSÃO.....	48
2.5 REFERÊNCIAS.....	50
CAPÍTULO 3 – CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA E FUNCIONAL DE GENOMAS RECUPERADOS DE METAGENOMAS (MAGS) DE AMOSTRAS DE	

FRUTAS ENRIQUECIDAS RELACIONADA A BIOSSÍNTESE DE BIOSSURFACTANTES.....	54
3.1 INTRODUÇÃO.....	54
3.2 METODOLOGIA.....	56
3.2.1 Recuperação de genomas a partir de metagenomas (MAGs) e bioinformática.....	56
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
3.3.1 Recuperação de genomas a partir de metagenomas (MAGs) de amostras de frutas.....	57
3.3.2 Caracterização funcional dos MAGs em amostras de frutas.....	62
3.4 CONCLUSÃO.....	71
3.5 REFERÊNCIAS.....	71
CAPÍTULO 4 – PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE A PARTIR DE <i>Brevibacillus borstelensis</i> UTILIZANDO GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO.....	76
4.1 INTRODUÇÃO.....	76
4.2 METODOLOGIA.....	78
4.2.1 Coleta, armazenagem do resíduo de fruta.....	78
4.2.2 Seleção e isolamento de microrganismos.....	78
4.2.3 Identificação de microrganismo produtor de biossurfactante, isolado de amostra de resíduo de manga.....	79
4.2.4 Ensaios de produção de biossurfactante utilizando glicerol como fonte de carbono.....	80
4.2.5 Monitoramento dos ensaios de produção de biossurfactante.....	81
4.2.6 Ensaios de produção de biossurfactante da condição otimizada e monitoramento.....	81
4.2.7 Fitotoxicidade do biossurfactante extraído.....	82
4.2.8 Caracterização parcial do biossurfactante.....	82
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	83
4.3.1 Identificação do microrganismo produtor de biossurfactante.....	83
4.3.2 Ensaios de produção de biossurfactante.....	84
4.3.3 Produção de biossurfactante da condição otimizada.....	90

4.3.4 Fitotoxicidade do biossurfactante extraído em sementes de tomate e alface.....	94
4.3.5 Caracterização parcial do biossurfactante.....	95
4.4 CONCLUSÃO.....	97
4.5 REFERÊNCIAS.....	98
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	102
APÊNDICE A.....	103
APÊNDICE B.....	106

INTRODUÇÃO

Surfactantes quimicamente sintetizados, são produzidos principalmente a partir de subprodutos da indústria petroquímica e em sua maioria são compostos aniônicos como alquibenzeno sulfonatos e não aniônicos como etoxilatos de alquifenol. São utilizados em diversos ramos industriais como detergentes, emulsificantes, agentes umectantes, dispersantes, agentes gelificantes e estabilizadores de espumas (ALMEIDA et al., 2016; AKBARI et al., 2018). Tais surfactantes são descartados no ambiente, e por apresentarem toxicidade e baixa biodegradabilidade, se acumulam no meio aquático e terrestre, afetando a biota desses ambientes e muitos organismos que dependem da tensão superficial da água (TURBEKAR et al., 2014; KASHIF et al., 2022).

Biossurfactantes são moléculas que podem ser de origem microbiana, e apresentam diversas estruturas químicas podendo ser glicolipídios, lipoproteínas, ácidos graxos, fosfolipídios etc., que podem apresentar propriedades tensoativas, emulsificantes, antimicrobiana e larvicida (CASTIGLIONI et al., 2009; MARCELINO et al., 2017; MARKANDE et al., 2021). Têm sido alvo de interesse no desenvolvimento de pesquisas por possuírem natureza biodegradável, resultando em níveis menores de poluição, baixa toxicidade, estabilidade térmica e tolerância a extremos de pH e salinidade (GUTNICK; BACH, 2017; VIEIRA et al., 2021).

Os biossurfactantes são promissores na utilização para recuperação e remoção em derramamentos de petróleo, tratamento de águas residuárias, e por serem excelentes emulsificantes podem ser utilizados nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos, bem como na agroindústria, devido sua ação bactericida e fungicida, além de possuírem grande potencial na remoção de metais pesados de solo e água contaminada (FRACCHIA et al., 2014; VIEIRA et al., 2021).

Embora possuam atividades e características superiores aos sintéticos, os biossurfactantes ainda possuem um alto custo para produção. Matérias-primas de baixo custo têm sido amplamente empregadas como fonte de carbono nos processos fermentativos e representam uma alternativa para a redução do custo na produção de biossurfactantes (GUSMÃO et al., 2010; BRUMANO et al., 2017).

Dentre as fontes de carbono de baixo custo, esse trabalho destaca a utilização do glicerol, um composto que está associado ao aumento da produção de biodiesel, uma vez que estão intimamente relacionados (EMBRAPA, 2021). O glicerol é um composto com a função álcool, solúvel em água e em álcool, subproduto da produção do biodiesel, gerado durante a transesterificação. Estima-se que do volume total de biodiesel produzido, cerca de 10 % correspondem ao glicerol (EMBRAPA, 2021). Tendo em vista o montante deste subproduto

oriundo da produção do biodiesel, a aplicação deste para ser utilizado em processos fermentativos como substrato de baixo custo a fim de produzir moléculas de interesse biotecnológico é uma alternativa viável.

Os biossurfactantes são produzidos por diversos microrganismos, geralmente isolados a partir de técnicas convencionais de cultivo, no entanto, a grande maioria da microbiota existente é ainda inexplorada, e a abordagem metagenômica permite o acesso ao material genético dessa microbiota presente em ambientes heterogêneos, sendo uma ferramenta para investigar o potencial biossintético de uma população bacteriana independente de cultivo (JACKSON et al., 2015; SIERRA-GARCIA et al., 2020). Além disso, a bioprospecção do potencial genético da microbiota presente nos mais diversos ambientes nos ajuda a entender melhor o meio em que vivem e as funções que desempenham nessa comunidade (WILLIAMS; TRINDADE, 2017; GUERRA et al., 2018).

Considerando a grande quantidade de ambientes a serem explorados, este trabalho visa a exploração dos resíduos frutícolas uma vez que o Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do mundo, ficando atrás somente da China e Índia (FAO, 2021). No entanto, grande parte da produção de frutas brasileiras fica no mercado interno, e cerca de 30 % é desperdiçada, sendo considerado como resíduos sólidos (LASAGNO; MAGALHÃES, 2018).

Portanto, o presente trabalho parte do pressuposto que os resíduos frutícolas apresentam uma microbiota associada diversa, servindo como fonte de microrganismos produtores de biossurfactantes. O objetivo geral foi avaliar a partir da abordagem metagenômica, a microbiota associada presente nestes resíduos, promover uma bioprospecção de genes relacionados à biossíntese de biossurfactantes e por fim, a partir do isolamento de microrganismos oriundos desses resíduos, determinar a melhor condição fermentativa para a produção de biossurfactante utilizando glicerol como substrato.

Esta tese está dividida em quatro capítulos, sendo o primeiro capítulo uma Revisão Bibliográfica do tema, cujo objetivo foi apresentar uma introdução aos biossurfactantes e suas principais aplicações. O segundo capítulo intitulado como “Análise Interativa de Biossurfactantes em Amostras de Fermentação de Resíduos de Frutas Usando BioSurfDB e MEGAN” foi um trabalho desenvolvido para a análise metagenômica da microbiota associada a resíduos de frutas, e com o objetivo de facilitar a visualização e exploração dos dados, foi integrado a classificação de um banco de dados de domínio específico, o BioSurfDB, ao MEGAN e disponibilizado para futuros trabalhos que envolvam a pesquisa em biossurfactantes.

O terceiro capítulo “Caracterização taxonômica e funcional de genomas recuperados de metagenomas (MAGs) de amostras de frutas enriquecidas relacionada à biossíntese de

biossurfactantes” apresenta os MAGs recuperados das amostras de metagenoma e o seu potencial genético quanto à biossíntese de biossurfactantes, utilizando o *pipeline* desenvolvido do BioSurfDB+MEGAN. E o quarto e último capítulo intitulado como “Produção de biossurfactante a partir de *Brevibacillus borstelensis* utilizando glicerol como fonte de carbono” finaliza o presente trabalho com a produção do biossurfactante parcialmente caracterizado como um lipopeptídeo, utilizando uma cepa de bactéria isolada do resíduo de manga e glicerol com fonte de carbono alternativa. Por fim, nas considerações finais apresento as principais conclusões deste trabalho e as implicações e perspectivas para pesquisas futuras.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a microbiota associada presente nos resíduos de frutas (laranja, manga e *mix* de frutas) visando a prospecção de microrganismos e genes relacionados à biossíntese de biossurfactantes utilizando a abordagem metagenômica.

Objetivos específicos

- Avaliar o potencial genético da microbiota presente nas amostras de frutas relacionado à biossíntese de biossurfactantes;
- comparar o perfil funcional da microbiota presente nas amostras de frutas;
- recuperar genomas a partir de metagenomas;
- realizar a atribuição taxonômica dos genomas recuperados;
- realizar a anotação funcional dos genomas recuperados (KEGG e BioSurfDB) e analisar as vias metabólicas de interesse e enzimas relacionadas à biossíntese de biossurfactantes;
- isolar e selecionar microrganismos presentes nos resíduos de frutas;
- avaliar e otimizar a produção de biossurfactantes a partir dos microrganismos isolados;
- avaliar a utilização do glicerol como fonte de carbono alternativa na produção de biossurfactante;
- caracterizar parcialmente o biossurfactante produzido da melhor condição fermentativa;
- testar a estabilidade do biossurfactante e sua toxicidade.

REFERÊNCIAS

AKBARI, S.; ABDURAHMAN, N. H.; YUNUS, R. M.; FAYAZ, F. Biosurfactants- a new frontier for social and environmental safety : a mini review. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 2, n. 1, p. 81–90, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biori.2018.09.001>>.

ALMEIDA, D. G. De; CÁSSIA, R. De; DA, F. S.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SANTOS, V. A.; BANAT, I. M. Biosurfactants : Promising Molecules for Petroleum Biotechnology Advances. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–14, 2016.

BRUMANO, L. P.; ANTUNES, F. A. F.; SOUTO, S. G.; SANTOS, J. C. dos; VENUS, J.; SCHNEIDER, R.; SILVA, S. S. Biosurfactant production by *Aureobasidium pullulans* in stirred tank bioreactor : New approach to understand the influence of important variables in the process. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 264–272, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.088>>.

GUERRA, A.B.; OLIVEIRA, J.S.; SILVA-PORTELA, R.C.B.; ARAÚJO, W.; CARLOS, A.C.; VASCONCELOS, A.T.R.; FREITAS, A.T.; DOMINGOS, Y.S.; FARIAS, M.F.; FERNANDES, G.J.T.; AGNEZ-LIMA, L.F. Metagenome enrichment approach used for selection of oil-degrading bacteria consortia for drill cutting residue bioremediation. **Environmental Pollution**, v. 235, p. 869-880, 2018.

GUSMÃO, C.A.B.; RUFINO, R.D.; SARUBBO, L.A. Laboratory production and characterization of a new biosurfactant from *Candida glabrata* UCP1002 cultivated in vegetable fat waste applied to the removal of hydrophobic contaminant. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 1683-1692, 2010.

GUTNICK, D L; BACH, H. Biosurfactants. In: **Reference Module in Life Sciences**. [s.l: s.n.]

HABA, E.; ESPUNY, M. J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 379–387, 2000.

JACKSON, S.A.; BORCHET, E.; O’GARA, F.; DOBSON, A.D.W. Metagenomics for the discovery of novel biosurfactants of environmental interest from marine ecosystems. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 33, p. 176-182, 2015.

KASHIF, A.; REHMAN, R.; FUWAD, A.; SHAHID, M.K.; DAYARATHNE, H.N.P.; JAMAL, A.; AFTAB, M.N.; MAINALI, B.; CHOI, Y. Current advances in the classification, production, properties and applications of microbial biosurfactants – A critical review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 306, p. 102718, 2022.

LASAGNO, C.; MAGALHÃES, R. Fruticultura: cenários prospectivos. **SEBRAE**, 2018.

MARCELINO, P. R. F.; PERES, G. F. D.; TERÁN-HILARES, R.; PAGNOCCA, F. C.; ROSA, C. A.; LACERDA, T. M.; SANTOS, J. C.; SILVA, S. S. Biosurfactants production by yeasts using sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate as new sustainable alternative for lignocellulosic biorefineries. **Industrial Crops & Products**, v. 129, p. 212–223, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.001>>.

MARKANDE, A.R.; PATEL, D.; VARJANI, S. A review on biosurfactants: properties, applications and current developments. **Bioresource Technology**, v. 330, p. 124963, 2021.

SIERRA-GARCIA, I.N.; BELGINI, D.R.B.; TORRES-BALLESTEROS, A.; PAEZ-ESPINO, D.; CAPILLA, R.; NETO, E.V.S.; GRAY, N.; OLIVEIRA, V.M. In depth metagenomic analysis in contrasting oil wells reveals syntrophic bacterial and archaeal associations for oil biodegradation in petroleum reservoirs. **Science of the Total Environment**, v. 715, p. 136346, 2020.

TURBEKAR, R.; MALIK, N.; DEY, D.; THAKARE, D. Development of rhamnolipid based white board cleaner. **International Journal of Applied Sciences and Biotechnology**, v. 2(4), p. 570-573, 2014.

VIEIRA, I.M.M.; SANTOS, B.L.P.; RUZENE, D.S.; SILVA, D.P. An overview of current research and developments in biosurfactants. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 100, p. 1-18, 2021.

WILLIAMS W.; TRINDADE, M. Metagenomics for the discovery novel biosurfactants. *In*: CHARLES, T.C.; LILES, M.R.; SESSITSCH, A. **Functional Metagenomics: Tools and Applications**. Switzerland: Springer Nature, 2017. p. (1-253).

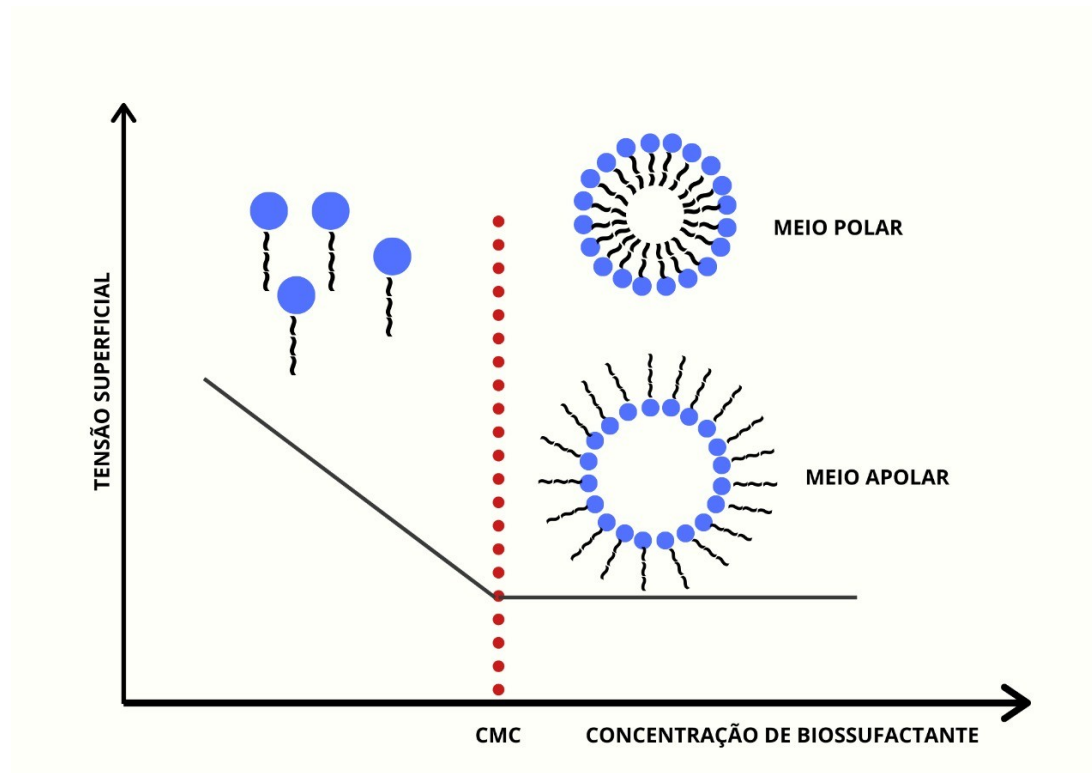
CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 SURFACTANTES

Surfactantes são moléculas anfifílicas, ou seja, possuem em sua estrutura uma porção hidrofílica (afinidade por grupos polares) e outra hidrofóbica (afinidade por grupos apolares) (INÈS; DHOUBA, 2015), o que lhes confere diversas propriedades em apenas uma molécula, podendo apresentar capacidade de redução da tensão superficial, tendência a formar micelas com solventes, ação espumante, antiespumante e emulsificante, permitindo sua solubilidade em compostos polares e apolares. Tais características estão fortemente ligadas à sua estrutura química (KNEPPER; BERNA, 2003).

A formação de micelas está fortemente relacionada à natureza do surfactante, força iônica e temperatura, sendo a concentração micelar crítica (CMC), a menor concentração do surfactante para a formação de micelas estáveis, reduzindo a tensão superficial e interfacial entre duas fases fluidas com diferentes graus de polaridade (Figura 1.1) (CAMPOS et al., 2013; SANTOS et al., 2016). Esses compostos podem ser sintetizados a partir de microrganismos, gorduras animais, plantas e óleos, porém, atualmente a maior parte produzida e comercializada ainda é derivado da indústria petroquímica (AKBARI et al., 2018; RUFINO et al., 2014).

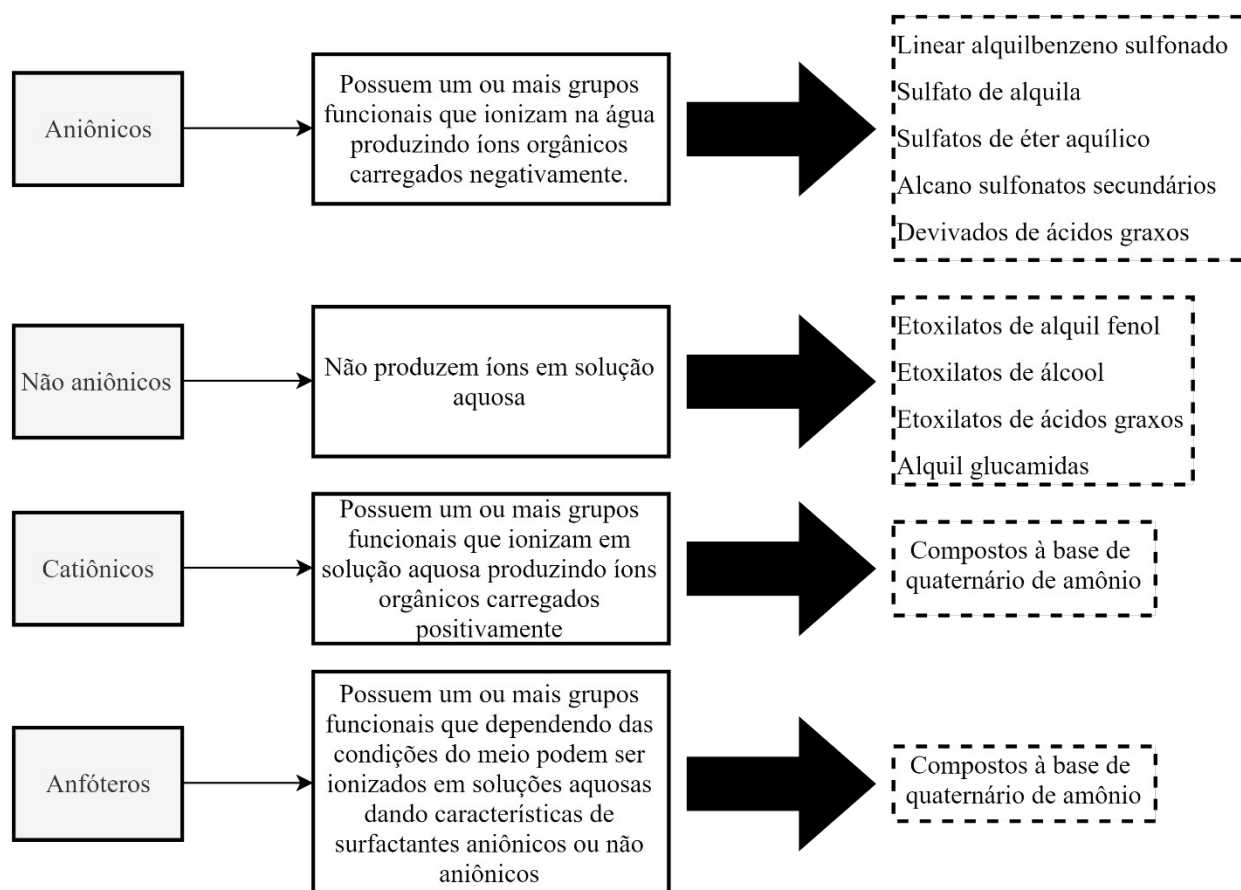
Figura 1.1. Esquema representativo da formação de micelas.



Fonte: modificado de SANTOS et al. (2016).

Os surfactantes sintéticos, são categorizados em quatro grupos principais de acordo com a carga de sua porção polar, sendo: aniônicos, não-iônicos, catiônicos e anfóteros (Figura 1.2) (KNEPPER; BERNA, 2003; GAUDIN et al., 2019).

Figura 1.2. Classificação de surfactantes e seus principais exemplos.



Fonte: autoria própria

Estes surfactantes são amplamente utilizados, sendo encontrados em praticamente todos os setores industriais e em muitos produtos de consumo como detergentes, produtos de limpeza, produtos farmacêuticos, tintas, têxteis, cosméticos, formulações de pesticidas e agrotóxicos (MUNGRAY ; KUMAR, 2009; YING, 2006). Surfactantes catiônicos como os compostos de quaternário de amônio, por exemplo, são utilizados em desinfetantes devido sua ação antimicrobiana, pois agem diretamente na parede celular de bactérias e membrana plasmática de leveduras (MCDONNELL; RUSSELL, 1999).

Segundo o Comitê Europeu de Surfactantes Orgânicos e seus Intermediários (CESIO), no ano de 2021 foram produzidos mais de 3 milhões de toneladas de surfactantes na Europa Ocidental gerando uma rotatividade estimada de € 4,4 bilhões para as indústrias (CESIO, 2023).

Linear alquilbenzeno sulfonado (LAS) é o surfactante sintético aniônico mais utilizado, presente como ingrediente ativo em detergentes de diversos ramos industriais e de uso doméstico e é encontrado em praticamente todos os resíduos gerados onde é aplicado (MUNGRAY; KUMAR, 2009; BUDIKANIA et al., 2017). Sua presença principalmente em cursos d'água, dependendo das concentrações em que se encontra pode causar danos e/ou riscos a organismos terrestres e aquáticos (PALMER; HATLEY, 2018).

A grande problemática do amplo uso dos surfactantes sintéticos está desde a sua produção até o seu descarte, onde esses resíduos químicos são liberados em estações de tratamento de esgoto, em cursos d'água, em sedimentos, podendo ser dispersados para vários ambientes e impactando-os dependendo da sua concentração final (YING, 2006; MUNGRAY; KUMAR, 2009). É um dos contaminantes mais problemáticos em processos de tratamento de águas residuárias (PALMER; HATLEY, 2018).

O uso dos surfactantes sintéticos tem causado impactos negativos no meio ambiente, (HERA, 2013), porém o efeito tóxico de cada surfactante pode variar de acordo com sua concentração e com o tipo de organismo em que é afetado. Valores de toxicidade de LAS para a espécie de molusco *Physa acuta* varia de 9,2 a 26 mg/L, já para espécies de crustáceos *Artemia salina* este valor é de 38,7 a 48,5 mg/L ao passo que para a microalga *Raphidocelis subcaptata* o composto é seguro até a concentração de 112,4 mg/L (LIWARSKA-BIZUKOJC et al., 2005). Já para a espécie de peixe *Oreochromis niloticus* a concentração letal de um detergente doméstico contendo LAS em sua composição foi de 10 mg/L (GOUDA et al., 2022). Em estudo conduzido por Franco-Belussi et al. (2020), a concentração de LAS considerada ambientalmente segura no Brasil de 0,5 mg/L exerceu efeitos negativos sobre o fígado de girinos da espécie *Lithobates catesbeianus* expostos, gerando alterações morfológicas, metabólicas e histopatológicas. Além da sua concentração no ambiente, a toxicidade do surfactante também depende do grau de etoxilação e do comprimento de sua cadeia (LECHUGA et al., 2016). Surfactantes não aniônicos derivados de óxido de amina (OA) com diferentes comprimentos na cadeia alquil, OA-R₁₂ e OA-R₁₄, por exemplo, podem ser considerados tóxico e muito tóxico para *Vibrio fischeri* respectivamente (FERNÁNDEZ-SERRANO et al., 2014). No solo os surfactantes são altamente adsorvidos (catiônicos > não aniônicos > aniônicos), podendo ser solubilizados em água e aumentando a absorção de hidrocarbonetos nos sedimentos, o que pode afetar diferentes plantações (YING, 2006).

1.2 BIOSSURFACTANTES

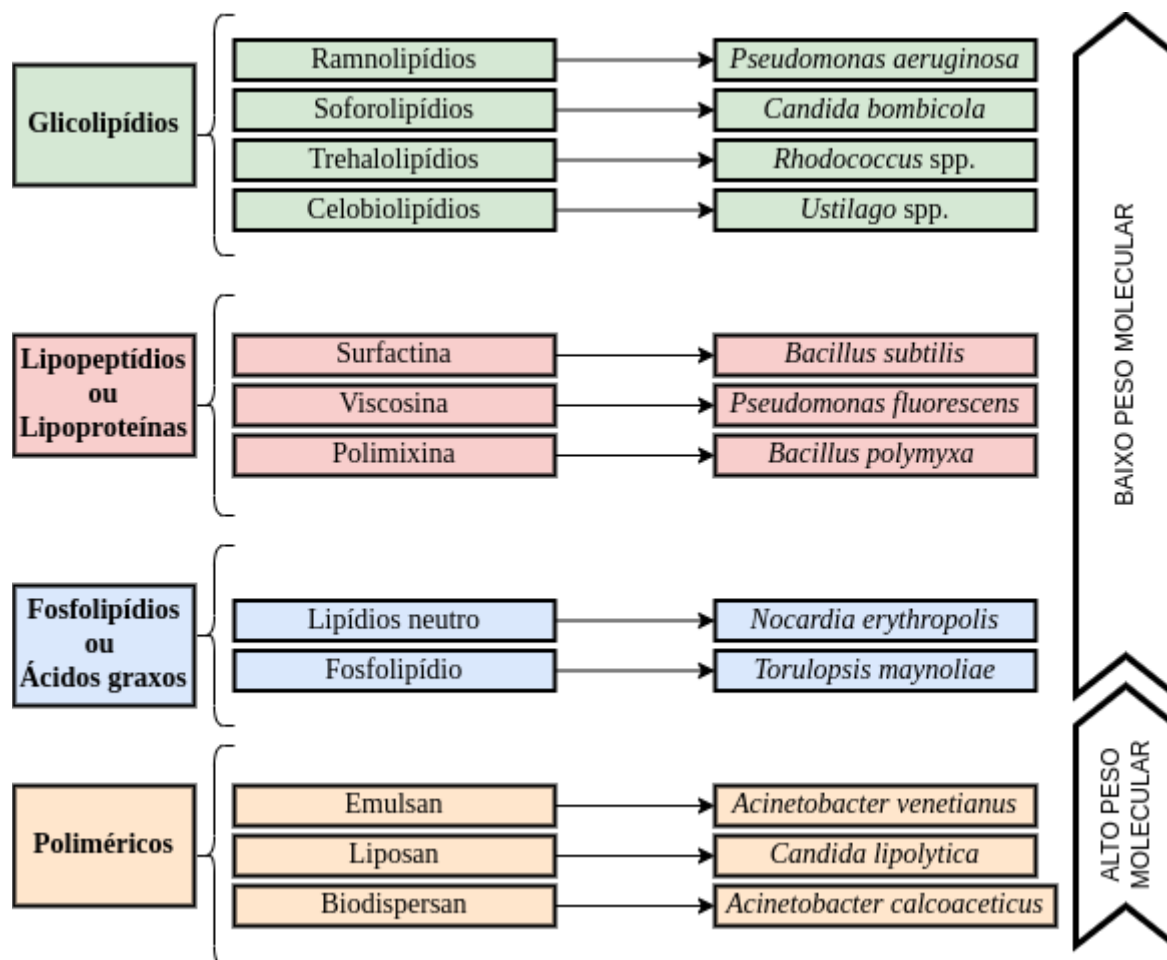
Como alternativa aos surfactantes sintéticos, os biossurfactantes representam uma forma de produção mais limpa e conseqüentemente, a redução da utilização de petróleo e seus derivados nas indústrias deste setor. São compostos que apresentam propriedades tensoativas, semelhantes aos sintéticos, mas são de origem biológica (GUTNICK; BACH, 2017). Biossurfactantes naturais, as saponinas, são compostos do metabolismo secundário de alguns vegetais e considerados bons formadores de espumas, são aniônicos e encontrados em diversas plantas tais como quinoa, soja, maçã, batata, plantas medicinais entre outras. Possuem propriedades anticoagulantes, anti-carcinogênicas e anti-inflamatórias tanto *in vivo* como *in vitro* (RAO; GURFINKEL, 2000; PUTRO et al., 2019).

Os biossurfactantes de origem microbiana, são metabólitos secundários produzidos por uma gama de microrganismos (bactérias, leveduras e fungos filamentosos) geralmente na fase estacionária de crescimento e apresentam vantagens quando comparados aos sintéticos: baixa toxicidade, alta biodegradabilidade (reduzindo os níveis de poluição), seletividade e biocompatibilidade com diversos substratos, biodisponibilidade, aplicabilidade em um amplo espectro de pH, temperatura e salinidade, além disso, podem apresentar atividade antimicrobiana, antibiofilme, anti-adesiva e podem se ligar a metais potencialmente tóxicos, sendo considerados moléculas multifuncionais (BEZZA; CHIRWA, 2015; ALMEIDA et al., 2016; GIRI et al., 2019). Suas propriedades ampliam suas possibilidades de aplicação nos diversos setores industriais como agricultura, alimentos, cosméticos, farmacêutico, em processos biotecnológicos, biorremediação, medicina, têxteis, recuperação de águas residuárias etc.

Biossurfactantes microbianos são categorizados de acordo com sua composição química e origem microbiana, e são separados de acordo com seu peso molecular: biossurfactantes de baixo peso molecular (BBPM) e biossurfactantes de alto peso molecular (BAPM). Em geral, uma diferença entre esses dois grupos é que enquanto os BBPMs são mais eficientes em reduzir a tensão superficial, os BAPMs são mais eficientes em estabilizar emulsões (SHEKHAR; SUNDARAMANICKAM; BALASUBRAMANIAN, 2014; GUTNICK; BACH, 2017). São produzidos por diversos gêneros: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Candida*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Aureobasidium* e *Corynebacterium* (VARJANI; UPASANI, 2016; BRUMANO et al., 2017; MARTINS; MARTINS, 2018; GIRI et al., 2019) dentre outros.

Os BBPMs englobam aqueles com estruturas químicas de glicolipídios, fosfolipídios e lipopeptídios, e os BAPMs são aqueles que possuem estruturas químicas compostas de polissacarídeos associados ou não a proteínas específicas (BANAT et al., 2010; CHEN; JUANG; WEI, 2015) (Figura 1.3).

Figura 1.3. Classificação de alguns biossurfactantes microbianos de acordo com sua estrutura química e peso molecular.



Fonte: autoria própria

Ramnolipídios, biossurfactantes da classe dos glicolipídios, descobertos em 1947 e produzidos por *Pseudomonas* sp., principalmente *Pseudomonas aeruginosa* tem sido amplamente estudados e comercializados em produtos agrícolas devido sua ação fungicida, e possui aplicações em biorremediação devido suas propriedades que auxiliam na degradação de hidrocarbonetos (BANAT et al., 2010; VARJANI; UPASANI, 2016). Ramnolipídios produzidos a partir de *Burkholderia thailandensis* E264 também demonstraram atividade antimicrobiana contra espécies patogênicas de *Streptococcus oralis*, *Neisseria mucosa* e *Streptococcus sanguinis* (ELSHIKH et al., 2017). A atividade antimicrobiana de ramnolipídios tem sido estudada em diversos microrganismos patogênicos tanto nos processos industriais como em alimentos e sua ação parece estar relacionada e dependente do pH em que se encontra (FERREIRA; VIEIRA; NITSCHKE, 2019).

Um lipopeptídio bem conhecido e estudado é a surfactina, produzido por *Bacillus subtilis*, composto por sete aminoácidos, com ação antibiótica, foi primeiramente descrito como um potencial inibidor da coagulação da fibrina (NAKANO; MARAHIEL; ZUBER, 1988), possui uma

concentração micelar crítica (CMC) baixa e capacidade de diminuir a tensão superficial da água de 72 para 27 mN/m (ARIMA; KAKINUMA; TAMURA, 1968; SNOOK et al., 2009). Outras espécies de *Bacillus* são produtoras de surfactina, como *Bacillus mojavensis* que produz a surfactina Leu⁷-surfactina, que inibe o crescimento de *Fusarium verticillioides*, uma espécie de fungo endofítica tóxica para animais e aves, além de estar associado à causa de câncer de esôfago em humanos ao consumirem milho contaminado com sua toxina fumonisina (VOSS; GELINEAU-VAN WAES; RILEY, 2006; SNOOK et al., 2009).

Emulsan é um bioemulsificante produzido por *Acinetobacter venetianus* e um biosurfactante de alto peso molecular, é um complexo exopolissacarídeo (20 % v/v) e lipopolissacarídeo (80 % v/v) e forma emulsões estáveis entre óleo e água e é fortemente relacionado à degradação de hidrocarbonetos (CASTRO; PANILAITIS; KAPLAN, 2008; MERCALDI et al., 2008). Esta característica lhe confere aplicações em diversas indústrias como na produção de sabões, xampu, creme dental, além de ser importante na recuperação de petróleo (YILDIZ; KARATAS, 2018).

Quanto à toxicidade, os biosurfactantes têm apresentado significativas diferenças em relação aos sintéticos. Mono-ramnolipídios, produzidos a partir de *Pseudomonas putida* causaram toxicidade aguda baixa em *Daphnia magna* e embriões de peixe-zebra comparada aos sintéticos, e não foi precursor na indução de mutações (JOHANN et al., 2016). Considerando a avaliação de risco, muitos estudos ainda não são representativos para estabelecer dados em condições naturais, dado que os testes de toxicidade são realizados em condições controladas de laboratório e com organismos modelo (EDWARDS; LEPO; LEWIS, 2003). O glicolipídio produzido a partir de *Candida sphaerica* não apresentou toxicidade para *Artemia salina*, nem inibiu germinação de plantas como *Lactuca sativa* e *Solanum gilo* (LUNA et al., 2013). Além de apresentarem níveis mais baixos de toxicidade, os biosurfactantes também podem reduzir o efeito tóxico de outros compostos em ambientes variados, como fenóis, pois a partir de suas interações hidrofóbicas podem acumular ou reter esses compostos em suas micelas (CHRZANOWSKI et al., 2009).

Apesar das inúmeras aplicações e da versatilidade dos biosurfactantes microbianos, os maiores desafios e dificuldades na sua produção estão o custo da produção, baixo rendimento e os processos de recuperação do caldo fermentativo (ARAÚJO et al., 2019; JIMOH; LIN, 2019a).

1.3 APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DOS BIOSSURFACTANTES

Embora a produção de biosurfactantes ainda apresente desvantagens em relação aos custos, comparado à produção dos surfactantes sintéticos, diversas empresas têm voltado seus esforços na

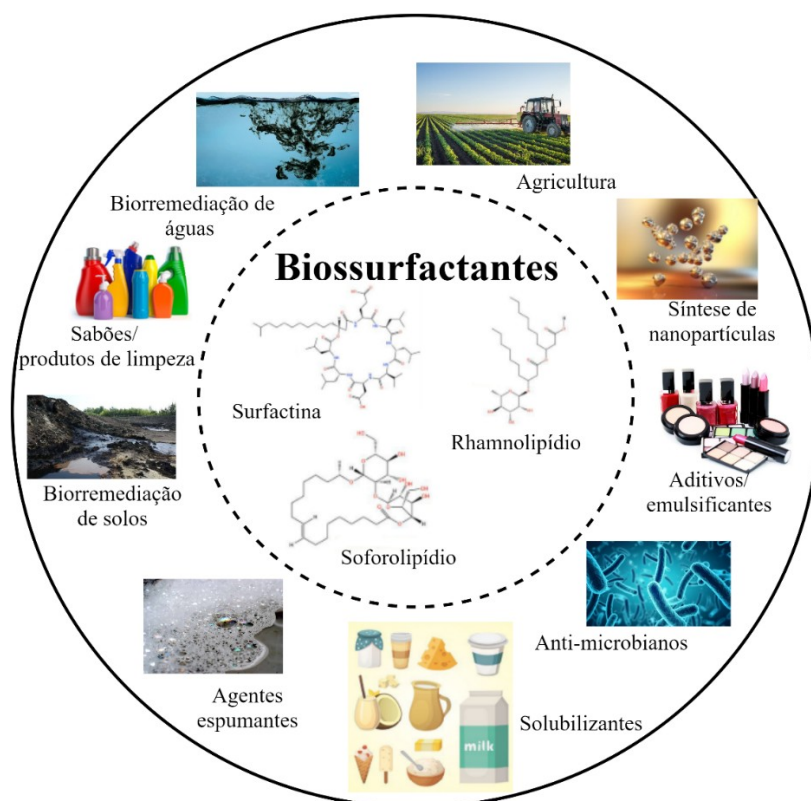
produção de compostos multifuncionais e ambientalmente favoráveis, como os biossurfactantes (Quadro 1.1) (ALMEIDA et al., 2016; JIMOH; LIN, 2019a).

Quadro 1.1. Empresas produtoras de biossurfactantes e suas principais aplicações.

Empresa	País/Matriz	Biossurfactante	Principais aplicações	Site
Jeneil Biotech Inc.	EUA	Zonix Biofungicide™	Agricultura	https://www.jeneilbiotech.com/biosurfactants
Jeneil Biotech Inc.	EUA	Ramnolipídios	Biorremediação	https://www.jeneilbiotech.com/biosurfactants
SAIFU	EUA	Caprylyl Glucoside	Cosméticos, produtos de limpeza	http://saifuusa.com/portfolio-item/mildsurfactants/
Fraunhofer IGB	Alemanha	Soforolipídios	Detergentes	https://www.igb.fraunhofer.de/en.html
Lipofabrik	França	Lipopeptídios	Cosméticos, alimentos, biorremediação etc.	http://www.lipofabrik.com/
TeeGene Biotech	Reino Unido	Lipopeptídios	Diversas	http://www.teegene.co.uk/

Devido sua multifuncionalidade, os biossurfactantes apresentam diversas características que os tornam aplicáveis em diversos setores industriais (Figura 1.4), podendo desempenhar as mais variadas funções.

Figura 1.4. Biossurfactantes e suas aplicações nos diversos setores industriais.



Fonte: autoria própria.

As propriedades emulsificantes, solubilizantes, umectantes e detergência atraem o interesse farmacêutico e de cosméticos pois estas características englobam a aplicabilidade em produtos como xampu, sabonetes, gel, cremes dentais, hidratantes, condicionadores, desodorantes e cremes em geral. O uso dos surfactantes sintéticos nesses setores exige muito cuidado pois suas formulações podem desencadear irritabilidade e alergias em consumidores, então os biossurfactantes, possuindo menor toxicidade são uma excelente alternativa (BUJAK; WASILEWSKI; ŁUKASZEWSKA, 2015; GUTNICK; BACH, 2017). Em cosméticos é muito significativa a utilização de surfactantes, pois são utilizados diversos óleos essenciais, com função antienvelhecimento e hidratação, que necessitam ser incorporados nas formulações e suas propriedades emulsificantes, conseguem estabelecer emulsões e mantê-las estáveis. *Lactobacillus paracasei* produz um biossurfactante com capacidade emulsificante estável em óleos essenciais (MASMOUDI et al., 2005; FERREIRA et al., 2017).

Em aplicações voltadas à saúde, muitos estudos relacionam a atividade antimicrobiana de rhamnolipídios, Rodrigues et al. (2006) reportaram que este biossurfactante diminuiu significativamente as taxas de formação de biofilme por *Streptococcus salivarius* (66 %) e promoveu um alto deslocamento de células aderidas (96 %) para a maioria dos microrganismos patogênicos testados, exceto para *Staphylococcus aureus* (67 %) em prótese vocal de silicone.

Ramnolipídios presentes em pomadas também podem ser efetivos no tratamento de úlceras dermatológicas, pois sua característica antimicrobiana auxilia no processo de cicatrização (PILJAC et al., 2008). Biossurfactantes obtidos de *Bacillus subtilis* VSG4 e *Bacillus* VS16 apresentaram atividades antioxidantes e antimicrobiana contra bactérias gram-negativas e gram-positivas e podem ser utilizadas em produtos biomédicos (GIRI et al., 2019).

Por ser ambientalmente favorável e possuir propriedades físico-químicas diversas, a aplicação dos biossurfactantes nos processos de biorremediação têm sido amplamente utilizados, tanto em solos quanto em ambientes aquáticos e este processo pode ocorrer em condições anaeróbias ou aeróbias, dependendo do contaminante presente (CHAKRABORTY; DAS, 2014; GUTNICK; BACH, 2017; AKBARI et al., 2018).

Metais potencialmente tóxicos, por exemplo, representam uma ameaça à saúde humana e ambiental, e a grande deposição destes causam sérios problemas e preocupações, uma vez que não são passíveis de degradação. A remoção desses metais de solos contaminados, tradicionalmente é realizada com água, ácidos orgânicos e inorgânicos, surfactantes sintéticos ou com agentes quelantes como o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (ADELEKAN; ABEGUNDE, 2011; CHAKRABORTY; DAS, 2014; DELL'ANNO et al., 2018). A remoção com biossurfactantes, ocorre através da adsorção desses metais pelas micelas dos biossurfactantes, complexando esses metais, onde permanecem fixos eletrostaticamente, podendo ser então recuperados por separação de membrana. Muitos microrganismos são capazes de produzir tais compostos, que podem ser usados na biolixiviação de metais, como *Candida sphaerica* (soforolipídio), *Torulopsis bombicola* (soforolipídio), *Pseudomonas aeruginosa* (ramnolipídio), dentre outros (DAHRAZMA; MULLIGAN, 2007; CHAKRABORTY; DAS, 2014; SARUBBO et al., 2015; LUNA; RUFINO; SARUBBO, 2016). Em solos contaminados artificialmente, ramnolipídios foram capazes de se ligar a cátions de chumbo e cádmio, numa taxa de 80 % e *Acidithiobacillus ferrooxidans* aumentaram a remoção de zinco e ferro em uma biolixiviação artificial (DIAZ et al., 2015).

Sedimentos marinhos acumulam grandes quantidades de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos principalmente devido ao descarte incorreto de resíduos industriais e ao derramamento de petróleo que ocorre em locais de exploração (DURAN; CRAVO-LAUREAU, 2016). Alguns biossurfactantes têm apresentado alto rendimento de remoção de hidrocarbonetos em ambientes contaminados, soforolipídios e ramnolipídios em especial, estão relacionados à degradação desses compostos (KANG et al., 2010; NIKOLOPOULOU et al., 2013). O glicolipídio produzido por *Candida bombicola* pode remover cerca de 70 % de compostos aromáticos (KANG et al., 2010).

A recuperação de óleos quando realizada com surfactantes sintéticos pode causar ainda mais danos ao meio ambiente, já que estes podem permanecer no meio. No entanto, atualmente, têm-se

dados bastante atenção à recuperação de petróleo com o melhor desempenho microbiano, onde são adicionados os microrganismos produtores de biossurfactantes como *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*, estes reduzem a tensão superficial do meio (superfície entre o hidrocarboneto e a matriz rochosa), promovendo a mobilização do óleo e sua conseguinte recuperação (BANAT et al., 2010; AL-WAHAIBI et al., 2014).

1.4 PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES A PARTIR DE SUBSTRATOS DE BAIXO CUSTO DE ORIGEM RENOVÁVEL

O custo de produção dos biossurfactantes em escala industrial ainda é considerado alto e muitas vezes, inviável, devido à composição dos meios de cultura com matérias-primas, problemas de otimização fermentativa e baixo rendimento e aos processos de purificação (VIEIRA et al., 2021). Porém, estratégias para a redução de custos na produção podem torná-los mais competitivos no mercado, sendo a bioconversão de resíduos de baixo custo, uma alternativa viável como substrato e sua utilização ainda reduz a carga ambiental de descartes (GAUR et al., 2022).

Uma das alternativas é a utilização de resíduos agroindustriais, que são materiais de baixo custo e que podem ser aplicados como substratos nos processos fermentativos, incluindo a produção de biossurfactantes. Vale ressaltar que os substratos devem ser avaliados antes da aplicação, pois dependendo do processo, seu valor nutricional deve ser ideal para o microrganismo a ser utilizado (MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011; KHOPADE et al., 2012).

Estes resíduos podem possuir alto teor de carboidratos ou lipídios fermentáveis e incluem diversos tipos de substratos: resíduos de óleos de fritura, melação, resíduos ricos em amido, óleos vegetais, soro de queijo, soro de leite, palha de arroz, melação de beterraba, bagaço de cana, milho, farinha de mandioca, casca de soja etc. (Tabela 1.1) (RAZA et al., 2007; NITSCHKE; COSTA; CONTIERO, 2010; MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011; SARAVANAN; VIJAYAKUMAR; NADU, 2014).

Tabela 1.1. Produção de biossurfactantes em diferentes fontes de carbono agroindustriais.

Resíduo	Microrganismo	Biossurfactante	Rendimento	Referência
Bagaço de uva	<i>Lactobacillus pentosus</i>	Biossurfactina	0,0048 g/L	RIVERA et al. (2007)
Casca de laranja	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MTCC 2297	Ramnolipídio	9,18 g/L	GEORGE; JAYACHANDRAN, (2009)
Óleo de soja	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI	Ramonolipídio	-	NITSCHKE; COSTA; CONTIERO, (2010)
Melaço de tâmara	<i>Bacillus subtilis</i> B20	-	2,29 g/L	AL-BAHRY et al. (2013)
Casca de banana	<i>Halobacteriaceae archaeon</i> AS65	Lipopeptídio	5,3 g/L	CHOOKLIN; MANEERAT, (2014)
Casca de laranja	<i>Bacillus licheniformis</i> KC710973	Lipopeptídio	1,796 g/L	KUMAR; JANARDHAN; VISWANATH, (2016)
Farinha de mandioca	<i>Serratia marcescens</i>	Polimérico	-	ARAÚJO et al. (2019)
Bagaço de cana	<i>Cutaneotrichosporon mucoides</i> UFMG-CM-Y6148	Soforolipídio	-	MARCELINO et al. (2019)
Licor de milho	<i>Rhizopus arrhizus</i> UCP1607	Glicoproteína	1,74 g/L	PELE et al. (2019)
Óleo de girassol	<i>Starmerella bombicola</i>	Soforolipídio	41,6 g/L	JADHAV; PRATAP; KALE, (2019)
Óleo de fritura	<i>Bacillus stratosphericus</i> FLU5	Lipopeptídio	-	HENTATI et al. (2019)

Óleos vegetais são uma excelente fonte de carbono lipídica e este setor industrial gera grandes quantidades de resíduos e englobam: óleo de canola, óleo de milho, óleo de girassol, óleo de coco, óleo de soja, azeite, óleo de babaçu dentre outros. Estes que podem estar refinados ou não, e são ricos em ácidos graxos, triglicerídeos, fosfato, glicolipídios, esteróis etc. (HABA et al., 2000; DUMONT; NARINE, 2007). Óleo de fritura usado é uma excelente fonte de carbono na produção de biossurfactantes, óleo de girassol usado por exemplo, é uma boa fonte para a produção de ramnolipídios a partir de *Pseudomonas aeruginosa* e soforolipídios a partir de *Candida bombicola* (HABA et al., 2000; FLEURACKERS, 2006).

Matérias-primas lignocelulósicas são uma excelente fonte para a produção de biossurfactantes, no entanto, processos de pré-tratamento nessas biomassas muitas vezes são necessários para disponibilizar os açúcares de sua matriz aos microrganismos (MARCELINO et al., 2019). A alta dificuldade de promover a hidrólise dos materiais lignocelulósicos está intrinsecamente relacionada à forte ligação entre a lignina, celulose e hemicelulose (TEMPLENTON et al., 2010).

Biomassas ricas em amido também são uma excelente fonte de nutrientes aos microrganismos, dentre elas estão principalmente, resíduos de batata (casca e polpa), mandioca, milho, arroz e além de sua utilização *in natura*, o processamento dessas geram águas residuárias que também podem representar uma alternativa como substrato na produção (RIVERA; URBINA; LÓPEZ, 2019).

Outra fonte de carbono de origem renovável para a produção de biossurfactantes é o glicerol, um subproduto gerado da fabricação do biodiesel. Em média para cada 10 kg de biodiesel produzido é gerado 1 kg de glicerol, portanto, com o aumento da produção de biodiesel é gerado um excedente de glicerol, diminuindo seu custo pelas indústrias que não conseguem absorver o montante acumulado (FONTES et al., 2008; SILVA; SOUZA; ANTERO, 2017). Segundo a EIA (*Energy Information Administration*), até 2050 a produção de biodiesel mundial chegará a 130.000 barris por dia, por isso, a conversão do glicerol em produtos de valor agregado é uma excelente solução para suprir a demanda e valorizar a indústria de biodiesel (DIKSHIT; MOHOLKAR, 2019, CHILAKAMARRY; SAKINAH; ZULARISAM, 2021).

A utilização de glicerol como fonte de carbono na produção de biossurfactantes é uma ótima alternativa em relação ao custo do processo, é ambientalmente favorável, além de ser um composto hidrofílico e tem sido utilizado em diversos estudos (Tabela 1.2) (MARTINS; MARTINS, 2018).

Tabela 1.2. Produção de biossurfactantes utilizando glicerol como fonte de carbono alternativa.

Substrato	Microrganismo	Biossurfactante	Rendimento	Referência
Glicerol	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCP0992	Ramnolipídio	8,0 g/L	SILVA et al. (2010)
Glicerol	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MSCI02	Ramnolipídio	-	SOUSA et al. (2014)
Glicerol + licor de milho	Rhizopus arrhizus UCP 1607	Glicoproteína	1,74 g/L	PELE et al. (2019)
Glicerol	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ramnolipídio	-	EHINMITOLA et al. (2018)
Glicerol	<i>Yarrowia lipolytica</i>	-	-	SILVA et al. (2020)
Glicerol	<i>Pseudozyma antarctica</i> JCM 10317	Glicolipídio	16,3 g/L	MORITA et al. (2007)
Glicerol	<i>Amycolatopsis tucumanensis</i> DSM 45259	-	-	COLIN et al. (2013)
Glicerol	<i>Brevibacterium casei</i> LS 14	Lipopeptídio	-	KUMARI et al. (2023)

O glicerol, é precursor de ácidos graxos e apresenta alta solubilidade em meio de produção de biossurfactantes, otimizando a produção com a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* UKMP14T (HAMZAH; SABTURANI; RADIMAN, 2013). Glicerol e sacarose no mesmo meio para produção, aumentaram o rendimento por *Bacillus* sp. (PEREIRA et al., 2013). Redução da tensão superficial de 72,8 mN/m para 35 mN/m e concentração micelar crítica de 25 mg/mL foram alcançadas por *Brevibacterium casei* LS14 quando glicerol foi utilizado como fonte de carbono (KUMARI et al., 2023).

O uso do glicerol como fonte de carbono têm obtido bons resultados no rendimento e produção de biossurfactante, uma vez que este substrato é utilizado pelo metabolismo central de carbono no nível de gliceraldeído-3-fosfato, não desperdiçando carbono na via das pentoses fosfato para a produção de CO₂ (NURFARAHIN; MOHAMED; PHANG, 2018).

1.5 ABORDAGEM METAGENÔMICA NA PESQUISA COM BIOSSURFACTANTES

Dada a grande quantidade de microrganismos cultiváveis capazes de produzir biossurfactantes, acredita-se que a fração não cultivável e inexplorada contenha um número ainda maior (WILLIANS e TRINDADE, 2017). Estima-se que 95-99 % da comunidade bacteriana existente na Terra é desconhecida, independentemente de sua origem (solo, ambientes marinhos, microflora intestinal, ambientes contaminados, mangue, ambientes extremos etc.), devido a dificuldades de isolamento e cultivo, o que representa grande parte do potencial genético inexplorado (JACKON et al 2015; MIRETE et al 2016; WILLIANS; TRINDADE, 2017). A

metagenômica permite identificar enzimas específicas e avaliar os mecanismos bioquímicos que ocorrem nos ambientes em que se encontram (MIRETE et al., 2016).

Ferramentas de bioinformática e *softwares* disponíveis, permitem que genomas e metagenomas de diversos ambientes sejam avaliados quanto a presença de genes de interesse (JACKSON et al., 2015), inclusive, permitem que a diversidade microbiana seja mais explorada e um amplo acesso ao conteúdo genético (KENNEDY et al., 2011). O conhecimento dessa diversidade microbiana e metabólica é de extrema importância para compreender os diversos processos que ocorrem nos ecossistemas.

Napp et al. (2018) avaliaram a partir de uma abordagem metagenômica diferentes resíduos gerados na perfuração de petróleo e seus consórcios microbianos variaram de acordo com o tipo de enriquecimento do meio, as vias metabólicas e as enzimas atuantes nessas microbiotas estavam relacionadas à degradação de hidrocarbonetos, sendo potencialmente úteis na aplicação em biorremediação no derramamento de petróleo. Guerra et al. (2018) também sugerem que amostras de perfuração de petróleo possuem microbiota associada com potencial uso em processos de biorremediação, com consórcios capazes de produzir biossurfactantes como iturinas, liqueninas e surfactina, baseado em análises metagenômicas.

A identificação e caracterização de novos genes e de novas cepas envolvidos na degradação de hidrocarbonetos e na biossíntese de biossurfactantes podem guiar estudos voltados a novas estratégias de biorremediação, além da descoberta de novos compostos antibióticos (OLIVEIRA et al., 2015).

Ferramentas e banco de dados direcionados para analisar genomas e metagenomas visando conjuntos de genes de interesse específico como biossurfactantes, auxiliam na análise de dados de forma mais rápida e eficiente. O programa antiSMASH, muito utilizado para identificar genes relacionados à biossíntese de biossurfactantes, permite uma rápida identificação e anotação de genes envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários através da integração de ferramentas de análise já publicadas anteriormente (BLIN et al., 2021). O banco de dados BioSurfDB é de domínio específico e contém 6754 genes e 6695 proteínas, relacionados à biodegradação e biossíntese de biossurfactantes (OLIVEIRA et al., 2015). Por ser totalmente específico, todas as ontologias funcionais estão organizadas, diferentemente de bancos de dados multifuncionais como o KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), que apresenta genes em vários agrupamentos diferentes, como genes de degradação que podem estar agrupados em vias de metabolismo lipídico, dificultando as análises (OLIVEIRA et al., 2017).

1.6 REFERÊNCIAS

ADELEKAN, B. A.; ABEGUNDE, K. D. Heavy metals contamination of soil and groundwater at automobile mechanic villages in Ibadan , Nigeria. **International Journal of the Physical Sciences**, v. 6, n. 5, p. 1045–1058, 2011.

AKBARI, S.; ABDURAHMAN, N. H.; YUNUS, R. M.; FAYAZ, F. Biosurfactants- a new frontier for social and environmental safety : a mini review. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 2, n. 1, p. 81–90, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biori.2018.09.001>>.

AL-BAHRY, S. N.; AL-WAHAIBI, Y. M.; ELSHA, A. E.; AL-BEMANI, A. S.; JOSHI, S. J.; AL-MAKHMARI, H. S.; AL-SULAIMANI, H. S. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 81, p. 141–146, 2013.

AL-WAHAIBI, Y.; JOSHI, S.; AL-BAHRY, S.; ELSHAFIE, A. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 114, p. 324–333, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.09.022>>.

ALMEIDA, D. G. De; CÁSSIA, R. De; DA, F. S.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SANTOS, V. A.; BANAT, I. M. Biosurfactants : Promising Molecules for Petroleum Biotechnology Advances. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–14, 2016.

ALWADANI, N.; FATEHI, P. Synthetic and lignin-based surfactants: Challenges and opportunities. **Carbon Resources Conversion**, v. 1, n. 2, p. 126–138, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.crcon.2018.07.006>>.

ANJUM, F.; GAUTAM, G.; EDGARD, G.; NEGI, S. Biosurfactant production through *Bacillus* sp. MTCC 5877 and its multifarious applications in food industry. **BIORESOURCETECHNOLOGY**, v. 213, p. 262–269, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.091>>.

ARAÚJO, H. W. C.; ANDRADE, R. F. S.; RODRÍGUEZ, D. M.; RIBEAUX, D. R.; ALVES, C. A.; TAKAKI, G. M. C. Sustainable biosurfactant produced by *Serratia marcescens* UCP 1549 and its suitability for agricultural and marine bioremediation applications. **Microbial Cell Factories**, v. 18, n. 2, p. 1–13, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12934-018-1046-0>>.

ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 31, n. 3, p. 488–494, 1968.

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. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 427–444, 2010.

BEZZA, F. A.; CHIRWA, E. M. N. Production and applications of lipopeptide biosurfactant for bioremediation and oil recovery by *Bacillus subtilis* CN2. **Biochemical Engineering Journal**, v.

101, p. 168–178, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2015.05.007>>.

BRUMANO, L. P.; ANTUNES, F. A. F.; SOUTO, S. G.; SANTOS, J. C. dos; VENUS, J.; SCHNEIDER, R.; SILVA, S. S. Biosurfactant production by *Aureobasidium pullulans* in stirred tank bioreactor: New approach to understand the influence of important variables in the process. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 264–272, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.088>>.

BUDIKANIA, T. S.; IRAWAN, C.; AFRIANI, K.; SAKSONO, N. Degradation of Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS) by using multi-Contact Glow Discharge Electrolysis (m-CGDE) and Fe²⁺ ion as Catalyst. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 5, n. 3, p. 2346–2349, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2017.04.025>>.

BUJAK, T.; WASILEWSKI, T.; ŁUKASZEWSKA, Z. N. Role of macromolecules in the safety of use of body wash cosmetics. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 135, p. 497–503, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.07.051>>.

CAMPOS, J. M.; STAMFORD, T. L. M.; SARUBBO, L. A.; LUNA, J. M. De; RUFINO, R. D.; BANAT, I. M. Microbial Biosurfactants as Additives for Food Industries via Montenegro Stamford. **Biotechnology Prog.**, v. 29, n. 5, p. 1097–1108, 2013.

CASTRO, G. R.; PANILAITIS, B.; KAPLAN, D. L. Emulsan, a tailorable biopolymer for controlled release. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 2008, p. 4566–4571, 2008.

CHAKRABORTY, J.; DAS, S. Bioremediation of Toxic Metals. In: **Microbial Biodegradation and Bioremediation**. [s.l.] Elsevier Inc., 2014. p. 165–200.

CHEN, W.; JUANG, R.; WEI, Y. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. **Biochemical Engineering Journal**, v. 103, p. 158–169, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2015.07.009>>.

CHILAKAMARRY, C.R.; SAKINAH, A.M.M.; ZULARISAM, A.W.; PANDEY, A. Glycerol waste to value added products and its potential applications. **Systems Microbiology and Biomanufacturing**, v. 1, p. 378–396, 2021.

CHOOKLIN, C. S.; MANEERAT, S. Utilization of banana peel as a novel substrate for biosurfactant production by Halobacteriaceae archaeon. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 173, p. 624–645, 2014.

CHRZANOWSKI, L.; WICK, L. Y.; MEULENKAMP, R.; KAESTNER, M.; HEIPIEPER, H. J. Rhamnolipid biosurfactants decrease the toxicity of chlorinated phenols to *Pseudomonas putida* DOT-T1E. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, p. 756–762, 2009.

COLIN, V.L.; CASTRO, M.F.; AMOROSO, M.J.; VILLEGAS, L.B. Production of bioemulsifiers by *Amycolatopsis tucumanensis* DSM 45259 and their potential application in remediation technologies for soils contaminated with hexavalent chromium. **Journal of Hazardous Materials**, v. 261, p. 577–583, 2013.

DAHRAZMA, B.; MULLIGAN, C. N. Investigation of the removal of heavy metals from

sediments using rhamnolipid in a continuous flow configuration. **Chemosphere**, v. 69, p. 705–711, 2007.

DELL'ANNO, F.; SANSONE, C.; IANORA, A.; DELL'ANNO, A. Biosurfactant-induced remediation of contaminated marine sediments: Current knowledge and future perspectives. **Marine Environmental Research**, v. 137, n. March, p. 196–205, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.03.010>>.

DIAZ, M. A.; RANSON, I. U. De; DORTA, B.; IBRAHIM, M.; BLAZQUEZ, M. L.; GONZALEZ, F.; MUÑOZ, J. A.; BALLESTER, A. Metal Removal from Contaminated Soils Through Bioleaching with Oxidizing Bacteria and Rhamnolipid Biosurfactants. **Soil and Sediment Contamination**, v. 24, 2014, p. 37–41, 2015.

DIKSHIT, P.; MOHOLKAR, V. Batch and repeated-batch fermentation for 1,3-dihydroxyacetone production from waste glycerol using free, immobilized and resting *Gluconobacter oxydans* cells. **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, p. 2455–2465, 2019.

DUMONT, M.-J.; NARINE, S. S. Soapstock and deodorizer distillates from North American vegetable oils: Review on their characterization, extraction and utilization. **Food Research International**, v. 40, p. 957–974, 2007.

DURAN, R.; CRAVO-LAUREAU, C. Role of environmental factors and microorganisms in determining the fate of polycyclic aromatic. **Federation of European Microbiological Societies**, n. July, p. 1–17, 2016.

EDWARDS, K. R.; LEPO, J. E.; LEWIS, M. A. Toxicity comparison of biosurfactants and synthetic surfactants used in oil spill remediation to two estuarine species. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, p. 1309–1316, 2003.

EHINMITOLA, E.O.; ARANSIOLA, E.F.; ADEAGBO, O.P. Comparative study of various carbon sources on rhamnolipid production. **South African Journal of Chemical Engineering**, v. 26, p. 42–48, 2018.

ELSHIKH, M.; FUNSTON, S.; CHEBBI, A.; AHMED, S.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Rhamnolipids from non-pathogenic *Burkholderia thailandensis* E264: Physicochemical characterization, antimicrobial and antibiofilm efficacy against oral hygiene related pathogens. **New BIOTECHNOLOGY**, v. 36, p. 26–36, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2016.12.009>>.

FERNÁNDEZ-SERRANO, M.; JURADO, E.; FERNÁNDEZ-ARTEAGA, A.; RÍOS, F.; LECHUGA, M. Ecotoxicological Assessment of Mixtures of Ether Carboxylic Derivative and Amine-Oxide-Based Non-ionic Surfactants on the Aquatic Environment. **Journal Surfactants Detergents**, p. 1161–1168, 2014.

FERREIRA, A.; VECINO, X.; FERREIRA, D.; CRUZ, J. M.; MOLDES, A. B.; RODRIGUES, L. R. Novel cosmetic formulations containing a biosurfactant from *Lactobacillus paracasei*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 155, p. 522–529, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.04.026>>.

FERREIRA, J. D. F.; VIEIRA, E. A.; NITSCHKE, M. The antibacterial activity of rhamnolipid

biosurfactant is pH dependent. **Food Research International**, v. 116, p. 737–744, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.09.005>>.

FLEURACKERS, S. J. J. On the use of waste frying oil in the synthesis of sophorolipids. **Eur. J. Lipid. Sci. Technol.**, v. 108, p. 5–12, 2006.

FONTES, G.C.; AMARAL, P.F.F.; COELHO, M.A.Z. Produção de biossurfactantes por levedura. **Química Nova**, v. 31 (8), p. 2091-2099, 2008.

FRANCO-BELUSSI, L.; JONES-COSTA, M.; SALLA, R.F.; DE SOUZA, B.F.S.; VIDAL, F.A.P.; DE OLIVEIRA, C.R.; SILVA-ZACCARIN, E.C.M.; ABDALLA, F.C.; DUARTE, I.C.S.D.; DE OLIVEIRA, C. Hepatotoxicity of the anionic surfactant linear alkylbenzene sulphonate (LAS) in bullfrog tadpoles. **Chemosphere**, v. 266, 2021.

GAUDIN, T.; LU, H.; FAYET, G.; BERTHAULD-DRELICH, A.; ROTUREAU, P.; POURCEAU, G.; WADOUACHI, A.; HECKE, E. Van; NESTERENKO, A.; PEZRON, I. Impact of the chemical structure on amphiphilic properties of sugar-based surfactants : A literature overview. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 270, p. 87–100, 2019.

GAUR, V.K.; SHARMA, P.; GUPTA, S.; VARJANI, S.; SRIVASTAVA, J.K.; WONG, J.W.C.; NGO, H.H. Opportunities and challenges in omics approaches for biosurfactant production and feasibility of site remediation: strategies and advancements. **Environmental Technology & Innovation**, v. 25. p. 102-132, 2022.

GEORGE, S.; JAYACHANDRAN, K. Analysis of rhamnolipid biosurfactants produced through submerged fermentation using orange fruit peelings as sole carbon source. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 158, p. 694–705, 2009.

GIRI, S. S.; RYU, E. C.; SUKUMARAN, V.; PARK, S. C. Antioxidant , antibacterial , and anti-adhesive activities of biosurfactants isolated from Bacillus strains. **Microbial Pthogenesis**, v. 132, n. September 2018, p. 66–72, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.04.035>>.

GOUDA, A.M.R.; HAGRAS, A.E.; OKBAH, M.A.; EL-GAMMAL, M.I. Influence of the linear alkylbenzene sulfonate (LAS) on hematological and biochemical parameters of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29 (2), p. 1006-1013, 2022.

GUERRA, A.B.; OLIVEIRA, J.S.; SILVA-PORTELA, R.C.B.; ARAÚJO, W.; CARLOS, A.C.; VASCONCELOS, A.T.R.; FREITAS, A.T.; DOMINGOS, Y.S.; DE FARIAS, M.F.; FERNANDES, G.J.T.; AGNEZ-LIMA, L.F. Metagenome enrichment approach used for selection of oil-degrading bacteria consortia for drill cutting residue bioremediation. **Environmental Pollution**, v. 235, p. 869-880, 2018.

GUTNICK, D L; BACH, H. Biosurfactants. In: **Reference Module in Life Sciences**. [s.l.: s.n.] HABA, E.; ESPUNY, M. J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 379–387, 2000.

HABA, E.; ESPUNY, M.J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **Journal of**

Applied Microbiology, v. 88 (3), p. 379-387, 2000.

HAMZAH, A.; SABTURANI, N.; RADIMAN, S. Screening and Optimization of Biosurfactant Production by the Hydrocarbon-degrading Bacteria. **Sains Malaysiana**, v. 42, n. 5, p. 615–623, 2013.

HENTATI, D.; CHEBBI, A.; HADRICHE, F.; FRIKHA, I.; RABANAL, F.; SAYADI, S. Production , characterization and biotechnological potential of lipopeptide biosurfactants from a novel marine *Bacillus stratosphericus* strain FLU5. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 167, p. 441–449, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.036>>.

HERA. Linear Alkylbenzene Sulphonate. **Human and Environmental Risk Assessment on ingredients of Household Cleaning Products**, n. 68411, 2013.

INÈS, M.; DHOUBA, G. Lipopeptide surfactants: Production , recovery and pore forming capacity. **Peptides**, v. 71, p. 100–112, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2015.07.006>>.

JACKSON, S.A.; BORCHET, E.; O’GARA, F.; DOBSON, A.D.W. Metagenomics for the discovery of novel biosurfactants of environmental interest from marine ecosystems. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 33, p. 176-182, 2015.

JADHAV, J. V; PRATAP, A. P.; KALE, S. B. Evaluation of sunflower oil refinery waste as feedstock for production of sophorolipid. **Process Biochemistry**, v. 78, p. 15–24, 2019.

JIMOH, A. A.; LIN, J. Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental sustainability. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 184, p. 109607, 2019a.

JIMOH, A.; LIN, J. Heterologous Expression of Sfp - Type Phosphopantetheinyl Transferase is Indispensable in the Biosynthesis of Lipopeptide Biosurfactant. **Molecular Biotechnology**, n. 0123456789, 2019b.

JOHANN, S.; SEILER, T-B.; TISO, T.; BLUHM, K.; BLANK, L. M.; HOLLERT, H. Mechanism-specific and whole-organism ecotoxicity of mono-rhamnolipids. **Science of the Total Environment**, p. 155-163, 2016.

KANG, S.; KIM, Y.; SHIN, J.; KIM, E. Enhanced Biodegradation of Hydrocarbons in Soil by Microbial Biosurfactant , Sophorolipid. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 780–790, 2010.

KENNEDY, J.; O’LEARY, N.D.; KIRAN, G.S.; MORRISSEY, J.P.; O’GARA, F.O.; SELVIN, J.; DOBSON, A.D.W. Functional metagenomic strategies for the discovery of novel enzymes and biosurfactants with biotechnological applications from marine ecosystems. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, p. 787-799, 2011.

KHOPADE, A.; BIAO, R.; LIU, X.; MAHADIK, K.; ZHANG, L.; KOKARE, C. Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardiosis* sp . B4. **Desalination**, v. 285, p. 198–204, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.desal.2011.10.002>>.

KNEPPER, T. P.; BERNA, J. L. Surfactants : properties , production , and environmental aspects.

Comprehensive Analytical Chemistry, 2003.

KUMAR, A. P.; JANARDHAN, A.; VISWANATH, B. Evaluation of orange peel for biosurfactant production by *Bacillus licheniformis* and their ability to degrade naphthalene and crude oil. **3 Biotech**, v. 6, n. 43, p. 2–10, 2016.

KUMARI, K.; BEHERA, H.T.; NAYAK, P.P.; SINHA, A.; NANDI, A.; GHOSH, A.; SAHA, U.; SUAR, M.; PANDA, P.K.; VERMA, S.K.; RAINA, V. Amelioration of lipopeptide biosurfactants for enhanced antibacterial and biocompatibility through molecular antioxidant property by methoxy and carboxyl moieties. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 161, p. 114-493, 2023.

LECHUGA, M.; FERNÁNDEZ-SERRANO, M.; JURADO, E.; RÍOS, F. Acute toxicity of anionic and non-ionic surfactants to aquatic organisms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 125, p. 1–8, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.11.027>>.

LIWARSKA-BIZUKOJC, E.; MIKSCH, K.; MALACHOWSKA-JUTSZ, A.; KALKA, J. Acute toxicity and genotoxicity of five selected anionic and nonionic surfactants. **Chemosphere**, v. 58, p. 1249–1253, 2005.

LUNA, J.M.; RUFINO, R.D.; SARUBBO, L.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Characterisation, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the the petroleum industry. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 202-209, 2013.

LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A. Biosurfactant from *Candida sphaerica* UCP0995 exhibiting heavy metal remediation properties. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 102, p. 558–566, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.psep.2016.05.010>>.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S.; BANAT, I. M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **AMB Express**, p. 1–19, 2011.

MARCELINO, P. R. F.; PERES, G. F. D.; TERÁN-HILARES, R.; PAGNOCCA, F. C.; ROSA, C. A.; LACERDA, T. M.; SANTOS, J. C.; SILVA, S. S. Biosurfactants production by yeasts using sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate as new sustainable alternative for lignocellulosic biore fi neries. **Industrial Crops & Products**, v. 129, p. 212–223, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.001>>.

MARTINS, P. C.; MARTINS, V. G. Biosurfactant production from industrial wastes with potential remove of insoluble paint. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 127, p. 10–16, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.11.005>>.

MASMOUDI, H.; LE, Y.; PICCERELLE, P.; KISTER, J. The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 289, p. 117–131, 2005.

MCDONNELL, G.; RUSSELL, A. D. Antiseptics and Disinfectants : Activity , Action , and Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 147–179, 1999.

MERCALDI, M. P.; DAMS-KOZŁOWSKA, H.; PANILAITIS, B.; JOYCE, A. P.; KAPLAN, D. L. Discovery of the Dual Polysaccharide Composition of Emulsan and the Isolation of the Emulsion Stabilizing Component. **Biomacromolecules**, v. 1, n. Atcc 31012, p. 1988–1996, 2008.

MIRETE, S.; MORGANTE, V.; GONZÁLEZ-PASTOR, J.E. Functional metagenomics of extreme environments. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 38, p. 143-149, 2016.

MORITA, T.; KONISHI, M.; FUKUOKA, T.; IMURA, T., KITAMOTO, D. Microbial conversion of glycerol into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by a basidiomycete yeast, *Pseudozyma antarctica* JCM 10317. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 104 (1), p. 78-81, 2007.

MUNGRAY, A. K.; KUMAR, P. Fate of linear alkylbenzene sulfonates in the environment : A review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 8, p. 981–987, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.03.012>>.

NAKANO, M. M.; MARAHIEL, M. A.; ZUBER, P. Identification of a Genetic Locus Required for Biosynthesis of the Lipopeptide Antibiotic Surfactin in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 12, p. 5662–5668, 1988.

NAPP, A.P.; PEREIRA, J.E.S.; OLIVEIRA, J.S.; SILVA-PORTELA, R.C.B.; AGNEZ-LIMA, L.F.; PERALBA, M.C.R.; BENTO, F.M.; PASSAGLIA, L.M.P.; THOMPSON, C.E.; VAINSTEIN, M.H. Comparative metagenomics reveals different hydrocarbon degradative abilities from enriched oil-drilling waste. **Chemosphere**, v. 209, p. 7-16, 2018.

NIKOLOPOULOU, M.; PASADAKIS, N.; NORF, H.; KALOGERAKIS, N. Enhanced ex situ bioremediation of crude oil contaminated beach sand by supplementation with nutrients and rhamnolipids. **Marine Pollution Bulletin**, v. 77, n. 1–2, p. 37–44, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.10.038>>.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. .; CONTIERO, J. Structure and Applications of a Rhamnolipid Surfactant Produced in Soybean Oil Waste. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 2066–2074, 2010.

NURFARAHIN, A.H.; MOHAMED, M.S.; PHANG, L.Y. Culture medium development for microbial-derived surfactants production – an overview. **Molecules**, v. 23, p. 1-26, 2018.

OLIVEIRA, J.S.; ARAÚJO, W.; SALES, A.I.L.; GUERRA, A.B.; ARAÚJO, S.C.S.; VASCONCELOS, A.T.R.; AGNEZ-LIMA, L.F.; FREITAS, A.T. BioSurfDB: knowledge and algorithms to support biosurfactants and biodegradation studies. **Database**, v. 2015, p. 1-8, 2015.

OLIVEIRA, J.S.; ARAÚJO, W.J.; FIGUEIREDO, R.M.; SILVA-PORTELA, R.C.B.; GUERRA, A.B.; ARAÚJO, S.C.S.; MINNICELLI, C.; CARLOS, A.C.; VASCONCELOS, A.T.R.; FREITAS, A.T.; AGNEZ-LIMA, L.F. Biogeographical distribution analysis of hydrocarbon degrading and biosurfactant producing genes suggests that near-equatorial biomes have higher abundance of genes with potential for bioremediation. **BMC Microbiology**, v. 17, p. 1-10, 2017.

PALMER, M.; HATLEY, H. The role of surfactants in wastewater treatment : Impact, removal and future techniques : A critical review. **Water Research**, v. 147, p. 60–72, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.09.039>>.

PELE, M. A.; RUBIO, D.; RODRIGUES, E.; SOUZA, A. F.; LUNA, M. A. C.; MONTERO, D.; ANDRADE, R. F. S.; SALES, D.; SALES, C.; BARRETO-BERGTER, E.; SANTIAGO, A. L. C. M. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Conversion of renewable substrates for biosurfactant production

by *Rhizopus arrhizus* UCP 1607 and enhancing the removal of diesel oil from marine soil. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 38, p. 40–48, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2018.12.003>>.

PEREIRA, J. F. B.; GUDIÑA, E. J.; COSTA, R.; VITORINO, R.; TEIXEIRA, J. A.; COUTINHO, J. A. P.; RODRIGUES, L. R. Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. **FUEL**, v. 111, p. 259–268, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2013.04.040>>.

PILJAC, A.; STIPCEVIC, T.; OILJAC-ZEGARAC, J.; PILJAC, G. Successful Treatment of Chronic Decubitus Ulcer with 0.1 % Dirhamnolipid Ointment. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 12, n. 3, p. 142–146, 2008.

PUTRO, J. N.; ISMADJI, S.; GUNARTO, C.; SOETAREDJO, F. E.; JU, Y. H. Effect of natural and synthetic surfactants on polysaccharide nanoparticles : Hydrophobic drug loading , release , and cytotoxic studies. **Colloids and Surfaces A**, v. 578, p. 123618, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.123618>>.

RAO, A. V; GURFINKEL, D. M. The bioactivity of saponins: triterpenoid and steroidal glycosides. **Drug Metabolism and Drug Interactions**, p. 211–236, 2000.

RAZA, Z. A.; KHAN, M. S.; KHALID, ZAFAR, M. Physicochemical and surface-active properties of biosurfactant produced using molasses by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant Physicochemical and surface-act. **Journal of Environmental Science and Health Part A**, v. 42, p. 37–41, [s.d.]

RIVERA, Á. D.; URBINA, M. Á. M.; LÓPEZ, V. E. L. y. Advances on research in the use of agro-industrial waste in biosurfactant production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 155, p. 1–18, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11274-019-2729-3>>.

RIVERA, O. M. P.; MOLDES, A. B.; TORRADO, A. M.; DOMÍNGUEZ, J. M. Lactic acid and biosurfactants production from hydrolyzed distilled grape marc. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1010–1020, 2007.

RODRIGUES, L. R.; BANAT, I. M.; MEI, H. C. Van Der; TEIXEIRA, J. A.; OLIVEIRA, R. Interference in adhesion of bacteria and yeasts isolated from explanted voice prostheses to silicone rubber by rhamnolipid biosurfactants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 470–480, 2006.

RUFINO, R. D.; LUNA, J. M. de; TAKAKI, G. M. de C.; SARUBBO, L. A. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, p. 34–38, 2014.

SANTOS, D. K. F.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A. Biosurfactants : Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 1–31, 2016.

SARAVANAN, V.; VIJAYAKUMAR, S.; NADU, T. Production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* PB3A using agroindustrial wastes as a carbon source. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 57–62, 2014.

SARUBBO, L. A.; JR, R. B. R.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SANTOS, V. A.; BANAT, I. M.;

JR, R. B. R.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SANTOS, V. A.; BANAT, I. M. Some aspects of heavy metals contamination remediation and role of biosurfactants. **Chemistry and Ecology**, v. 7540, p. 707–723, 2015.

SHEKHAR, S.; SUNDARAMANICKAM, A.; BALASUBRAMANIAN, T. Biosurfactant producing microbes and its potential applications : A Review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, p. 37–41, 2014.

SILVA, D.B.; SOUZA, B.R.; ANTERO, R.V.P. Produção biotecnológica de produtos de valor agregado utilizando glicerol residual proveniente da síntese de biosiesel. **Evidência**, v. 17(2), p. 63-86, 2017.

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 and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79(1), p. 174-183, 2010.

SNOOK, M. E.; MITCHELL, T.; HINTON, D. M.; BACON, CHARLES, W. Isolation and Characterization of Leu 7 -Surfactin from the Endophytic Bacterium *Bacillus mojavensis* RRC 101 , a Biocontrol Agent for *Fusarium verticillioides*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 4287–4292, 2009.

SOUSA, J.R.; CORREIA, J.A.C.; MELO, V.M.M.; GONÇALVES, L.R.B.; CRUZ, A.J.G. Cinética e caracterização de ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* MSIC02 utilizando glicerol como fonte de carbono. **Química Nova**, v. 37 (3), p. 431-441, 2014.

TEMPLETON, D. W.; SLUITER, J. B.; RUIZ, R. O.; SCARLATA, C. J. SLUITER, A. D. C. Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks. Review and description of methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 9043-9053, 2010.

VARJANI, S. J.; UPASANI, V. N. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by oleophilic strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514. **Bioresource Technology**, v. 222, p. 195–201, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.006>>.

VIEIRA, I.M.M.; SANTOS, B.L.P.; RUZENE, D.S.; SILVA, D.P. An overview of current research and developments in biosurfactants. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 100, p. 1-18, 2021.

VOSS, K. ; GELINEAU-VAN WAES, J. B.; RILEY, R. T. Fumonisin: current research trends in developmental toxicology. **Mycotoxin Research**, v. 22, n. 1, p. 61–69, 2006.

WILLIAMS W.; TRINDADE, M. Metagenomics for the discovery novel biosurfactants. In: CHARLES, T.C.; LILES, M.R.; SESSITSCH, A. **Functional Metagenomics: Tools and Applications**. Switzerland: Springer Nature, 2017. p. (1-253).

YILDIZ, H.; KARATAS, N. Microbial exopolysaccharides : Resources and bioactive properties. **Process Biochemistry**, v. 72, p. 41–46, 2018.

YING, G. Fate , behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. **Environment International**, v. 32, p. 417–431, 2006.

CAPÍTULO 2 - ANÁLISE INTERATIVA DE BIOSURFACTANTES EM AMOSTRAS DE FERMENTAÇÃO DE RESÍDUOS DE FRUTAS USANDO BIOSURFDB E MEGAN

Resumo

Resíduos agroindustriais, como os resíduos de frutas, são renováveis, abundantes, de baixo custo e comumente utilizados como fonte de carbono. Biosurfactantes são moléculas de crescente interesse devido suas propriedades multifuncionais, natureza biodegradável e baixa toxicidade quando comparados aos surfactantes sintéticos. Uma melhor compreensão das comunidades microbianas associadas aos resíduos, poderá ajudar na prospecção de microrganismos produtores de biosurfactantes. Neste estudo, seis amostras de resíduos de frutas, sendo laranja, manga e *mix* de frutas, foram submetidas à fermentação autóctone, de modo a promover o crescimento de sua microbiota associada, seguida de um sequenciamento metagenômico de leitura curta. Usando o *pipeline* de análise DIAMOND+MEGAN, a análise taxonômica mostrou que todas as seis amostras têm predominância de Proteobacteria, e um núcleo comum composto pelos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter* e *Escherichia*. A análise funcional indicou uma alta semelhança entre as amostras e um número significativo de leituras que estão envolvidas na biossíntese de biosurfactantes da classe lipopeptídios. A análise centrada no gene revelou *Klebsiella* como a principal atribuição para genes relacionados à biossíntese de putisolvinas. Para simplificar a visualização interativa e a exploração dos genes relacionados aos biosurfactantes em tais amostras, integramos a classificação BioSurfDB no MEGAN e disponibilizamos. Estes resultados indicam que a microbiota obtida da fermentação autóctone tem o potencial genético para a biossíntese de biosurfactantes, sugerindo que os resíduos de frutas podem fornecer uma fonte de microrganismos produtores de biosurfactantes, com aplicações nas indústrias agrícola, química, alimentícia e farmacêutica.

Palavras-chave: metagenômica, lipopeptídeos, biosurfactantes.

Abstract

Agroindustrial waste, such as fruit residues, are a renewable, abundant, low-cost, commonly-used carbon source. Biosurfactants are molecules of increasing interest due to their multifunctional properties, biodegradable nature and low toxicity, in comparison to synthetic surfactants. A better understanding of the associated microbial communities will aid prospecting for biosurfactant-producing microorganisms. In this study, six samples of fruit waste, from oranges, mangoes and mixed fruits, were subjected to autochthonous fermentation, so as to promote the growth of their associated microbiota, followed by short-read metagenomic sequencing. Using the DIAMOND+MEGAN analysis pipeline, taxonomic analysis shows that all six samples are dominated by Proteobacteria, in particular, a common core consisting of the genera *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter* and *Escherichia*. Functional analysis indicates high similarity among samples and a significant number of reads map to genes that are involved in the biosynthesis of lipopeptide-class biosurfactants. Gene-centric analysis reveals *Klebsiella* as the main assignment for genes related to putisolvins biosynthesis. To simplify the interactive visualization and exploration

of the surfactant-related genes in such samples, we have integrated the BiosurfDB classification into MEGAN and make this available. These results indicate that microbiota obtained from autochthonous fermentation have the genetic potential for biosynthesis of biosurfactants, suggesting

that fruit wastes may provide a source of biosurfactant-producing microorganisms, with applications in the agricultural, chemical, food and pharmaceutical industries.

Keywords: metagenomics, lipopeptides, biosurfactants.

2.1 INTRODUÇÃO

Os biossurfactantes são moléculas tensoativas produzidas por microrganismos e têm sido destacados como uma alternativa ambientalmente favorável, quando comparados aos surfactantes sintéticos (GUTNICK; BACH, 2011; SALEK; EUSTON, 2019) produzidos pela indústria petroquímica. Surfactantes microbianos apresentam alta degradabilidade, baixa toxicidade, seletividade, propriedades antimicrobianas e anti-adesivas, e uma aplicabilidade em amplo espectro de valores de pH, temperatura e salinidade (SANTOS et al., 2016; GIRI et al., 2019; AHMAD et al., 2021). Eles são versáteis e possuem aplicações em diversos setores industriais como farmacêutica, alimentícia, cosmética, agrícola, biorremediação, recuperação melhorada de petróleo, remoção de metais dentre outros (HONG et al., 2017; ARAÚJO et al., 2019; DRAKONTIS; AMIN, 2020).

Microrganismos produtores de biossurfactantes têm sido relatados e isolados de diversas fontes, incluindo ambientes marinhos, mangue, água, solo, lodo e frutas (KUMAR et al., 2016; NAPP et al., 2018; FELIX et al., 2019; HENTATI et al., 2019). Em particular, resíduos de frutas são importantes microhabitats naturais para uma diversidade de microrganismos devido ao seu conteúdo de matéria orgânica, baixo pH e alto conteúdo de açúcares (TRINDADE et al., 2002). Diversos estudos têm utilizado microrganismos isolados de frutas na produção de várias moléculas de interesse biotecnológico, como manitol, hidrogênio, ácidos orgânicos, biocombustíveis e biossurfactantes (ENDO, 2012; KONISHI et al., 2014; RODRÍGUEZ et al., 2017; FESSARD; REMIZE, 2019; MAZARELI et al., 2020). Além disso, resíduos de frutas e resíduos gerados a partir do processamento de frutas também podem ser utilizados como fonte de carbono renovável e de baixo custo nos processos fermentativos (ABBASI et al., 2012; AKBARI et al., 2018; FELIX et al., 2019; KAKAKHEL et al., 2021). Para permitir uma melhor exploração de tais resíduos como fonte de microrganismos úteis, uma compreensão mais clara da diversidade taxonômica e funcional desta microbiota é necessária. O sequenciamento metagenômico e a análise de bioinformática permite identificar genes de interesse específicos relacionados à produção de biossurfactantes.

Várias abordagens metagenômicas combinadas com ferramentas de bioinformática têm sido utilizadas em pesquisas com biossurfactantes (GUTIÉRREZ-CHÁVEZ; FERRARI, 2021), como AntiSMASH, projetado para a identificação, anotação funcional e análises de *clusters* de genes biossintéticos (BLIN et al., 2019). No entanto, banco de dados funcionais de uso geral como o

KEGG (KANEHISA et al., 2018) não são ideais para este propósito específico, pois tendem a focar em outros aspectos funcionais do gene como por exemplo, alguns genes relacionados à biossíntese de biossurfactantes que são classificados como antibióticos ou em outras vias metabólicas. Portanto, a utilização de banco de dados de domínio específico é vantajosa para esta finalidade (OLIVEIRA et al., 2017).

Neste trabalho, são apresentados seis conjuntos de dados metagenômicos de leitura curta, provenientes de fermentações autóctones de resíduos de frutas conduzidas em reatores em batelada. O *pipeline* DIAMOND+MEGAN (HUSON et al., 2016) foi utilizado para avaliar a diversidade microbiana presente nas amostras e para detectar e analisar genes envolvidos na biossíntese de biossurfactantes. A análise taxonômica foi conduzida no MEGAN a partir dos alinhamentos DIAMOND contra o banco de dados de referência NCBI-nr (BENSON et al., 2005). Para a análise funcional, este trabalho propõe uma nova extensão do MEGAN que permite uma análise funcional baseada no bando de dados BioSurfDB, um banco de dados de domínio específico direcionado na identificação de genes relacionados à biossíntese de biossurfactantes e biodegradação (OLIVEIRA et al., 2015). Para estabelecer firmemente a identidade taxonômica dos organismos que contém os genes relacionados à produção de biossurfactantes, foi realizada a análise centrada no gene e os *contigs* foram alinhados ao banco de dados NCBI-nt (BENSON et al., 2005) usando o modo BLASTN (ALTSCHUL et al., 1997).

As análises indicaram que as seis amostras possuem um *common core* de Gammaproteobacteria, com predominância dos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas*, *Escherichia* e *Acinetobacter*. As amostras apresentaram perfil funcional similar e um potencial para a biossíntese de biossurfactantes, especialmente lipopeptídios. Os genes relacionados à biossíntese de biossurfactantes foram predominantemente atribuídos a membros dos gêneros *Klebsiella* e *Enterobacter*, e em menor proporção à *Acinetobacter* 89 e *Stenotrophomonas*.

2.2 METODOLOGIA

2.2.1 Amostragem e fermentação dos resíduos

Os resíduos de frutas foram coletados em feiras livres localizadas na cidade de Sorocaba, São Paulo, Brasil. Os resíduos foram separados em três grupos distintos de amostras: resíduos de laranja, resíduos de manga e resíduos de *mix* de frutas (uma mistura de mamão, pera, abacate, uva, goiaba e banana). Cada amostra de fruta foi triturada e misturada antes do uso. Posteriormente, as amostras foram submetidas à uma fermentação autóctone, visando promover o crescimento da microbiota associada a esses resíduos.

Na fermentação autóctone, 12,5 g de cada substrato foi adicionado separadamente em frascos reagentes contendo 500 mL de meio de enriquecimento Luria-Bertami (LB). A fermentação autóctone ocorreu por 5 dias a 32 °C e 150 rpm, em duplicatas, totalizando seis reatores em batelada. Após a fermentação, uma alíquota foi retirada dos reatores em batelada para extração do DNA metagenômico.

2.2.2 Extração de DNA e sequenciamento metagenômico

O DNA de cada fermentação autóctone foi extraído e purificado usando o kit *PowerSoil* DNA (MoBio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante. A concentração e a qualidade do DNA extraído foi estimado utilizando o espectrofotômetro ND-200 (Nanodrop Inc, Wilmington, DE), na razão de 260/280 nm > 1,8. Para cada extração, o DNA foi sequenciado no tamanho de 2 × 150 pb usando Illumina HiSeq no Departamento de Biotecnologia Animal, Departamento de Ciência Animal (ESALQ/USP, Piracicaba, São Paulo, Brasil) seguindo as instruções do fabricante. Resultando em seis amostras nomeadas como Laranja-1, Laranja-2, Manga-1, Manga-2, Mix-1 e Mix-2. Todas as amostras continham o número de *reads* muito similar, sendo 23407430, 22989500, 24072864, 21872692 e 23704278 respectivamente.

Todo o sequenciamento foi submetido no Arquivo Europeu de Nucleotídeos (*European Nucleotide Archive*), projeto PRJEB47062 e amostras ERS7265231 (Manga-1), ERS7265232 (Manga-2), ERS7265233 (Mix-1), ERS7265234 (Mix-2), ERS7265235 (Laranja-1) e ERS7265236 (Laranja-2).

2.2.3 Representação do BioSurfDB no MEGAN

O software MEGAN permite a incorporação de classificações adicionais. Neste trabalho, foi adicionado uma nova classificação funcional no MEGAN que representa os dados fornecidos pelo banco de dados BioSurfDB (OLIVEIRA et al., 2015), que é específico em biosurfactantes de biodegradação. A partir da URLs <https://www.biosurfdb.org/api/get/pathway>, <https://www.biosurfdb.org/api/get/protein>, e https://www.biosurfdb.org/api/get/organism_pathway, foram baixados três arquivos no formato JSON a partir do BioSurfDB, os quais foram denominados *pathway.json*, *protein.json* e *organism_pathway.json* respectivamente.

O primeiro arquivo, *pathway.json*, contém informação sobre as vias, que foram analisadas para criar uma árvore de representação hierárquica básica de entidades na classificação do BioSurfDB. Esta representação utiliza identificadores inteiros para todos os nós da árvore e um

mapeamento separado desses identificadores para os nomes. A representação da árvore e o mapeamento estão disponibilizados nos arquivos biosurfdb.tre e biosurfdb.map, respectivamente.

O segundo arquivo, *protein.json*, fornece todas as entradas e sequências de proteínas que ocorrem na classificação. Este arquivo também está disponibilizado no formato *fasta*, chamado *biosurfdb.fasta*. O terceiro arquivo, *organism_pathway.json*, também foi utilizado para colocar as proteínas na representação da árvore. Como o número total de proteínas foi pequeno (~6000), suas entradas também foram adicionadas à árvore como ramificações. O arquivo baixado também foi usado para criar um mapeamento de acessos de proteínas aos identificadores de nós inteiros, disponibilizado no arquivo *acc2biosurfdb.map*.

Para permitir que o MEGAN atribua leituras a uma nova classificação, durante a “meganização” ou importação de um arquivo de alinhamento, o usuário deve especificar um arquivo de mapeamento apropriado que mapeie os acessos de sequência de referência para entidades na classificação. No caso de alinhamento com as sequências do BioSurfDB em *biosurfdb.fasta*, o arquivo de mapeamento apropriado é o *acc2biosurfdb.map*.

2.2.4 Análises DIAMOND+MEGAN

Todas as seis amostras foram alinhadas com o banco de dados NCBI-nr (BENSON et al., 2005) (baixado de <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/FASTA/nr.gz> em janeiro de 2021) usando o DIAMOND (BUCHFINK; XIE; HUSON, 2015) (versão 2.0.0, opção de alinhamento padrão). Os arquivos DAA resultantes foram “meganizados”, ou seja, submetidos a *binning* funcional e taxonômico, utilizando MEGAN (HUSON et al., 2016) (versão 6.21.2, opções padrão). Esta análise DIAMOND+MEGAN será referida como uma execução NCBI-nr.

As amostras também foram alinhadas ao arquivo de referência do BioSurfDB usando DIAMOND (opções de alinhamento padrão). Os arquivos DAA resultantes foram “meganizados” com a ajuda do arquivo de mapeamento específico do BioSurfDB *acc2biosurf.map*. Esta análise DIAMOND+MEGAN será referida como uma execução do BioSurfDB.

Perfis taxonômicos e funcionais foram exportados do MEGAN e análises estatísticas foram realizadas usando o STAMP (PARKS et al., 2014). Detalhadamente, análise de variância (ANOVA) foi conduzida para comparar os três grupos de perfis funcionais e a partir do teste de Tukey foram determinadas diferenças significativas entre as amostras. As leituras não classificadas foram removidas da análise e os resultados com $p < 0,05$ (valor de p - corrigido) foram considerados significativos.

Para determinar a taxonomia em nível de gênero das amostras, foi empregado a projeção taxonômica implementada no MEGAN. Nesse cálculo, todas as leituras atribuídas a uma classificação taxonômica mais específica que o gênero, são projetadas para um gênero apropriado, enquanto todas as leituras atribuídas a uma classificação taxonômica mais alta são projetadas para baixo nos gêneros subsequentes, na proporção ao número de leituras atribuídas a cada um desses gêneros.

2.2.5 *Análise centrada no gene*

O MEGAN fornece um algoritmo para montar todas as leituras que se alinham a uma classe específica de sequências de referência, usando montagem guiada por alinhamento de proteínas, conforme descrito em Huson et al. (2017). Para cada uma das seis amostras, foi aplicado esse algoritmo (parâmetros padrões) a genes associados a classes de Surfactante na classificação BioSurfDB.

Para a classe de biossíntese de putisolvinas, foram realizadas atribuições aos genes da proteína de choque térmico, proteína de fusão de membrana, chaperona, proteína de membrana externa, proteína de membrana integral relacionada à putisolvina e putisolvina sintetase. Para a classe de biossíntese de iturina A, biossíntese de liquenisina e biossíntese de micosubtilina, foram montados os genes para iturina A sintetase C, liquenisina sintetase A, e subunidade A e B de micosubtilina.

Os *contigs* resultantes foram alinhados ao banco de dados NCBI-nt (baixado em outubro de 2021) utilizando o BLASTN (ALTSCHUL et al., 1997) (parâmetros padrões) e os resultados foram importados para o MEGAN para realizar a análise taxonômica (parâmetros padrões, usando o megan-nucl-Jan2021, arquivo de mapeamento db). Os *heatmaps* (Figura 2.5 e Figura A2.1) são baseados no número de *contigs* atribuídos a cada táxon, para um determinado gene e para cada amostra.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 *Análise taxonômica*

Cada um dos seis conjuntos de dados metagenômicos foi sequenciado, gerando mais de 20 milhões de leituras por amostra, utilizando o sequenciador Illumina em *layout* de 2×150 pb.

Em todas as amostras, as leituras foram predominantemente atribuídas a bactérias, dado gerado a partir da execução NCBI-nr no *pipeline* DIAMOND+MEGAN. Os três filos principais foram Proteobacteria seguido por Firmicutes e Actinobacteria (Tabela 2.1). A curva de rarefação

(Figura A2.2) mostrou que o número de gêneros atingiu um patamar para cada uma das amostras, indicando que a quantidade de sequenciamento realizado foi suficiente para obter uma representação estável do conteúdo taxonômico das amostras. A análise de rarefação sugere que as amostras de Manga e Mix têm uma diversidade ligeiramente maior do que as amostras de Laranja, o que também é refletido nos índices de diversidade de Shannon-Weaver (α – diversidade) calculados a partir das atribuições em nível de gênero, que foram 2,0; 1,6; 2,0; 1,9; 0,5 e 1,0, para as amostras de Manga-1, Manga-2, Mix-1, Mix-2, Laranja-1 e Laranja-2, respectivamente. Além disso, uma análise da β -diversidade em nível de gênero (Figura A2.3) mostra que todos os pares de amostras agruparam-se.

Tabela 2.1. Porcentagem de *reads* atribuídas ao domínio bactéria e aos três principais filos.

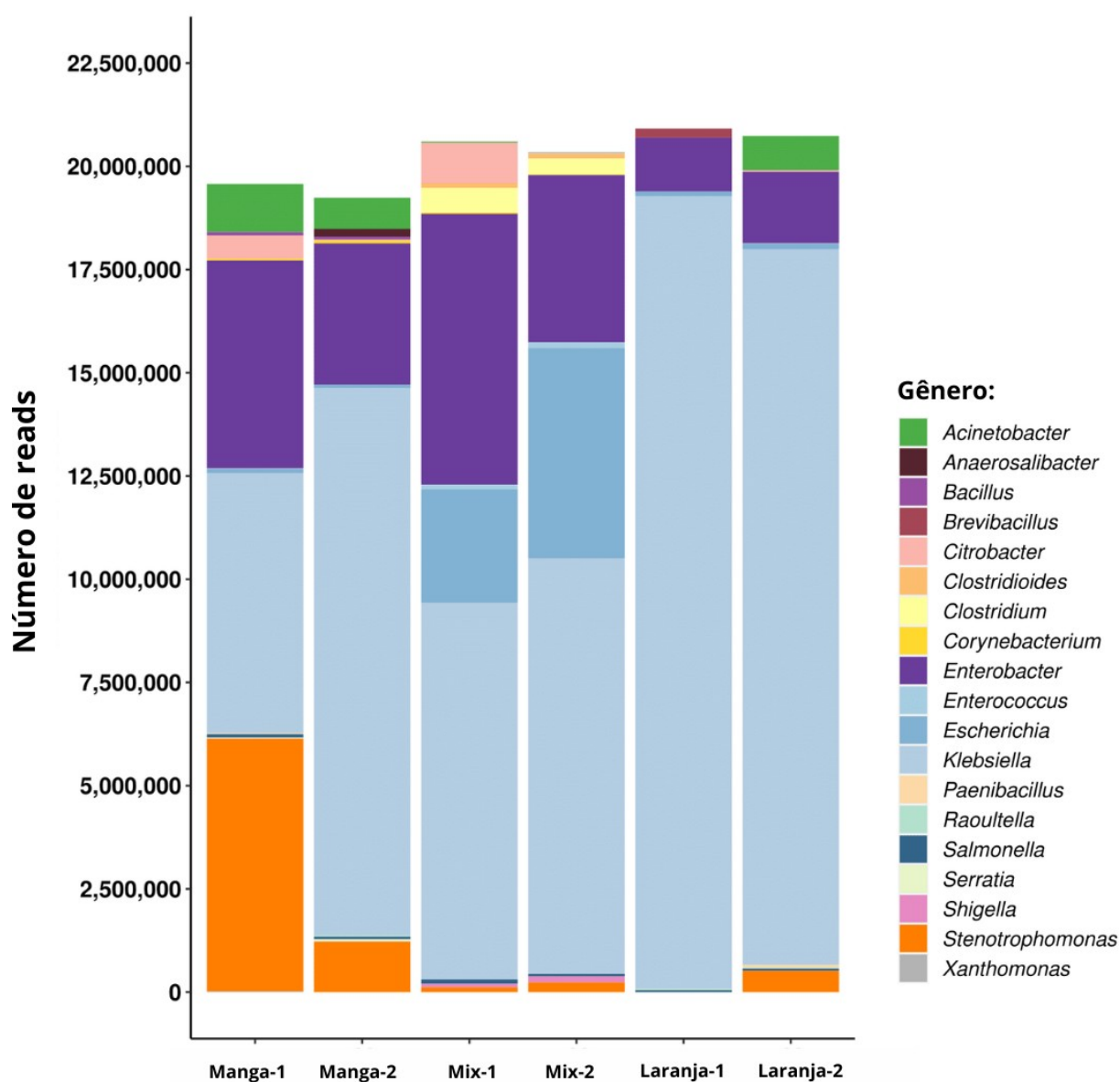
	Manga-1	Manga-2	Mix-1	Mix-2	Laranja-1	Laranja-2
Domínio						
Bactéria	99,9	99,9	99,9	99,9	99,8	99,9
Filo						
Proteobacteria	99,1	98,3	95,8	96,8	99,0	99,6
Firmicutes	0,6	1,3	4,0	3,1	1,0	0,4
Actinobacteria	0,2	0,4	0,1	0,1	0,0	0,0

A maior parte do conteúdo taxonômico das seis amostras se enquadra em 19 gêneros (Figura 2.1). *Klebsiella* foi predominante em todas as seis amostras, respondendo por 91,8 % e 83,6 % das atribuições em nível de gênero nas amostras Laranja-1 e Laranja-2, respectivamente, e com taxas de atribuição de 32,2 %, 68,9 %, 44,3 % e 49,5 %, para Manga-1, Manga-2, Mix-1 e Mix-2, respectivamente. Diferenças na proporção de leituras atribuídas a gêneros específicos foram observadas entre todas as seis amostras, o que é esperado mesmo entre as duplicatas, pois são réplicas biológicas (Tabela 2.2).

Tabela 2.2. Porcentagem relativa de *reads* atribuídas aos seis gêneros mais abundantes nas amostras de frutas.

	Manga-1	Manga-2	Mix-1	Mix-2	Laranja-1	Laranja-2
<i>Klebsiella</i>	32,2	68,9	44,3	49,5	91,8	83,6
<i>Enterobacter</i>	25,7	17,8	31,8	19,9	6,3	8,3
<i>Stenotrophomonas</i>	31,3	6,4	0,6	1,2	0,0	2,5
<i>Escherichia</i>	0,5	0,5	13,3	25,1	0,5	0,6
<i>Acinetobacter</i>	6,0	3,9	0,1	0,1	0,0	4,0
<i>Citrobacter</i>	2,9	0,1	4,8	0,2	0,0	0,2

Figura 2.1. Perfil taxonômico das seis amostras enriquecidas de frutas com atribuição de 19 gêneros.



As execuções NCBI-nr no MEGAN indicaram que as seis amostras de frutas possuem predominância de Gammaproteobacteria, com a maioria das leituras atribuídas aos gêneros *Klebsiella* (32,2-91,8 %, média 61,7 %), *Enterobacter* (6,3-31,8 %, média 18,3 %), *Stenotrophomonas* (0,0-31,3 %, média 7,0 %), *Escherichia* (0,5-21,5 %, média 6,8 %) e *Acinetobacter* (0,0-6,0 %, média 2,4 %). O primeiro, segundo e quarto gêneros foram membros da família Enterobacteriaceae, enquanto o terceiro e o último pertencem à família Lysobacteriaceae e Moraxellaceae, respectivamente.

2.3.2 Análise funcional

Os resultados das execuções do BioSurfDB do *pipeline* DIAMOND+MEGAN foram carregados no MEGAN para obter uma visão geral do potencial funcional presente nas amostras e permitir uma avaliação das abundâncias relativas de genes relacionados à biossíntese de biosurfactantes (Figura 2.2). Mais de 60 % de todas as leituras relacionadas à classe dos surfactantes foram atribuídas à biossíntese da subclasse dos lipopeptídios. Além disso, uma parcela das leituras foi alinhada a genes cruciais para a síntese de lipopeptídios não ribossomais, como surfactina, micosubitilina, iturina A, liquenisina D, bacilomicina D e fengicina (Figura 2.3).

Figura 2.2. Número de *reads* atribuídas às classes de biosurfactantes baseado no banco de dados BioSurfDB via *pipeline* DIAMOND+MEGAN.

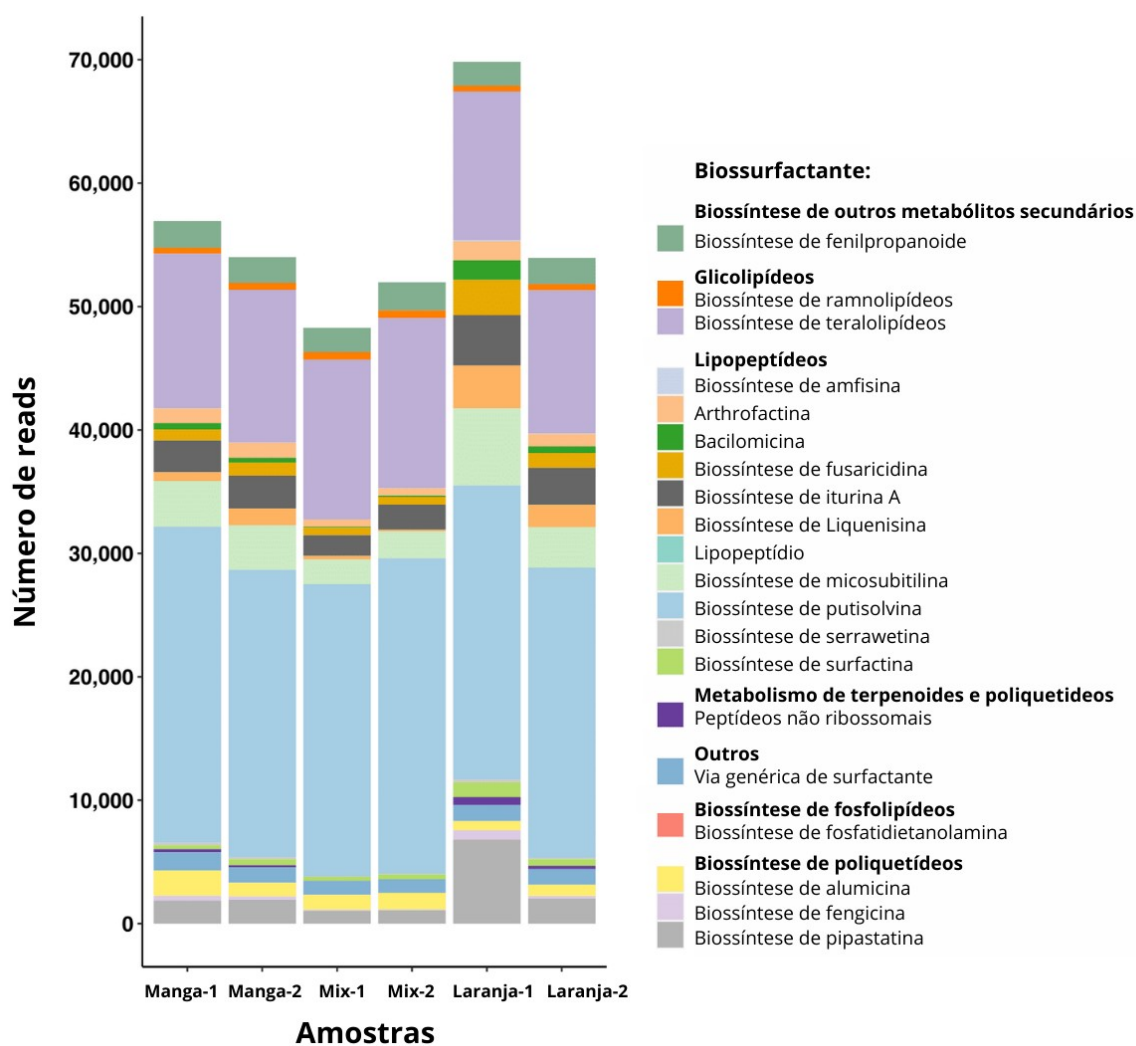
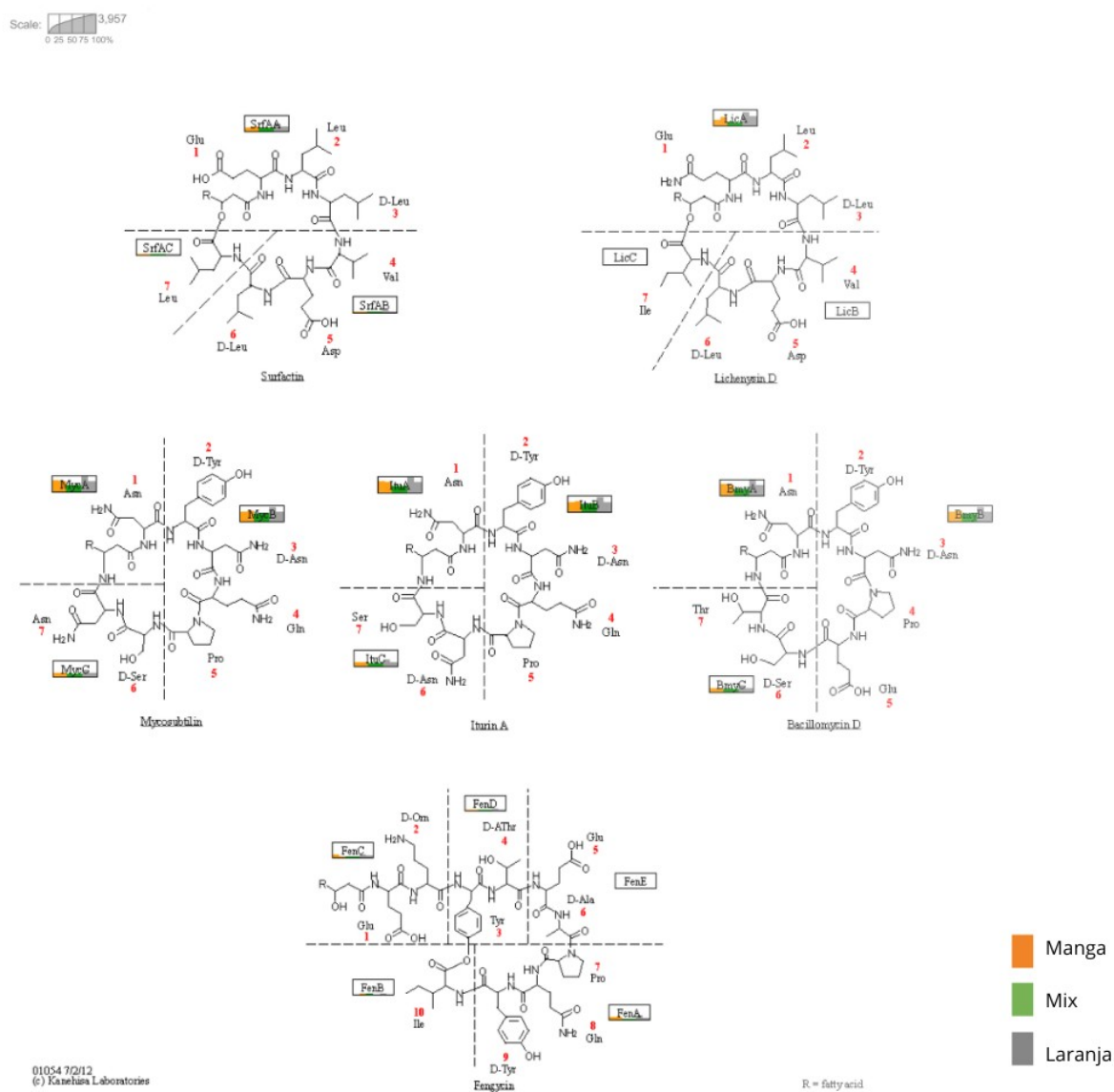
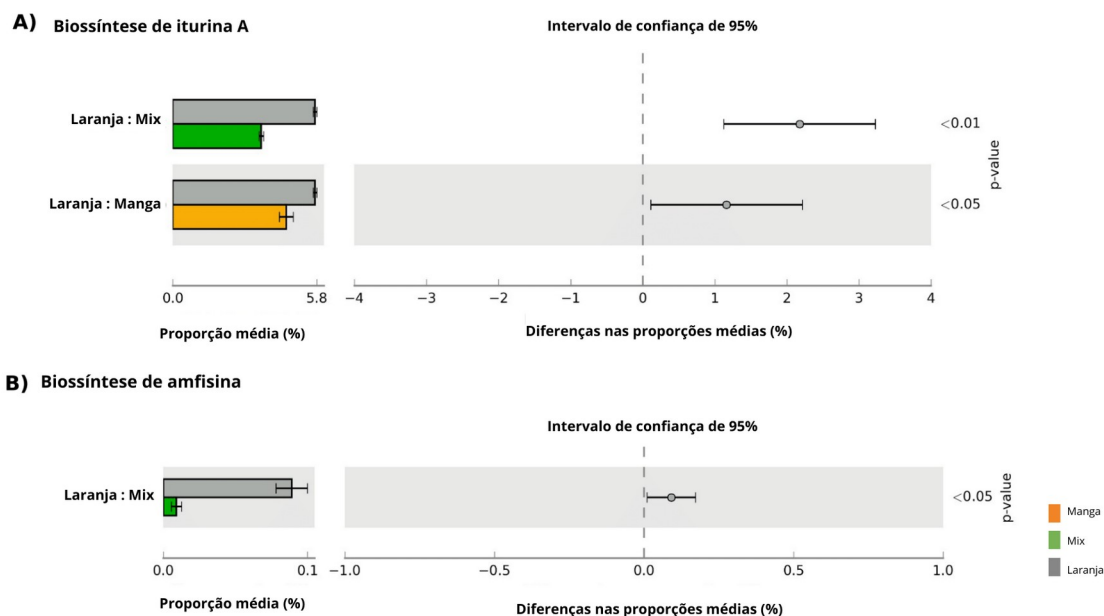


Figura 2.3. Número de leituras atribuídas a diferentes genes envolvidos na biossíntese de biosurfactantes. A ilustração é baseada na via KEGG ko01054 de estruturas peptídicas não ribossômicas (KANEHISA; SATO; FURUMICHI, 2018).



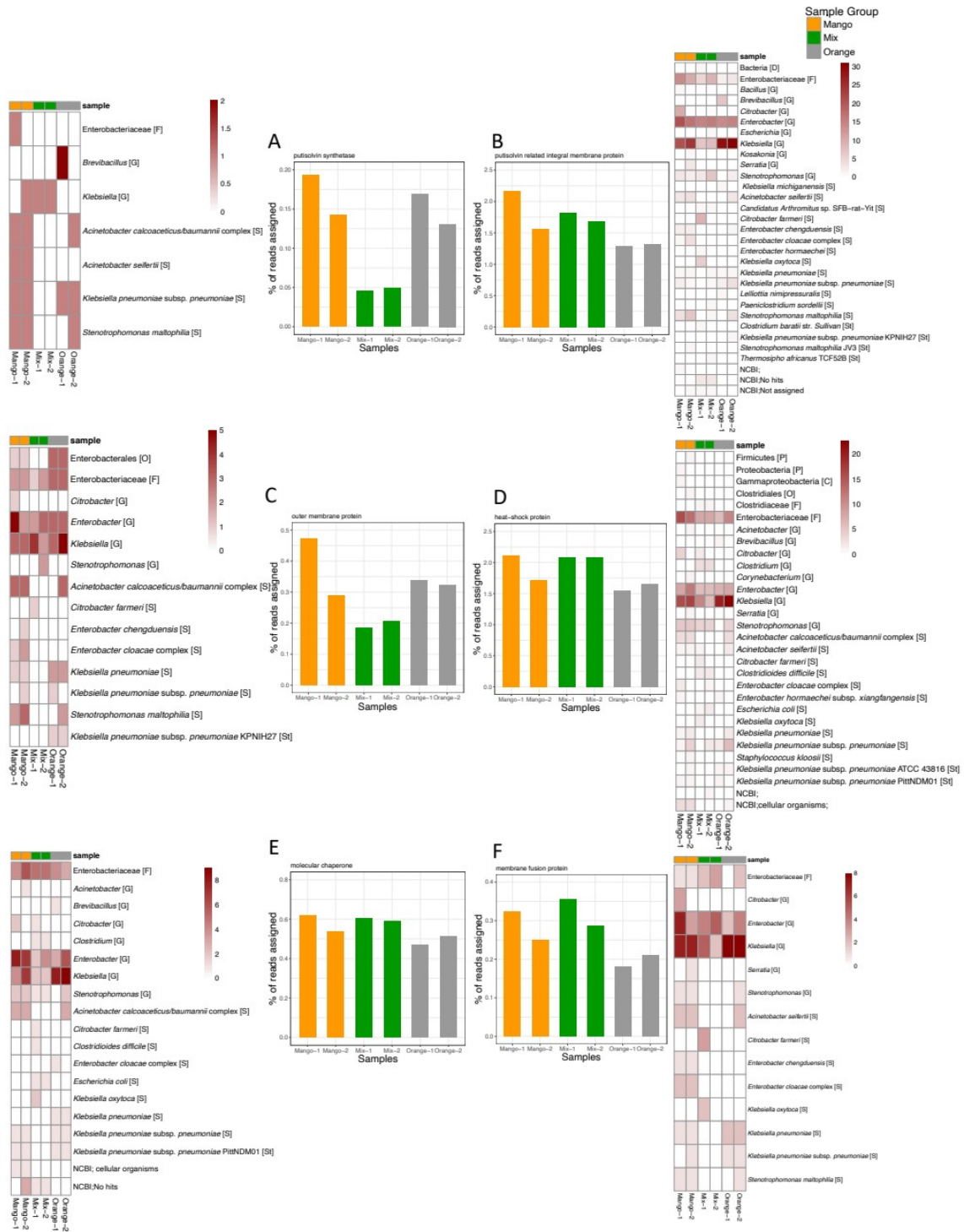
Os genes mais abundantes presentes nas amostras foram as associadas à biossíntese de putisolvinas, seguida por trealolipídios, micosubtilina e iturina A. Trealolipídios são classificados como glicolipídios, enquanto putisolvinas, micosubtilina e iturina A são considerados lipopeptídios. Diferenças significativas foram observadas apenas na classe de biossíntese de lipopeptídios: a biossíntese de iturina A (Figura 2.4a) foi mais abundante em amostras de Laranja do que em amostras de Mix e Manga e a biossíntese de anfisina (Figura 2.4b) foi mais abundante em amostras de Laranja do que em amostras de Mix.

Figura 2.4. Comparação entre os perfis funcionais das amostras de frutas. Apenas a biossíntese de iturina A (A) e a biossíntese de amfisina (B) apresentaram diferenças significativas na média das proporções de leituras atribuídas ($p < 0,05$, Tukey), computada pelo STAMP.



Para abordar a questão de quais *taxa* contém os genes relacionados à biossíntese de biosurfactantes, foi realizada a análise centrada no gene e em seguida, foi determinada sua atribuição taxonômica aos *contigs* resultantes. Para o *cluster* de genes envolvidos na biossíntese de putisolvinas, os *contigs* resultantes foram atribuídos principalmente aos gêneros do *common core* descrito acima encontrados nas amostras de frutas. A classe Gammaproteobacteria, a família Enterobacteriaceae e seus representantes *Klebsiella* e *Enterobacter* (Figura 2.5) foram os mais atribuídos. Em menor abundância, *Acinetobacter* e *Stenotrophomonas* também foram atribuídos.

Figura 2.5. Para seis genes envolvidos na biossíntese de putisolvinas representadas de A-F, foi realizada a análise centrada no gene, onde o *heatmap* ao lado de cada gene representa a quantidade de *contigs* atribuídos a uma determinada taxonomia baseado em seu alinhamento com o banco de dados NCBI-nt.



A atribuição taxonômica para *contigs* obtidos de genes envolvidos na síntese de micosubtilina, iturina A e liquenisina (Figura 2.3) foi principalmente para classes e famílias associadas ao referido *common core* encontrado nas amostras. Os gêneros *Brevibacillus*, *Klebsiella* e *Enterobacter* foram os mais atribuídos (Figura A2.2).

Esses resultados sugerem que todas as seis amostras de resíduos de frutas têm um perfil funcional semelhante relacionado à biossíntese de biossurfactantes e todas as amostras parecem ter um potencial significativo para a produção de biossurfactantes.

2.4 DISCUSSÃO

As análises sugerem que a microbiota presente nas seis amostras de frutas compartilha um *common core* formado por Gammaproteobacteria e Enterobacteriaceae é a família mais abundante. Esses resultados corroboram com estudos anteriores que relataram que Enterobacteriaceae é uma família predominante em microbiomas associados a plantas (ROY et al., 2019; ZHANG et al., 2020). *Enterobacter* e *Klebsiella* são bactérias endofíticas que estão envolvidas na sobrevivência de plantas, produção de toxinas, compostos antimicrobianos, e contribuem com a promoção do crescimento de plantas (ANDRÉS-BARRAO et al., 2017). A microbiota presente em frutas é diversa e sua composição é influenciada por práticas de manejo, uso de pesticidas, fatores externos, fases de crescimento etc (ABDELFATTAH et al., 2018). Muitos gêneros pertencentes ao filo Proteobacteria são considerados eficientes degradadores de óleos e produtores de biossurfactantes, e incluem *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella* e *Stenotrophomonas* (NITSCHKE et al., 2005; BALACHANDRAN et al., 2012; GONG et al., 2015; YADAV et al., 2015; PATEL e PATEL, 2020; AHMAD et al., 2021). Alguns destes gêneros fazem parte do *common core* da microbiota presente nas amostras de frutas do presente estudo.

Os resultados apresentados na Figura 2.2 e Figura 2.5 sugerem que os perfis funcionais da microbiota presente nas seis amostras de frutas são similares e possuem um potencial para a biossíntese de biossurfactantes, especialmente lipopeptídios. Biossurfactantes lipopeptídios são considerados potentes antimicrobianos e são capazes de romper a membrana celular (WILLIAMS; TRINDADE, 2017). Além disso, eles também exibem atividades antitumorais, imunomoduladoras, emulsificantes e sua produção também está intimamente relacionada à motilidade e formação ou inibição de biofilme (MARCELINO et al., 2017; GUTIÉRREZ-CHÁVEZ; BENAUD; FERRARI, 2021; THOMAS; DIONYSIOU; PILAI, 2021). Esses biossurfactantes são peptídios não ribossomais, sintetizados por sintetases de peptídios não ribossomais (NRPSs). Possuem estruturas diversas, e parâmetros nutricionais podem influenciar sua composição (FINKING; MARAHIEL,

2004; JOZALA, 2017). A alta ocorrência de genes relacionados à biossíntese de biossurfactantes lipopeptídios pode estar relacionado ao fato de que algumas bactérias endofíticas produzem moléculas antimicrobianas que auxiliam na proteção de plantas contra patógenos (JASIM et al., 2016; JOZALA, 2017).

Estudos anteriores relataram que os biossurfactantes putisolvinas estão associados à motilidade, à dispersão de naftaleno e cristais de fenantreno e com a quebra ou inibição de biofilmes (DUBERN; LUGTENBERG; BLOEMBERG, 2006). Sua produção depende de diversos genes regulatórios como o sistema de choque térmico DnaK e o sistema de dois componentes GacA/GacS (DUBERN; BLOEMBERG, 2006). Anteriormente, a produção deste biossurfactante foi atribuída à espécie de *Pseudomonas putida* (DUBERN; LUGTENBERG; BLOEMBERG, 2006; DUBERN; BLOEMBERG, 2006), contudo, no presente estudo estes genes foram atribuídos a *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Acinetobacter*. Esses resultados sugerem que a presença de certos genes regulatórios para metabólitos secundários foi comum a bactérias gram-negativas (DUBERN ; BLOEMBERG, 2006). O fato dessas bactérias possuírem genes envolvidos na biossíntese de putisolvinas pode direcionar estudos sobre a produção dessas moléculas e sua aplicabilidade na remoção de biofilmes.

Os gêneros *Brevibacillus*, *Klebsiella* e *Enterobacter* apresentaram os maiores números de genes atribuídos à biossíntese de iturinas. Além disso, todas as amostras possuem *reads* que se alinharam a genes envolvidos na síntese de moléculas que estão relacionadas à biossíntese de surfactina, liquenisina, micosubtilina, iturina A e bacilomicina. Tal fato, sugere que a microbiota autóctone de resíduos de frutas é uma fonte promissora de genes para a produção dessas moléculas.

Os biossurfactantes são sintetizados principalmente em resposta às condições ambientais impostas aos microrganismos, atuando em funções fisiológicas como motilidade, proteção contra toxinas, adesão a substratos e interações celulares (VAN HAMME; SINGH; WARD, 2006). A microbiota de locais contaminados com hidrocarbonetos tem sido amplamente estudada, isolada e utilizada na produção de biossurfactantes devido à capacidade desses microrganismos em utilizar fontes hidrofóbicas de carbono e, assim, desempenhar um papel na biorremediação. Este trabalho oferece uma nova perspectiva para a prospecção de microrganismos produtores de biossurfactantes, pois sugere que amostras de resíduos de frutas são uma fonte promissora de bactérias capazes de produzir biossurfactantes, principalmente lipopeptídios, que podem ter aplicação em diversos setores industriais. Ademais, o isolamento de cepas dependentes de cultivo a partir desses resíduos

de frutas pode ser útil em processos fermentativos e isso será explorado ainda mais em futuros trabalhos.

As análises determinaram perfis funcionais semelhantes direcionados à biossíntese de biossurfactantes. As amostras apresentaram contagem alta de leituras especialmente relacionados a genes envolvidos na biossíntese de lipopeptídios, sendo uma fonte potencial de novas moléculas de antibióticos e antifúngicos. Em consonância com o resultado da análise taxonômica, os resultados da análise centrada no gene mostraram que o *common core* encontrado nas amostras está diretamente relacionada aos genes de interesse.

O banco de dados de domínio específico, BioSurfDB, é um recurso essencial para detectar a presença de genes associados à biossíntese de biossurfactantes. A integração da classificação BioSurfDB ao MEGAN, permite ao usuário explorar e comparar interativamente as leituras atribuídas aos genes de biossurfactantes. Vale ressaltar que, enquanto genes de putisolvinas detectados em nossas amostras são representados no BioSurfDB por genes de referência obtidos de genomas de *Pseudomonas*, a montagem centrada nos genes e o alinhamento de DNA ao banco de dados NCBI-nt mostraram claramente que os microrganismos que contém estes genes nas seis amostras não são de *Pseudomonas*, mas sim, pertencem aos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Acinetobacter*.

2.5 REFERÊNCIAS

ABBASI, H. *et al.* Biosurfactant-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MA01 isolated from spoiled apples: physicochemical and structural characteristics of isolated biosurfactant. **J. Biosci. Bioeng.** v. 113, p. 211–219, 2012.

ABDELFATTAH, A., MALACRINO, A., WISNIEWSKI, M., CACCIOLA, S. O.; SCHENA, L. Metabarcoding: A powerful tool to investigate microbial communities and shape future plant protection strategies. **Biol. Control.** v. 120, p. 1–10, 2018.

ANDRÉS-BARRAO, C. *et al.* Complete genome sequence analysis of *Enterobacter* sp. SA187, a plant multi-stress tolerance promoting endophytic bacterium. **Front. Microbiol.** v. 8, p. 2023 2017.

AHMAD, Z. *et al.* Production, functional stability, and effect of rhamnolipid biosurfactant from *Klebsiella* sp. on phenanthrene degradation in various medium systems. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v. 207, p. 111514, 2021.

AKBARI, S., ABDURAHMAN, N. H., YUNUS, R. M., FAYAZ, F.; ALARA, O. R. Biosurfactants —a new frontier for social and environmental safety: a mini review. **Biotechnol. Res. Innov.** v. 2, p. 81–90, 2018.

ALTSCHUL, S. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.** v. 25, p. 3389–3402, 1997.

- ARAÚJO, H. W. *et al.* Sustainable biosurfactant produced by *Serratia marcescens* UCP 1549 and its suitability for agricultural and marine bioremediation applications. **Microb. cell factories** v. 18, p. 1–13, 2019.
- BALACHANDRAN, C., DURAIPANDIYAN, V., BALAKRISHNA, K. & IGNACIMUTHU, S. Petroleum and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation and naphthalene metabolism in *Streptomyces* sp. (ERI-CPDA-1) isolated from oil contaminated soil. **Bioresour. Technol.** v. 112, p. 83–90, 2012.
- BENSON, D., KARSCH-MIZRACHI, I., LIPMAN, D., Ostell, J.; WHEELER, D. Genbank. **Nucleic Acids Res** v. 1, D34–38, 2005.
- BLIN, K. *et al.* antismash 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. **Nucleic Acids Res** v. 47, W81–W87, 2019.
- BUCHFINK, B., XIE, C.; HUSON, D. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. **Nat. Methods** v. 12, p. 59–60, 2015.
- da SILVA MAZARELI, R. C. *et al.* Metagenomic analysis of autochthonous microbial biomass from banana waste: Screening design of factors that affect hydrogen production. **Biomass Bioenergy** v. 138, p. 105573, 2020.
- DRAKONTIS, C. E.; AMIN, S. Biosurfactants: Formulations, properties, and applications. **Curr. Opin. Colloid & Interface Sci.** v. 48, p. 77–90, 2020.
- DUBERN, J.-F.; BLOEMBERG, G. V. Influence of environmental conditions on putisolvins i and ii production in *Pseudomonas putida* strain pcl1445. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 263, p. 169–175, 2006.
- DUBERN, J.-F., LUGTENBERG, B. J.; BLOEMBERG, G. V. The ppuI-rsaL-ppuR quorum-sensing system regulates biofilm formation of *Pseudomonas putida* PCL1445 by controlling biosynthesis of the cyclic lipopeptides putisolvins I and II. **J. Bacteriol.** v. 188, p. 2898–2906, 2006.
- ENDO, A. Fructophilic lactic acid bacteria inhabit fructose-rich niches in nature. **Microb. ecology health disease** v. 23, p. 18563, 2012.
- FINKING, R.; MARAHIEL, M. A. Biosynthesis of nonribosomal peptides. **Annu. Rev. Microbiol.** v. 58, p. 453–488, 2004.
- FELIX, A. K. N. *et al.* Purification and characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* in cashew apple juice and its application in the remediation of oil-contaminated soil. **Colloids Surfaces B: Biointerfaces** v. 175, p. 256–263, 2019.
- FESSARD, A.; REMIZE, F. Genetic and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from tropically grown fruits and vegetables. **Int. journal food microbiology** v. 301, p. 61–72, 2019.
- GIRI, S. S., RYU, E., SUKUMARAN, V.; PARK, S. C. Antioxidant, antibacterial, and anti-adhesive activities of biosurfactants isolated from *Bacillus* strains. **Microb. Pathog.** v. 132, p. 66–72, 2019.
- GONG, Z. *et al.* Construction and optimization of *Escherichia coli* for producing rhamnolipid biosurfactant. **Chin. J. Biotechnol.** v. 31, p. 1050–1062, 2015.

GUTIÉRREZ-CHÁVEZ, C., BENAUD, N.; FERRARI, B. The ecological roles of microbial lipopeptides: Where are we going? **Comput. Struct. Biotechnol. J.** v. 19, p. 1400–1413, 2021.

GUTNICK, D.; BACH, H. 3.59 - Biosurfactants. In Moo-Young, M. (ed.) **Comprehensive Biotechnology** (Second Edition), 699–715 (Academic Press, Burlington, 2011), second edition edn.

HENTATI, D. *et al.* Production, characterization and biotechnological potential of lipopeptide biosurfactants from a novel marine *Bacillus stratosphericus* strain FLU5. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v. 167, p. 441–449, 2019.

HONG, Y.-H. *et al.* Genome sequencing reveals the potential of *Achromobacter* sp. HZ01 for bioremediation. **Front. Microbiology** v. 8, p. 1507, 2017.

HUSON, D. *et al.* MEGAN Community Edition - interactive exploration and analysis of large-scale microbiome sequencing data. **PLoS Comput. Biol** 12, e1004957 (2016). Doi:10.1371/journal.Pcbi.1004957.

HUSON, D. H. *et al.* Fast and simple protein-alignment-guided assembly of orthologous gene families from microbiome sequencing reads. **Microbiome** v. 5, 2017.

JASIM, B., SREELAKSHMI, K., MATHEW, J.; RADHAKRISHNAN, E. Surfactin, iturin, and fengycin biosynthesis by endophytic *Bacillus* sp. from *Bacopa monnieri*. **Microb. Ecol.** v.72, p. 106–119, 2016.

JOZALA, A. Fermentation processes (BoD–Books on Demand, 2017).

KAKAKHEL, M. A., ZAHEER Ud Din, S.; WANG, W. Evaluation of the antibacterial influence of silver nanoparticles against fish pathogenic bacterial isolates and their toxicity against common carp fish. **Microsc. Res. Tech.** p. 1–7, 2021.

KANEHISA, M., SATO, M., Y. and FURUMICHI, MORISHIMA, K.; TANABE, M. New approach for understanding genome variations in KEGG. **Nucleic Acids Res.** v. 47, p. D590–D595, 2018.

KONISHI, M. *et al.* Biosurfactant-producing yeasts widely inhabit various vegetables and fruits. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** v. 78, p. 516–523, 2014.

KUMAR, A. P. *et al.* Evaluation of orange peel for biosurfactant production by *Bacillus licheniformis* and their ability to degrade naphthalene and crude oil. **3 Biotech** v. 6, p. 43, 2016.

MARCELINO, P. R. F. *et al.* Biosurfactants produced by *Scheffersomyces stipitis* cultured in sugarcane bagasse hydrolysate as new green larvicides for the control of *Aedes aegypti*, a vector of neglected tropical diseases. **PLoS One** v. 12, p. e0187125, 2017.

NAPP, A. P. *et al.* Comparative metagenomics reveals different hydrocarbon degradative abilities from enriched oil-drilling waste. **Chemosphere** v. 209, p. 7–16, 2018.

NITSCHKE, M. *et al.* Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Biotechnol. progress** v. 21(5), p.1562–1566, 2005.

OLIVEIRA, J. S. *et al.* BioSurfDB: knowledge and algorithms to support biosurfactants and biodegradation studies. Database (Oxford), 2015.

- OLIVEIRA, J. S. *et al.* Biogeographical distribution analysis of hydrocarbon degrading and biosurfactant producing genes suggests that near-equatorial biomes have higher abundance of genes with potential for bioremediation. **BMC Microbiol.** v. 17, p. 1–10, 2017.
- PARKS, D. H., TYSON, G. W., HUGENHOLTZ, P.; BEIKO, R. G. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. **Bioinformatics** v. 30, p. 3123–3124, 2014.
- PATEL, K.; PATEL, M. Improving bioremediation process of petroleum wastewater using biosurfactants producing *Stenotrophomonas* sp. S1VKR-26 and assessment of phytotoxicity. **Bioresour. Technol.** v. 315, p. 123861, 2020.
- ROY, N., CHOI, K., KHAN, R.; LEE, S.-W. Culturing simpler and bacterial wilt suppressive microbial communities from tomato rhizosphere. **The Plant Pathol. J.** v. 35, p. 362, 2019.
- RUIZ RODRÍGUEZ, L. G. *et al.* Enhanced mannitol biosynthesis by the fruit origin strain *fructobacillus tropaeoli* crl 2034. **Appl. microbiology biotechnology** v. 101, p. 6165–6177, 2017.
- SAŁEK, K.; EUSTON, S. R. Sustainable microbial biosurfactants and bioemulsifiers for commercial exploitation. **Process. Biochem.** v. 85, p. 143–155, 2019.
- SANTOS, D., LUNA, J., RUFINO, R., SANTOS, V.; SARUBBO, L. Biosurfactants: multifunctional materials of the XXI century. **Int. J. Mol. Sci.** v. 17, 2016.
- THOMAS, N., DIONYSIOU, D. D.; PILLAI, S. C. Heterogeneous fenton catalysts: A review of recent advances. **J. Hazard. Mater.** v. 404, p. 124082, 2021.
- TRINDADE, R. C., RESENDE, M. A., SILVA, C. M.; ROSA, C. A. Yeasts associated with fresh and frozen pulps of brazilian tropical fruits. **Syst. Appl. Microbiol.** v. 25, p. 294–300, 2002.
- VAN HAMME, J. D., SINGH, A.; WARD, O. P. Physiological aspects: Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnol. Adv.** v. 24, p. 604–620, 2006.
- WILLIAMS, W.; TRINDADE, M. Metagenomics for the discovery of novel biosurfactants. In **Functional Metagenomics: Tools and Applications**, Springer, p. 95–117, 2017.
- YADAV, T. C., PAL, R. R., SHASTRI, S., JADEJA, N. B.; KAPLEY, A. Comparative metagenomics demonstrating different degradative capacity of activated biomass treating hydrocarbon contaminated wastewater. **Bioresour. Technol.** v. 188, p. 24–32, 2015.
- ZHANG, H. *et al.* Enterobacteriaceae predominate in the endophytic microbiome and contribute to the resistome of strawberry. **Sci. The Total. Environ.** v. 727, p. 138708, 2020.

CAPÍTULO 3 – CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA E FUNCIONAL DE GENOMAS RECUPERADOS DE METAGENOMAS (MAGs) DE AMOSTRAS DE FRUTAS ENRIQUECIDAS RELACIONADA A BIOSÍNTESE DE BIOSURFACTANTES

Resumo

Amostras de resíduos de frutas podem conter uma microbiota extensa com grande potencial genético na produção de biossurfactantes, e o objetivo deste trabalho foi recuperar genomas a partir de metagenomas (MAGs) de amostras de resíduos de laranja, manga e *mix* de frutas, caracterizar os MAGs taxonomicamente e avaliar o seu conteúdo genético relacionado à biossíntese de biossurfactantes. Foi recuperado um total de 34 MAGs, sendo 10 MAGs classificados em alta qualidade. Os MAGs de alta qualidade foram majoritariamente afiliados à classe Gammaproteobacteria e o potencial genético fortemente relacionado à biossíntese de biossurfactantes do tipo lipopeptídio. Dentre os MAGs recuperados, destacou-se o MAG OB01 de amostra de laranja, taxonomicamente caracterizado como *Brevibacillus laterosporus*, pela grande quantidade de leituras atribuídas à genes envolvidos na biossíntese de lipopeptídios. Os resultados sugerem que a microbiota associada aos resíduos de frutas analisados possuem grande potencial na produção de lipopeptídios, podendo ser testada e utilizada no processo fermentativo para a produção de biossurfactantes.

Abstract

Fruit samples contain an extensive microbiota with great genetic potential in the production of biosurfactants, and the objective of this study is to recover genomes from metagenomes (MAGs) in samples of orange, mango and fruit mix, to characterize the MAGs recovered taxonomically and evaluate their genetic content related to the biosynthesis of biosurfactants. A total of 34 MAGs were recovered, with 10 MAGs classified as high quality. The high quality MAGs showed a predominance of the Gammaproteobacteria class and the genetic potential strongly related to the biosynthesis of lipopeptide-type biosurfactants. Among the MAGs recovered, MAG OB01 from an orange sample stood out, taxonomically characterized as *Brevibacillus laterosporus*, due to the large number of readings attributed to genes involved in the biosynthesis of lipopeptides. The results suggest that the microbiota associated with the analyzed fruit residues have great potential in the production of lipopeptides, which can be tested and used in the fermentation process for the production of biosurfactants.

3.1 INTRODUÇÃO

O entendimento e o estudo de microbiomas diversos é importante para a compreensão do seu funcionamento, sua ecologia, processos evolutivos envolvidos e inferir possíveis aplicações em diversas áreas industriais ou acadêmicas. Considerando que apenas uma parte mínima de toda a diversidade microbiana é conhecida, devido ao fato da dificuldade e especificidade de isolamento e

cultivo em laboratório, a metagenômica junto com a bioinformática e o rápido desenvolvimento dos sequenciamentos de alto rendimento, permitiu o acesso a todo o conteúdo genético desconhecido, e têm trazido excelentes resultados, descobertas e aplicações, de modo a promover um maior entendimento dessas comunidades em vários ambientes, sejam eles mais raros ou mais abundantes, mais ou menos complexos (LUO et al., 2012; WILLIAMS, TRINDADE, 2017). Os dados de sequenciamento metagenômico estão expandindo significativamente a diversidade filogenética conhecida das comunidades microbianas (ZHOU; LIU; YANG, 2022).

A abordagem de recuperação de MAGs (*metagenome-assembled genomes*), que são genomas recuperados de metagenomas, têm proporcionado reconstruir genomas completos ou parcialmente completos, possibilitando inferências tanto na filogenia desses microrganismos quanto nas funções que eles desempenham onde habitam, além disso, permite a descoberta de novas vias metabólicas e seus mecanismos. Os MAGs nos ajudam a entender melhor as populações microbianas e suas interações com o ambiente em que vivem, bem como a encontrar novas espécies de microrganismos e investigar genes de interesse (ALBERTSEN et al., 2013; SETUBAL, 2021).

Há inúmeros microbiomas existentes na Terra a serem explorados, e as plantas representam grande importância devido à numerosa microbiota existente desde suas sementes, raízes até as folhas e frutos. As plantas fornecem diversos nichos ecológicos aos microrganismos que convivendo mutualisticamente, muitos desempenham funções que podem envolver a saúde e o crescimento vegetal, nutrição e proteção contra estresses bióticos e abióticos (COMPANT et al., 2019; KE; WANG; YOSHIKUNI, 2020). Além disso, essa microbiota pode variar dependendo de fatores como tipo de solo, quantidade de açúcares presentes nas partes vegetais, pH dentre outros fatores, que envolvem todo o entorno da planta e até mesmo o local específico em que o microrganismo se encontra na planta (LEVY et al., 2018).

Com o desenvolvimento demográfico, a crescente demanda por produtos agrícolas e as mudanças climáticas, o setor agrícola vêm enfrentando muitos desafios, e a busca por novos bioprodutos, formas de produção sustentável e novas aplicações biotecnológicas tornam-se imprescindíveis para melhorar a produção e formas de mitigação (COMPANT et al., 2019; PENYALVER et al., 2022). A microbiota associada às plantações agrícolas, além de diversa, possui grande potencial genético e pode ser utilizada na aplicação de novas moléculas de interesse biotecnológico, biofertilizantes e biopesticidas, entretanto, uma maior análise, exploração e prospecção dessa microbiota são cruciais. O uso de abordagens ômicas facilitam a elucidação desse

conteúdo genético inexplorado, detectando genes, proteínas e moléculas relacionadas a vários processos biológicos (LEVY et al., 2018; PENYALVER et al., 2022).

Dentre as biomoléculas de interesse biotecnológico, os biossurfactantes, surfactantes oriundos do metabolismo secundário de microrganismos, vêm sendo cada vez mais estudados devido às vantagens em relação aos sintéticos (ARAÚJO et al., 2019). Os biossurfactantes possuem propriedades que podem ser aplicadas em vários setores industriais como na biorremediação de solos e águas residuais, produtos farmacêuticos e cosméticos, no campo alimentício, limpeza, agrícola e petrolífero, além disso, possuem baixa ou nenhuma toxicidade, maior estabilidade ambiental e biodegradabilidade (ARAÚJO et al., 2019; KASHIF et al., 2022; CAROLIN et al., 2023).

As pesquisas têm mostrado que a utilização das ômicas, têm ajudado a avançar cada vez mais nos estudos com biossurfactantes. Esposito et al. (2021), analisaram o genoma completo de *Rhodococcus* sp I2R e em combinação com a metabolômica, identificaram mais de 30 novos glicolipídios com grupos funcionais incomuns e com propriedades antivirais contra o coronavírus humano, vírus da herpes e uma alta atividade antiproliferativa da linha celular do câncer de próstata PC3. A metagenômica, têm ajudado na prospecção de novos biossurfactantes e alavancou as pesquisas nesse setor (JACKSON et al., 2015, WILLIAMS; TRINDADE, 2017; GAUR et al., 2022). Silva et al. (2022) a partir de dados metagenômicos identificaram a presença de microrganismos associados a frutas potencialmente produtores de biossurfactantes, especialmente da classe lipopeptídios.

O presente trabalho teve como objetivo reconstruir MAGs, a partir de dados metagenômicos da microbiota associada a resíduos de frutas anteriormente analisados (SILVA et al., 2022), e analisar os MAGs de alta qualidade quanto à sua taxonomia e seu potencial genético em relação à produção de biossurfactantes.

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 Recuperação de genomas a partir de metagenomas (MAGs) e bioinformática

O sequenciamento metagenômico utilizado neste trabalho, foi gerado em estudo anterior por Silva et al., (2022) e os conjuntos de dados estão depositados no Arquivo Europeu de Nucleotídeos (European Nucleotide Archive), projeto PRJEB47062 e amostras ERS7265231 (Manga-1), ERS7265232 (Manga-2), ERS7265233 (Mix-1), ERS7265234 (Mix-2), ERS7265235 (Laranja-1) e ERS7265236 (Laranja-2).

A qualidade dos metagenomas foi verificada utilizando FastQC (v0.11.8) (ANDREWS, 2010) e Trimmomatic (v0.39) (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014) para retirada dos adaptadores. Para a montagem dos *contigs* foi utilizado o MEGAHIT (v1.1.4-2) (LI et al., 2016). *Contigs* obtidos menores de 1000 pb foram removidos.

Para o *binning* e o refinamento foi utilizado o programa metaWRAP (v1.3.2) (URITSKIY et al., 2018). A qualidade dos *bins* foi avaliada com o *software* CheckM (v.1.1.3) (PARKS et al., 2015) e estes foram classificados como sendo de alta qualidade (≥ 90 % completo, < 5 % de contaminação), qualidade média (≥ 50 % completo, < 10 % de contaminação) e de baixa qualidade (< 50 % completo, < 10 % de contaminação) segundo Bowers et al. (2017). A atribuição taxonômica de cada genoma foi realizada utilizando o *Genome Taxonomy Database* GTDB-Tk (versão v1.3.0 e GTDB-Tk versão r95) (PARKS et al., 2018).

A anotação funcional dos genomas foi atribuída utilizando o Banco de Dados *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) *Orthologies* (KOs) e para reconstruir as vias metabólicas foi utilizado o EnrichM v0.5.0 (<https://github.com/geronimp/enrichM>). Também foi utilizado banco de dados BioSurfDB via *pipeline* MEGAN+BioSurfDB (SILVA et al., 2022), para a prospecção de genes relacionados à produção de biossurfactantes.

Para otimizar a análise dos KOs gerados pelo KEGG, uma tabela contendo genes de interesse foi elaborada, contendo 61 genes relacionados à biossíntese de biossurfactantes. A classificação dos genes foi feita de acordo com as referências obtidas podendo ser classificados como: metabolismo de hidrocarbonetos, metabolismo de ácidos graxos, biossíntese de metabólitos secundários, metabolismo de lipídios, biossíntese de lipopolissacarídeos, biossíntese de ramnolipídios, produção de surfactina e biossíntese de fengicina (Tabela B1.1).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Recuperação de genomas a partir de metagenomas (MAGs) de amostras de frutas

A partir do metagenoma da microbiota associada aos resíduos de frutas, foi obtido um total de 34 sequências de genomas (MAGs), sendo 10 MAGs com alta completude (≥ 90), 9 genomas em qualidade média (≥ 50) e 15 genomas apresentando baixa qualidade (≥ 49) (Tabela 3.1). Nas amostras de manga foram recuperados 3 genomas em alta qualidade: MB05 - *Acinetobacter seifertii* (100 %); MB07 - *Stenotrophomonas pavanii* (100 %) e MB15 - *Anaerosalibacter* (98,25 %). Em qualidade média foi recuperado MB12 - *Corynebacterium glutamicum* (56,75 %) e 12 genomas em baixa qualidade.

Nas amostras de laranja foram obtidos 4 genomas que apresentaram alta qualidade de completude: OB12 - *Acinetobacter seifertii* (100 %); OB08 - *Stenotrophomonas pavanii* (99,86 %); OB01 - *Brevibacillus laterosporus* (93,15 %) e OB02 - *Klebsiella pneumoniae* (90,99 %). Ainda foram recuperados 2 genomas em qualidade média e 2 genomas em baixa qualidade.

Já nas amostras de *mix* de frutas os genomas de alta completude foram: MIB05 - *Clostridioides* (99,3 %); MIB09 - *Clostridium sulfidigenes* (97,77 %) e MIB01 *Stenotrophomonas maltophilia* (91,63 %). Também foram obtidos 6 genomas em qualidade média e somente 1 genoma em baixa qualidade.

Tabela 3.1. Anotação taxonômica e parâmetros obtidos após a reconstrução de genomas a partir de metagenomas (MAGs) em amostras de resíduos de manga, laranja e *mix* de frutas.

Amostra	Genoma	Tamanho do genoma (pb)	Completude^a / % GC	N50	Anotação taxonômica
Manga	MB05	4022703	100/1,004	0.38	237247 <i>Acinetobacter seifertii</i>
Manga	MB07	4501305	100/0,893	0.67	213137 <i>Stenotrophomonas pavanii</i>
Manga	MB15	2866855	98,25/1,398	0.3	32711 N/A
Manga	MB12	1995229	56,75/1,607	0.52	2294 <i>Corynebacterium glutamicum</i>
Manga	MB04	4189958	38,08/3,448	0.58	63627 <i>Klebsiella michiganensis</i>
Manga	MB14	2088640	35,51/0	0.52	7506 N/A
Manga	MB16	3870313	31,89/1,724	0.54	7030 <i>Phytobacter diazotrophicus</i>
Manga	MB06	2960043	31,37/0	0.53	148660 <i>Citrobacter amalonaticus</i>
Manga	MB13	3481299	29,1/0	0.58	9838 <i>Klebsiella</i>
Manga	MB08	1285173	27,58/1,724	0.6	2220 N/A
Manga	MB01	1073135	27,06/1,724	0.52	27108 <i>Citrobacter</i>

Continua

Amostra	Genoma	Tamanho do genoma (pb)	Completude^a / Contaminação	% GC	N50	Anotação taxonômica
Manga	MB18	777289	26,33/1,724	0.55	1968	<i>Enterobacter</i>
Manga	MB03	1280579	24,13/1,724	0.55	4008	<i>Enterobacter</i>
Manga	MB10	2611062	20,68/0	0.58	12320	<i>Enterobacter</i>
Manga	MB19	2131410	18,96/1,724	0.59	4698	<i>Klebsiella</i>
Manga	MB11	1241462	17,24/0	0.52	3266	<i>Phytobacter</i>
Laranja	OB12	3912847	100/1,004	0.38	350742	<i>Acinetobacter seifertii</i>
Laranja	OB08	4441801	99,86/0,893	0.67	44114	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>
Laranja	OB01	4262768	93,15/3,061	0.41	5273	<i>Brevibacillus laterosporus</i>
Laranja	OB02	4560698	90,99/0,83	0.58	21286	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Laranja	OB09	4205657	66,52/4,388	0.57	3904	<i>Klebsiella variicola</i>
Laranja	OB05	6149634	62,41/8,62	0.53	81349	<i>Phytobacter diazotrophicus</i>
Laranja	OB07	1747212	41,82/1,754	0.54	12666	<i>Enterobacter</i>
Laranja	OB03	6036482	40,67/5,172	0.57	8231	<i>Enterobacter himalayensis</i>
Mix	MIB05	2935278	99,3/1,048	0.3	147944	<i>Clostridioides</i> sp002390935
Mix	MIB09	3932826	97,77/2,195	0.3	156005	<i>Clostridium sulfidigenes</i>
Mix	MIB01	4074100	91,63/0,974	0.67	7679	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Mix	MIB02	4846389	89,68/2,958	0.58	50832	<i>Klebsiella variicola</i>
Mix	MIB04	3417373	78,61/3,7	0.52	26024	<i>Escherichia flexneri</i>
Mix	MIB07	3472063	72,33/6,307	0.55	47712	<i>Enterobacter himalayensis</i>

Continua

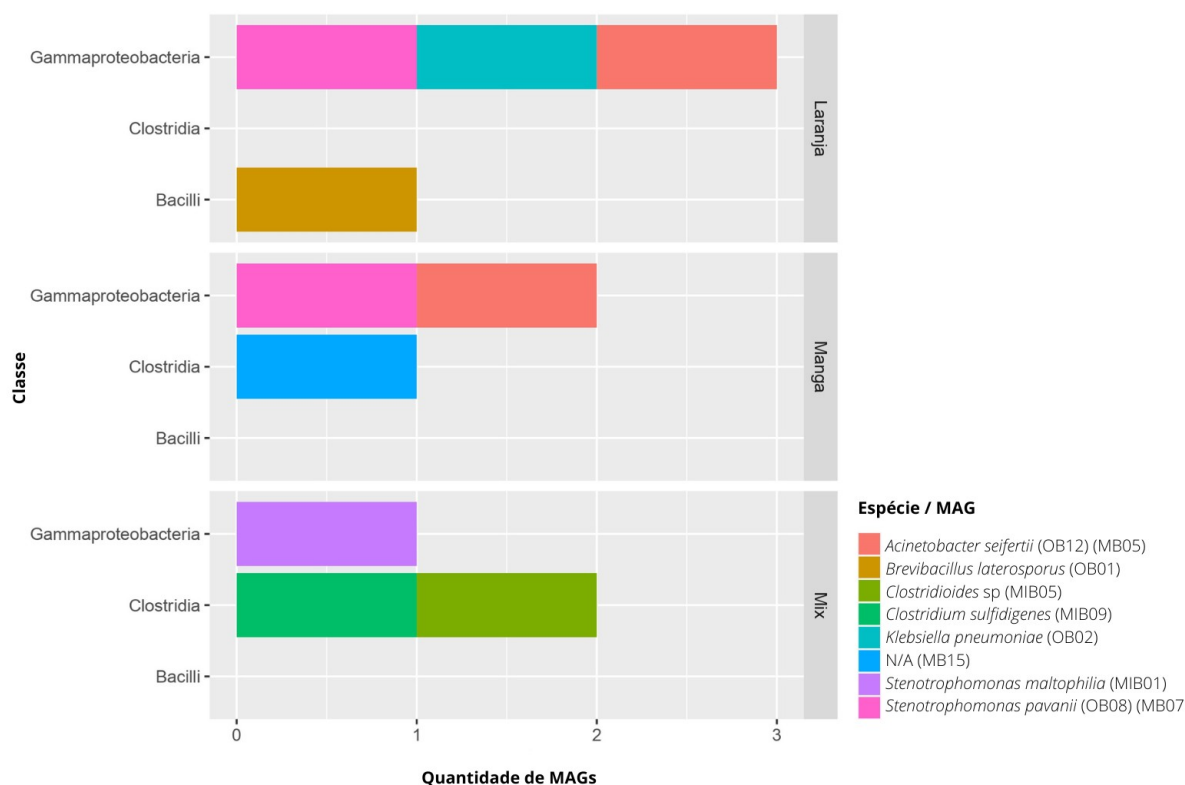
Amostra	Genoma	Tamanho do genoma (pb)	Completeness ^a / Contaminação	% GC	N50	Anotação taxonômica
Mix	MIB06	4621250	69,46/0	0.53	156151	<i>Citrobacter farmeri</i>
Mix	MIB08	5569692	68,85/1,754	0.55	121066	<i>Klebsiella oxytoca</i>
Mix	MIB11	1957713	55,12/6,307	0.38	1786	<i>Enterococcus</i>
Mix	MIB10	1052900	20,68/0	0.58	47818	<i>Enterobacter</i>

N/A: sem anotação – ^aQualidade estimada do genoma (CheckM)

Dentre os MAGs recuperados em alta qualidade, houve uma predominância da classe Gammaproteobacteria (Figura 3.1), com representantes da ordem Xanthomonadales presentes em todas as amostras e classificadas como *Stenotrophomonas pavanii*, presente na laranja (OB08) e na manga (MB07) e *Stenotrophomonas maltophilia* (MIB01) no mix de frutas; da ordem Pseudomonadales foram encontrados *Acinetobacter seifertii* (laranja-OB12 e manga-MB05) e da ordem Enterobacterales e Bacillales, foram encontrados *Klebsiella pneumoniae* (OB02) e *Brevibacillus laterosporus* (OB01) respectivamente, nas amostras de laranja.

O filo Firmicutes e seus representantes da classe Clostridia foram encontrados apenas nas amostras de mix de frutas (MIB05 e MIB09), com a espécie *Clostridium sulfidigenes* e membro do gênero *Clostridioides*. Nas amostras de manga foi encontrado o representante do gênero *Anaerosalibacter* (MB15) sem identificação de espécie por não haver representantes cultivados, sugerindo uma nova espécie. Um estudo reportado por Al-amoudi et al. (2016), sugeriu que o filo Firmicutes deve ser alvo para a bioprospecção de antimicrobianos. Além disso, utilizando a comunidade bacteriana presente em solo salino, Gao et al. (2014) demonstraram que enquanto microrganismos do filo Proteobacteria foram capazes de degradar óleos simples, representantes do filo Firmicutes foram capazes de degradar componentes recalcitrantes constituintes do petróleo bruto.

Figura 3.1. Perfil taxonômico dos 10 MAGs recuperados em alta qualidade das amostras de resíduos de frutas: laranja, manga e mix.



O perfil taxonômico dos MAGs recuperados em alta qualidade nas amostras de resíduos de frutas, possui representantes de 6 gêneros: *Acinetobacter*, *Brevibacillus*, *Klebsiella*, *Clostridium*, *Clostridioides*, *Stenotrophomonas* e *Anaerosalibacter*, todos referenciados na literatura como produtores de biossurfactantes. Espécies de *Acinetobacter* são conhecidas por produzirem biossurfactantes de alto peso molecular denominados *Emulsan* e *Alasan* (DAS et al., 2008). A linhagem isolada *Acinetobacter indicus* M6 demonstrou potencial na produção de biossurfactantes com propriedades tensoativas, emulsificantes, anti-tumoral e anti-biofilme, com estabilidade em temperatura e em pH ácido (KARLAPUD et al., 2018).

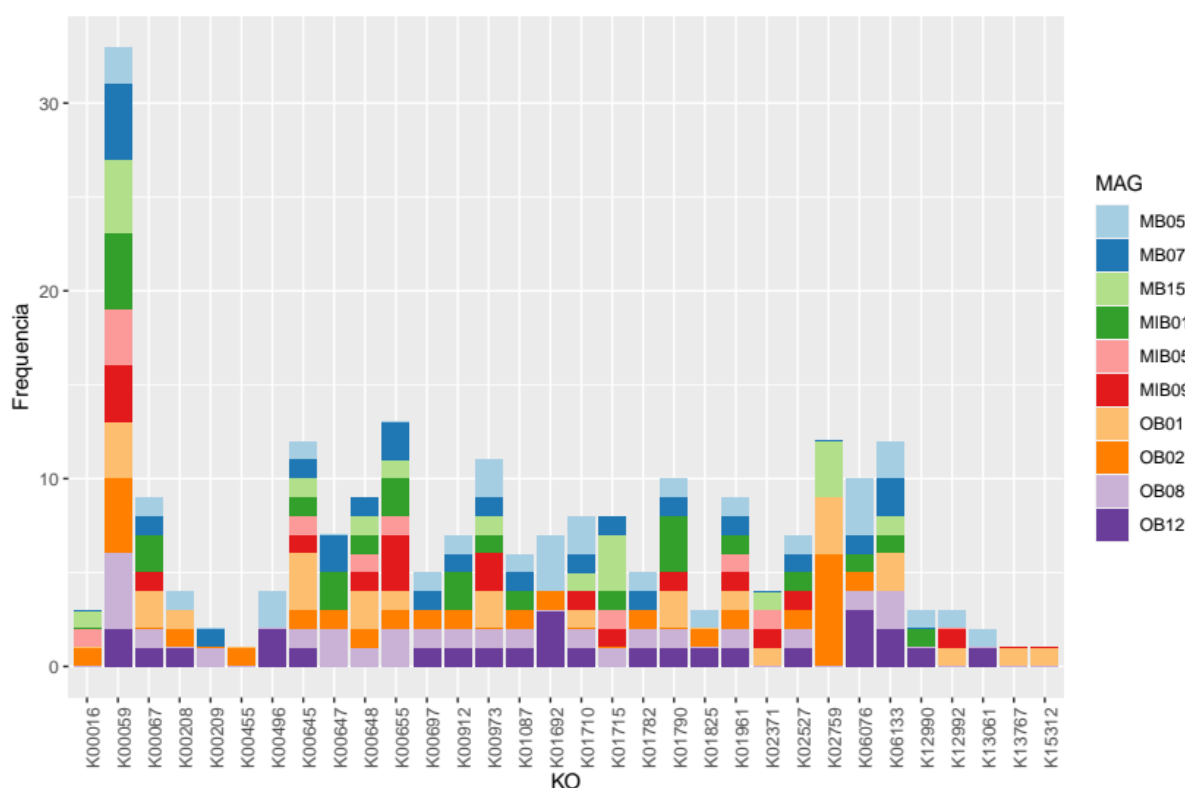
O gênero *Stenotrophomonas*, também encontrado nos MAGs, também já foi relatado em vários trabalhos como produtor de biossurfactantes. A cepa *Stenotrophomonas* sp. S1VKR-26 produziu um biossurfactante que promoveu consideravelmente a remoção de compostos aromáticos policíclicos e compostos fenólicos de águas residuárias de refinaria de petróleo, podendo ser utilizado em processos de biorremediação (PATEL et al., 2020). Isolada de solo contaminado, a cepa *Stenotrophomonas maltophilia* NBS-11 produziu um glicolípido com capacidade quelante de ferro, podendo ser utilizado para proteger células do estresse oxidativo (HEMLATA et al., 2015).

Todos os MAGs recuperados em alta qualidade estavam >90 % completos, apresentaram menos de 5 % de contaminação e abrangem regiões repetitivas bem como a presença dos genes 23S, 16S e 5S rRNA e ao menos 18 tRNAs, satisfazendo os critérios de alta qualidade para MAGs (BOWERS et al., 2017). Três MAGs apresentaram 100 % de completude com baixo índice de contaminação (MB05, MB07 e OB12).

3.3.2 Caracterização funcional dos MAGs em amostras de frutas

A partir da anotação funcional realizada utilizando o Banco de Dados *Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes* (KEGG) *Orthologies* (KOs), e seguindo a tabela criada de genes (KOs) de interesse (Tabela B1.1), K00059 foi o mais abundante nas amostras, estando presente em todos os MAGs de alta qualidade (Figura 3.2). K00059 refere-se ao gene *fabG*, que é um dos principais genes que contribuem para as vias de biossíntese da produção de ramnolipídios (KASHIF et al., 2022). A 3-oxoacil-ACP redutase bacteriana, também chamada de FabG é uma proteína que catalisa a etapa de redução da 3-oxoacil-ACP na via de ácidos graxos e seu gene *fabG* geralmente está localizado no grupo de genes que sintetizam ácidos graxos bacterianos (GUO et al., 2019).

Figura 3.2. Perfil funcional dos 10 MAGs recuperados em alta qualidade das amostras de resíduos de frutas, baseado nos KOs de interesse relacionados à biossíntese de biossurfactantes.



O gene K02759, que codifica a enzima componente EIIA do sistema PTS (fosfoenolpiruvato:açúcar fosfotransferase) da celobiose, é intimamente relacionada ao transporte e absorção de açúcares para as células bacterianas (GIRO et al., 2009). A enzima específica de liquenisina do sistema fosfotransferase (PTS), também está relacionada ao gene *licA3*, responsável pela produção do biossurfactante lipopeptídeo liquenisina, comumente conhecido por ser produzido pela cepa *Bacillus licheniformis* (KONZ et al., 1999; PHETCHARAT et al., 2019). Este KO foi encontrado em maior frequência nos MAGs recuperados da amostra de laranja OB02 e OB01 identificados como *Klebsiella pneumoniae* e *Brevibacillus laterosporus*, respectivamente.

Destacam-se ainda os KOs: K00655, K00645 e K06133. O K00655 refere-se a genes que codificam a enzima 1-Acil-sn-glicerol-3-fosfato aciltransferase (E.C.2.3.1.51) relacionada à biossíntese de fosfolipídios e ácidos graxos e lipopolissacarídeos (VASCONCELOS et al., 2016). K00645 refere-se ao gene *ituD*, que codifica uma enzima precursora do biossurfactante lipopeptídeo iturina A, muito comum em bactérias do gênero *Bacillus* e nas amostras este encontra-se principalmente no MAG recuperado da laranja OB01, identificado como *Brevibacillus laterosporus* (MARKANDE; PATEL; VARJANI, 2021). O gene *sfp* (K06133) presente

principalmente nos MAGs (OB08 e MB07) de *Stenotrophomonas pavanii* e *Acinetobacter seifertii* (OB12 e MB05) é uma das unidades principais do operon *srfA* que codifica uma sintetase de peptídeo não ribossomal, essencial na biossíntese de biosurfactante lipopeptídeo (FINKING; MARAHIEL, 2004; JIMOH; LIN, 2019).

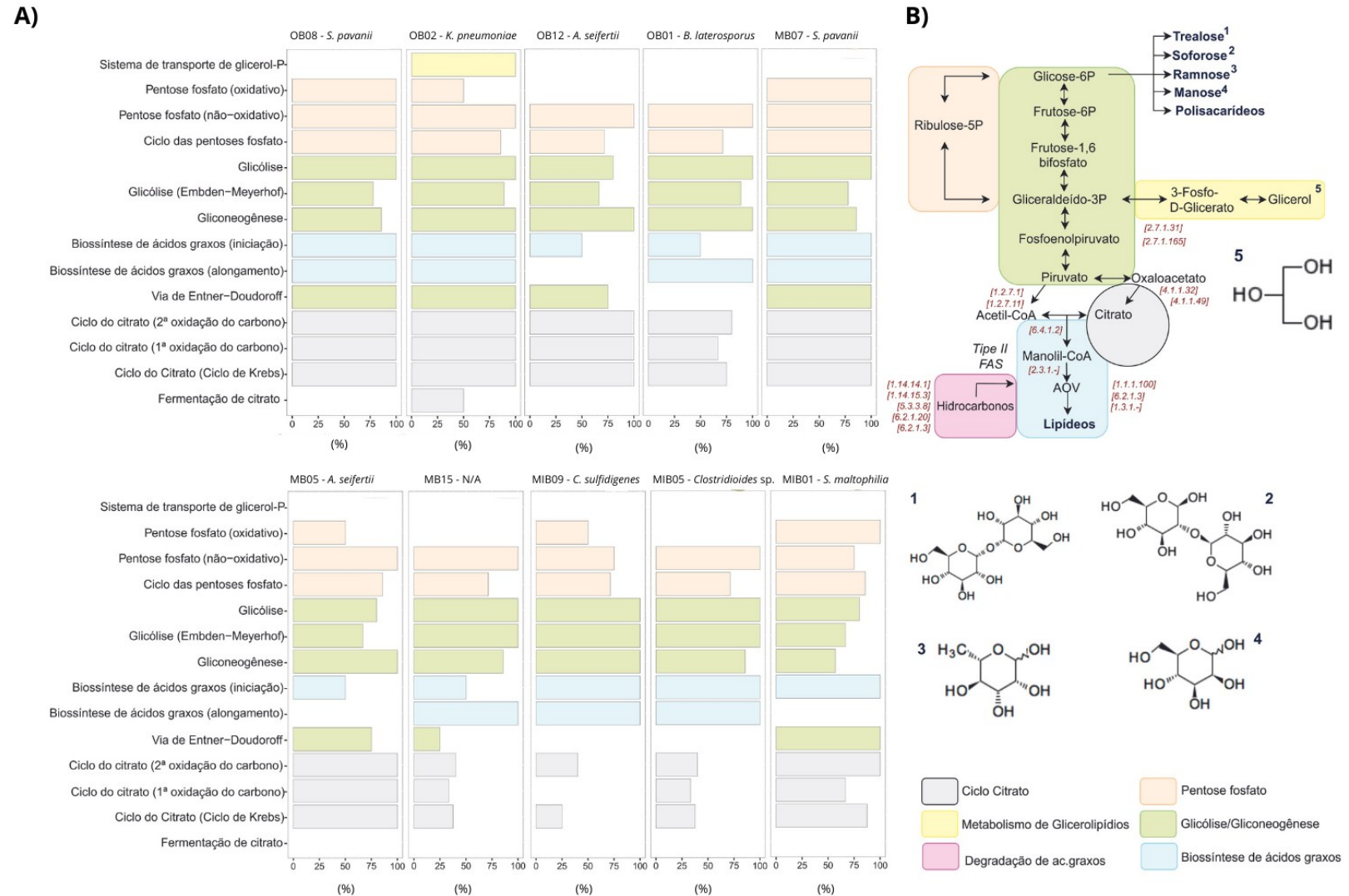
No geral, segundo a classificação da tabela de genes de interesse (Tabela B1.1) a maioria dos KOs de interesse envolvidos na produção de biosurfactantes encontrados nos MAGs estão relacionados ao metabolismo de ácidos graxos (48,47 %), biossíntese de metabólitos secundários (20,92 %) e biossíntese de lipopeptídeos (12,75 %). Ainda foram encontrados também genes envolvidos na biossíntese de lipopolissacarídeos (7,99 %), metabolismo de lipídios (4,93 %), metabolismo de hidrocarbonetos (3,40 %) e biossíntese de ramnolipídios (1,53 %). Com base na classificação dos KOs de interesse pode-se inferir que a grande maioria dos genes está relacionada à biossíntese de lipopeptídios, uma vez que estes são formados por uma porção de ácido graxo, ligado a uma cadeia peptídica (PLAZA et al., 2015). Estes são sintetizados independente de ribossomo, pelas enzimas denominadas sintetases de peptídios não ribossomais, possuindo estruturas diversas e também estão relacionados à várias atividades biológicas antiproliferativas, além de estarem envolvidos na motilidade e formação de biofilmes (ROOGSAWANG; WASHIO; MORIKAWA, 2011).

As vias metabólicas que envolvem a síntese de biosurfactantes e seus precursores são diversas, e a fonte de carbono escolhida para o meio de cultivo, seja ela de natureza hidrofílica ou hidrofóbica, influencia na rota metabólica utilizada pelo microrganismo para a produção (SATPUTE et al., 2010; JIMOH; LIN, 2019). As vias metabólicas analisadas oriundas do KEEG nos MAGs de alta qualidade, foram àquelas relacionadas ao metabolismo intermediário da síntese de precursores de biosurfactantes de acordo com a natureza da fonte de carbono utilizada, e a completude dessas vias em cada um dos MAGs está representada na Figura 3.3. Os MAGs OB08 e MB07 anotados taxonomicamente como *Stenotrophomonas pavanii* apresentaram similaridade na completude das vias, OB12 e MB05 anotados como *Acinetobacter seifertii* também apresentaram um perfil similar entre si, bem como os 3 MAGs representantes do filo Firmicutes (MB15, MIB05 e MIB09).

Quando a fonte de carbono utilizada é hidrofílica, são acionadas pelo metabolismo microbiano as vias lipogênica e glicolítica: a fonte de carbono é degradada até seus intermediários na via glicolítica, onde glicose 6-fosfato é um dos precursores dos carboidratos presentes na porção hidrofílica do biosurfactante, e para a síntese da porção hidrofóbica, o substrato é oxidado a

piruvato, que será convertido a acetil-CoA que juntamente com oxalacetato produzirá malonil-CoA e em seguida ácido graxo, um dos precursores da síntese de lipídios. Ao utilizar substratos hidrofóbicos como fonte de carbono, as vias utilizadas pelo metabolismo microbiano são a lipolítica e gliconeogênese: para a formação dos carboidratos, a via da gliconeogênese é ativada para que seu complexo enzimático atue nas reações inversas àquelas da glicólise, uma vez que as reações catalisadas pela piruvato quinase são irreversíveis. Para a síntese da porção hidrofóbica do biossurfactante, o substrato é reduzido à ácido graxo (FONTES et al., 2008; SATPUTE et al., 2010). A completude dessas vias nos MAGs apresentados, evidencia o potencial de produção de biossurfactantes, especialmente a partir de substratos hidrofílicos.

Figura 3.3. A) gráficos em barras representando a completude (%) das vias relacionadas à síntese de biossurfactantes, em relação à fonte de carbono utilizada, nos MAGs de alta qualidade B) mapa metabólico resumido de vias intermediárias envolvidas na síntese de biossurfactantes a partir de substratos hidrofílicos e hidrofóbicos como fonte de carbono. Os números EC referem-se às enzimas potencialmente envolvidas em cada reação.



A anotação funcional a partir do banco de dados BiosurfDB utilizando o *pipeline* MEGAN+BioSurfDB para os 34 MAGs, gerou um total de 1013 leituras relacionadas à biossíntese de biossurfactantes, em sua maioria sendo envolvidas na biossíntese de lipopeptídios (69,29 %), na biossíntese de poliquetídeos (18,66 %) e na biossíntese de glicolipídios (6,22 %) (Tabela 3.2). Para os 10 MAGs de alta qualidade, 949 leituras foram atribuídas, sendo 32 % de leituras atribuídas à biossíntese de biossurfactantes, totalizando 304 leituras. Os 4 MAGs referentes às amostras de laranja apresentaram a maioria das leituras (71,05 %), seguida pelos 3 MAGs recuperados das amostras de *mix* de frutas (18,42 %) e 3 MAGs das amostras de manga (10,52 %) (Tabela 3.3). O perfil funcional segundo o *pipeline* MEGAN+BioSurfDB dos MAGs recuperados em alta qualidade também está majoritariamente relacionado à biossíntese de lipopeptídeos (67,76 %) (Figura 3.4).

Tabela 3.2. Porcentagem relativa de leituras atribuídas à biossíntese de biossurfactantes, segundo a classificação do BioSurfDB, nos 34 MAGs recuperados de amostras de resíduos de frutas.

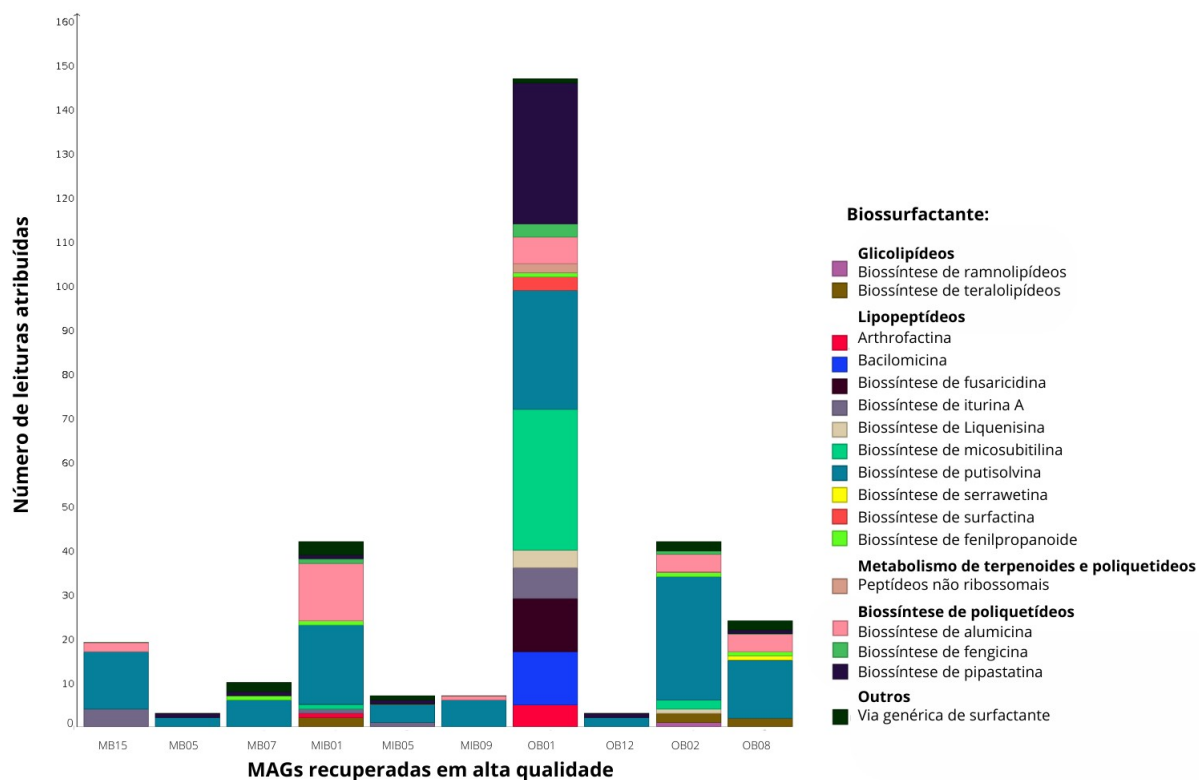
Classificação BiosurfDB	Número de leituras atribuídas	% relativa
Biossíntese de lipopeptídios	702	69,29
Biossíntese de poliquetídeos	189	18,65
Biossíntese de glicolipídeos	63	6,22
Biossíntese de surfactantes	42	4,14
Biossíntese de outros metabólitos secundários	10	0,98
Biossíntese de fosfolipídios	4	0,39
Metabolismo de terpenóides e poliquetídeos	3	0,29

Tabela 3.3. Porcentagem relativa de leituras atribuídas à biossíntese de biossurfactantes, seguindo o *pipeline* BioSurfDB+MEGAN, para os 10 MAGs de alta qualidade recuperados de amostras de resíduos de frutas.

Amostra	Número de leituras atribuídas	% relativa
MAGs recuperados de amostra de laranja	216	71,05
MAGs recuperados de amostra de <i>mix</i>	56	18,42
MAGs recuperados de amostra de manga	32	10,52

A atribuição de genes envolvidos na biossíntese de putisolvinas ocorreu para todos os MAGs, sendo a maioria encontrada em OB01, OB02 e MIB01, o que corrobora com a análise centrada em gene realizada em dados metagenômicos em estudo anterior (SILVA, et al., 2022). Putisolvina I e II, são lipopeptídeos cíclicos que foram descritos pela primeira vez ao serem produzidos pela cepa de *Pseudomonas putida* PCL1445 isolada de solo contaminado (KUIPER et al., 2004; DUBERN et al., 2008). No entanto, é um biossurfactante com propriedades de redução da tensão superficial e em bactérias, estimula a motilidade de enxameação e além de inibir a formação de biofilmes, degrada biofilmes já existentes.

Figura 3.4. Perfil funcional relacionado à biossíntese de biossurfactantes dos 10 MAGs de alta qualidade recuperados de amostras de frutas. Classificação baseada no banco de dados BioSurfDB via *pipeline* DIAMOND+MEGAN.

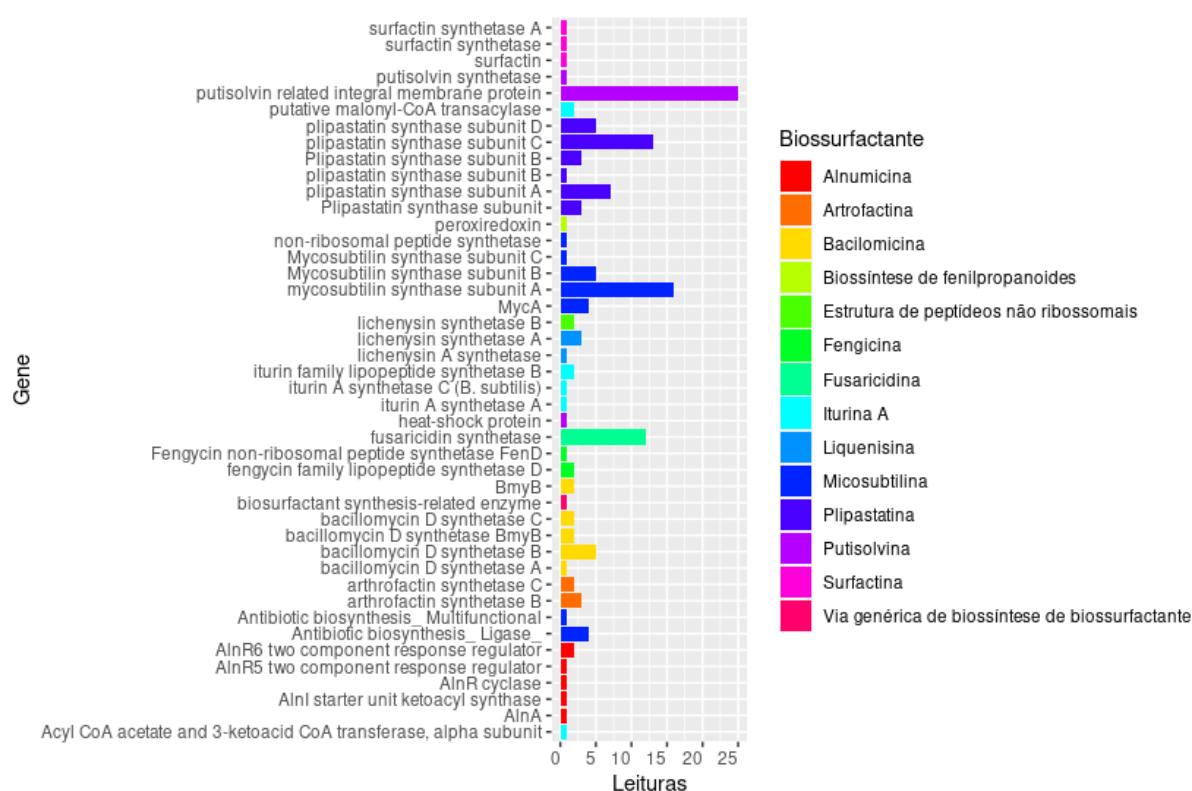


O MAG OB01 obtido da amostra de laranja (*Brevibacillus laterosporus*) destacou-se pela quantidade de leituras atribuídas, representando 48,35 % do total de leituras para os 10 MAGs de alta qualidade. Além disso, a maioria dessas leituras está relacionada a genes envolvidos na biossíntese de lipopeptídeos (Figura 3.5). Pelas suas características genéticas, as espécies do gênero *Brevibacillus* são consideradas bactérias com propriedades promotoras de crescimento em plantas, sintetizam moléculas com propriedades antifúngicas e antibióticas, e podem ser encontradas em solos diversos, sedimentos e plantas (RAY; PATEL; AMIN, 2020).

A biossíntese de lipopeptídeos como surfactina, micosubtilina e iturina está fortemente relacionada às espécies do gênero *Bacillus*, no entanto, o gênero *Brevibacillus* tem uma alta heterogeneidade filogenética e está intimamente relacionado ao gênero *Bacillus* (RAY; PATEL; AMIN, 2020). Por isso, a similaridade em relação aos genes envolvidos na

biossíntese desses biossurfactantes. Micosubtilina, bacilomicina e iturina englobam o grupo da família das iturinas e são reconhecidas pelo seu potencial antimicrobiano, enquanto que surfactina e liquenisina fazem parte da família das surfactinas, que apesar de também apresentarem propriedades antimicrobianas, são excelentes redutores de tensão superficial (ROONGSAWANG et al., 2011).

Figura 3.5. Atribuição de leituras relacionadas aos genes envolvidos na biossíntese de biossurfactantes, segundo a classificação BioSurfDB, referente ao MAG OB01 recuperado de amostra de laranja e anotado taxonomicamente como *Brevibacillus laterosporus*.



Genes envolvidos na biossíntese de fengicina e plipastatina, também atribuídos a este MAG (Figura 3.5) estão classificados como poliketídeos no banco de dados BioSurfDB, mas também são considerados uma classe de biossurfactantes lipopeptídeos (GEETHA; BANAT; JOSHI, 2018). Estes são sintetizados por um complexo de enzimas denominadas policetídio sintases (PKSs – *polyketide synthases*) que produzem diversos metabólitos secundários de diversas estruturas e de maneira semelhante à biossíntese de ácidos graxos, esta base genômica é muito relatada também no gênero *Bacillus* (JASIM et al., 2016).

A análise dos MAGs apresentados neste estudo elucidada ainda mais a microbiota presente em amostras de frutas, corroborando com estudos anteriores, que relatam a microbiota associada a plantas no geral como potenciais produtoras de moléculas com propriedades antibióticas e antimicrobianas, sendo em sua grande maioria classificadas como lipopeptídios e podendo ser aplicadas em diversos setores da indústria, especialmente na agricultura, na proteção contra pragas ou promoção de crescimento (SACHDEV; CAMEOTRA, 2013; SINGH; JHA, JHA, 2015; LEVY et al., 2018).

3.4 CONCLUSÃO

O perfil funcional dos MAGs recuperados de amostras de frutas, tanto obtido pela análise de KOs de interesse quanto pelo *pipeline* MEGAN+BioSurfDB foi predominantemente relacionado à biossíntese de biosurfactantes lipopeptídios. Entretanto, a análise interativa via MEGAN+BiSurfDB direciona o estudo aos genes de interesse de forma mais clara e por ser uma investigação de domínio específico, permite que o estudo foque apenas na caracterização do conjunto de dados considerando apenas as informações de interesse que já estão previamente selecionadas no banco de dados. Ademais, o presente estudo ainda ressalta a utilização da bioinformática para o conhecimento da microbiota desconhecida ou inexplorada.

A caracterização taxonômica e funcional dos MAGs corroborou com estudos anteriores, evidenciando o potencial da microbiota presente nesses resíduos para a sua aplicação na biossíntese de biosurfactantes. Lipopeptídios são uma classe de biosurfactantes relacionados a potentes antimicrobianos que podem ser utilizados em diversos setores industriais.

3.5 REFERÊNCIAS

AL-AMOUD, S.; RAZALI, R.; ESSACK, M.; AMINI, M.S.; BOUGOUFFA, S.; ARCHER, J.A.C.; LAFI, F.F.; BAJIC, V.B. Metagenomics as a preliminary screen for antimicrobial biosprospecting. **Gene**, v. 594, p. 248-258, 2016.

ALBERTESEN, M.; HUGENHOLTZ, P.; SKARSHEWSKI, A.; NIELSEN, K.L.; TYSON, G.W.; NIELSEN, P.H. Genome sequences of rare, uncultured bacteria obtained by differential coverage binning of multiple metagenomes. **Nature Biotechnology**, v. 31(6), p. 533-538, 2013.

ANDREWS. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Babraham Inst. [cited 2020 Aug 26], 2010. Disponível em:

<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

ARAÚJO, H. W. C.; ANDRADE, R. F. S.; RODRÍGUEZ, D. M.; RIBEAUX, D. R.; ALVES, C. A.; TAKAKI, G. M. C. Sustainable biosurfactant produced by *Serratia marcescens* UCP 1549 and its suitability for agricultural and marine bioremediation applications. **Microbial Cell Factories**, v. 18, n. 2, p. 1–13, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12934-018-1046-0>>.

BOLGER A.M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics** v. 30, n.15, p. 2114–20, 2014.

BOWERS, R.M.; KYRPIDES, N.C.; STEPANAUSKAS, R., et al. Minimum information about a single amplified genome (MISAG) and a metagenome-assembled genome (MIMAG) of bacteria and archaea. **Nature Biotechnology**, v. 35(8), p. 725-731, 2017.

CAROLIN, F.C.; KUMAR, P.S.; MOHANAKRISHNA, G.; HEMAVATHY, R.V.; RANGASAMY, G.; AMINABHAVI, T.M. Sustainable production of biosurfactants via valorisation of industrial wastes as alternate feedstocks. **Chemosphere**, v. 312, p. 137326, 2023.

COMPANT, S.; SAMAD, A.; FAIST, H.; SESSITSCH, A. A review on the plant microbiome: ecology, functions, and emerging trends in microbial application. **Journal of Advanced Research**, v. 19, p. 29-37, 2019.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Genetic regulations of the biosynthesis of microbial surfactants: an overview. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 25(1), 165-186, 2008.

DUBERN, J-F.; COPPOOLSE, E.R.; STIEKEMA, W.J.; BLOEMBERG, G.V. Genetic and functional characterization of the gene cluster directing the biosynthesis of putisolvin I and II in *Pseudomonas putida* strain PCL1445. **Microbiology**, v. 154(7), p. 2070-2083, 2008.

ESPOSITO, F.P.; GIULIANO, R.; SALA, G.D.; VITALE, G.A.; BUONOCORE, C.; AUSURI, J.; GALASSO, C.; COPPOLA, D.; FRANCI, G.; GALDIERO, M.; PASCALE, D. Combining OSMAC approach and untargeted metabolomics for the identification of new glycolipids with potent antiviral activity produced by a marine *Rhodococcus*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22(16), p. 9055, 2021.

FINKING, R.; MARAHIEL, M. A. Biosynthesis of nonribosomal peptides. **Annu. Rev. Microbiol.** v. 58, p. 453–488, 2004.

FONTES, G.C.; AMARAL, P.F.F.; COELHO, M.A.Z. Produção de biossurfactantes por levedura. **Química Nova**, v. 31 (8), p. 2091-2099, 2008.

GAO, Y-C.; GUO, S-H.; WANG, J-N.; LI, D.; WANG, H.; ZENG, D-H. Effects of different remediation treatments on crude oil contaminated saline soil. **Chemosphere**, v. 117(1), p. 486-493, 2014.

GAUR, V.K.; SHARMA, P.; GUPTA, S.; VARJANI, S.; SRIVASTAVA, J.K.; WONG, J.W.C.; NGO, H.H. Opportunities and challenges in omics approaches for biosurfactant production and feasibility of site remediation: strategies and advancements. **Environmental**

Technology & Innovation, v. 25. p. 102-132, 2022.

GEETHA, S.J.; BANAT, I.M.; JOSHI, S.J. Biosurfactants: production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 23-32, 2018.

GIRO, M.E.A.; MARTINS, J.J.L.; ROCHA, M.V.P.; MELO, V.M.M.; GONÇALVES, L.R.B. Clarified cashew apple juice as alternative raw material for biosurfactant production by *Bacillus subtilis* in a batch reactor. **Biotechnology Journal**, v. 4(5), p. 738-747, 2009.

GUO, Q-Q.; ZHANG, W-B.; ZHANG, C.; SONG, Y-L.; LIAO, Y-L.; MA, J-C.; YU, Y-H.; WANG, H-H. Characterization of 3-oxacyl-acyl carrier protein reductase homolog genes in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1-12, 2019.

HEMTALA, B.; SELVIN, J.; TUKARAM, K. Optimization of iron chelating biosurfactant production by *Stenotrophomonas maltophilia* NBS-11. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4 (2), p. 135-143, 2015.

JACKSON, S.A.; BORCHET, E.; O'GARA, F.; DOBSON, A.D.W. Metagenomics for the discovery of novel biosurfactants of environmental interest from marine ecosystems. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 33, p. 176-182, 2015.

JASIM, B., SREELAKSHMI, K., MATHEW, J.; RADHAKRISHNAN, E. Surfactin, iturin, and fengycin biosynthesis by endophytic *Bacillus* sp. from *Bacopa monnieri*. **Microb. Ecol.** v.72, p. 106–119, 2016.

JIMOH, A.; LIN, J. Heterologous Expression of Sfp - Type Phosphopantetheinyl Transferase is Indispensable in the Biosynthesis of Lipopeptide Biosurfactant. **Molecular Biotechnology**, n. 0123456789, 2019b.

KARLAPUDI, A.P.; VENKATESWARULU, T.C.; TAMMINEEDI, J.; KANUMURI, L.; RAVURU, B.K.; DIRISALA, V. ramu.; KODALI, V.P. Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution – a review. **Petroleum**, v. 4 (3), p. 241-249, 2018.

KASHIF, A.; REHMAN, R.; FUWAD, A.; SHAHID, M.K.; DAYARATHNE, H.N.P.; JAMAL, A.; AFTAB, M.N.; MAINALI, B.; CHOI, Y. Current advances in the classification, production, properties and applications of microbial biosurfactants – A critical review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 306, p. 102718, 2022.

KE, J.; WANG, B.; YOSHIKUNI, Y. Microbiome engineering: synthetic biology of plant-associated microbiomes in sustainable agriculture. **Trends in Biotechnology**, v. 39 (3), p. 244-261, 2020.

KONZ, D.; DOEKEL, S.; MARAHIEL, M.A. Molecular and biochemical characterization of the protein template controlling biosynthesis of the lipopeptide lichenysin. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 133-140, 1999.

KUIPER, I.; LAGENDIJK, E.L.; PICKFORD, R.; DERRICK, J.P.; LAMERS, G.E.M.; THOMAS-OATES, J.E.; LUGTENBERG, B.J.J.; BLOEMBERG, G.V. Characterization of

two *Pseudomonas putida* lipopeptide biosurfactants, putisolvin I and II which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. **Molecular Microbiology**, v. 51, p. 97-113, 2004.

LEVY, A.; CONWAY, J.M.; DANGL, J.L.; WOYKE, T. Elucidating bacterial gene functions in the plant microbiome. **Cell Host and Microbe**, v. 24 (4), p. 475-485, 2018.

LI, D.; LUO, R.; LIU, C.M.; LEUNG, C.M.; TING, H.F.; SADAKANE, K.; ET AL. MEGAHIT v1.0: A fast and scalable metagenome assembler driven by advanced methodologies and community practices. **Methods**. p. 102:3–11, 2016.

MARKANDE, A.R.; PATEL, D.; VARJANI, S. A review on biosurfactants: properties, applications and current developments. **Bioresource Technology**, v. 330, p. 124963, 2021.
PARKS, D.H.; CHUVOCHINA, M.; WAITE, D.W.; RINKE, C.; SKARSHEWSKI, A.; CHAUMEIL, P.A.; et al. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. **Nat Biotechnol**. v. 36, n.10, p.996, 2018.

PATEL, K.; PATEL, M. Improving bioremediation process of petroleum wastewater using biosurfactants producing *Stenotrophomonas* sp. S1VKR-26 and assessment of phytotoxicity. **Bioresour. Technol**. v. 315, p. 123861, 2020.

PENYALVER, R.; ROESCH, L.F.W.; PIQUER-SALCEDO, J.E.; FORNER-GINER, M.A.; ALGUACIL, M. del M. From the bacterial citrus microbiome to the selection of potentially host-beneficial microbes. **New Biotechnology**, v. 70, p. 116-128, 2022.

PHETCHARAT, T.; DAWKRAJAI, P.; CHITOV, T.; MHUANTONG, W.; CHAMPREDA, V.; BOVONSOMBUT, S. Biosurfactant-producing capability and prediction of functional genes potentially beneficial to microbial enhanced oil recovery in indigenous bacterial communities of an onshore oil reservoir. **Current Microbiology**, v. 76 (3), p. 382-391, 2019.

PLAZA, G.; CHOJNIK, J.; RUDNICKA, K.; PARASZKIEWICZ, K.; BERNAT, P. Detection of biosurfactants in *Bacillus* species: genes and products identification. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119 (4), p. 1023-1034, 2015.

RAY, S.; PATEL, N.; AMIN, D. Brevibacillus. In: **Beneficial Microbes in Agro-Ecology**, Elsevier, p. 149-167, 2020.

ROONGSAWANG, N.; WASHIO, K.; MORIKAWA, M. Diversity of nonribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of lipopeptide biosurfactants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 141-172, 2011.

SACHDEV, D.P; CAMEOTRA, S.S. Biosurfactants in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97 (3), p. 1005-1016, 2013.

SATPUTE, S.K.; BANPURKAR, A.G.; DHAKEPHALKAR, P.K.; BANAT, I.M.; CHOPADEV, B.A. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30 (2), p. 127-144, 2010.

SETUBAL, J.C. Metagenome-assembled genomes: concepts, analogies, and challenges. **Biophysical Reviews**, v. 13 (6), p. 905-909, 2021.

SILVA, G.F.; GAUTAM, A.; DUARTE, I.C.S.; DELFORNO, T.P.; OLIVEIRA, V.M.; HUSON, D.H. Interactive analysis of biosurfactants in fruit-waste fermentation samples using BioSurfD and MEGAN. **Scientific Reports**, v. 12, p. 1-11, 2022.

SINGH, R.P.; JHA, P.; JHA, P.N. The plant-growth-promoting bacterium *Klebsiella* sp. SBP-8 confers induced systemic tolerance in wheat (*Triticum aestivum*) under salt stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 184, p. 57-67, 2015.

URITSKIY, G.V.; DIRUGGIERO, J.; TAYLOR, J. MetaWRAP—a flexible pipeline for genome-resolved metagenomic data analysis. **Microbiome** v. 61, 2018.

VASCONCELLOS, S.P.; SIERRA-GARCIA, I.N.; DELLAGZENNE, B.M.; VICENTINI, R.; MIDGLEY, D.; SILVA, C.C.; NETO, E.V.S.; VOLK, E.; HENDRY, P.; OLIVEIRA, V.M. Functional and genetic characterization of hydrocarbon biodegrader and exopolymer producing clones from a petroleum reservoir metagenomic library. **Environmental Technology**, v. 38 (9), p. 1139-1150, 2016.

WILLIAMS W.; TRINDADE, M. Metagenomics for the discovery novel biosurfactants. *In*: CHARLES, T.C.; LILES, M.R.; SESSITSCH, A. **Functional Metagenomics: Tools and Applications**. Switzerland: Springer Nature, 2017. p. (1-253).

ZHOU, Y.; LIU, M.; YANG, J. Recovering metagenome-assembled genomes from shotgun metagenomic sequencing data: methods, applications, challenges, and opportunities. **Microbiological Research**, v. 260, p. 127023, 2022.

CAPÍTULO 4 – PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE A PARTIR DE *Brevibacillus borstelensis* UTILIZANDO GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO

Resumo

O mercado de biossurfactantes cresce cada vez mais e a necessidade de otimizar a produção, descobrir novas cepas produtoras e utilizar fontes alternativas de baixo custo no processo são de grande importância. No presente trabalho, a bactéria Gram-positiva identificada como *Brevibacillus borstelensis* ISM04, isolada de resíduo de manga foi capaz de produzir biossurfactante a partir de glicerol como fonte de carbono alternativa. O biossurfactante produzido apresentou índice de emulsificação de 67 % em querosene e ausência de toxicidade em sementes de tomate e alface. Espectro de FTIR indicou a natureza lipopeptídica do composto produzido que também mostrou-se estável em temperaturas até 80 °C e em pH entre 6 e 10.

Abstract

The market for biosurfactants is growing more and more and the need to optimize production, discover new producing strains and use alternative low-cost sources in the process are of great importance. In the present work, the Gram-positive bacterium identified as *Brevibacillus borstelensis* ISM04, isolated from mango waste was able to produce a biosurfactant from glycerol as an alternative carbon source. The produced biosurfactant showed emulsification index of 67 % in kerosene and absence of toxicity on tomato and lettuce seeds. FTIR spectra indicated the lipopeptide nature of the produced compound which was also stable at temperatures up to 80 °C and at pH range between 6 and 10.

4.1 INTRODUÇÃO

Segundo o Relatório do Mercado Global de Biossurfactantes 2023, desenvolvido pela *Research and Markets*, o mercado global de biossurfactantes cresceu de US\$ 4,07 bilhões em 2022 para US\$ 4,39 bilhões em 2023. Apesar dos danos causados pela pandemia de COVID-19 à economia global e das sanções econômicas geradas em diversos países devido à guerra entre Rússia e Ucrânia, afetando a cadeia de suprimentos e altas inflações pelo mundo, estima-se que o mercado de biossurfactantes ainda cresça a uma taxa de crescimento anual composta de 8,1 % e chegue aos US\$ 6 bilhões até 2027 (MARKET e MARKETS, 2023).

A latente preocupação mundial com o meio ambiente e recursos naturais, bem como a conscientização do próprio consumidor a respeito do uso de ingredientes renováveis, naturais e mais seguros à saúde em seus produtos utilizados diariamente, vêm impulsionando cada vez

mais a indústria de surfactantes a promover mudanças em sua cadeia produtiva, tornando-a mais sustentável (GLOBAL MARKET INSIGHTS, 2023; MARKET e MARKETS, 2023). Este contexto levou diversas indústrias a explorarem o mercado de biossurfactantes e ampliarem sua capacidade de produção, incluindo grandes nomes como BASF SE, Merck KgaA, Evonik Industries AG, Givaudan SA, Akzo Nobel, dentre outras (GLOBAL MARKET INSIGHTS, 2023). Porém, apesar de toda a comoção global a respeito do meio ambiente e da procura de produtos ambientalmente mais limpos, o mercado de surfactantes sintéticos ainda se sobrepõe ao de biossurfactantes.

Os biossurfactantes, também chamados de surfactantes microbianos, são produzidos por microrganismos, apresentam propriedades biodegradáveis, baixa ou nenhuma toxicidade e um amplo espectro de aplicações industriais. Embora tenham muitas vantagens em relação aos sintéticos, sua produção ainda possui custo alto, há muitos desafios na produção em larga escala, rendimento e processamento (GAUR et al., 2022).

Microrganismos vivendo em ambientes distintos, desenvolvem habilidades fisiológicas e metabólicas únicas para sobreviverem e desempenharem suas funções. Assim, cada microrganismo em seu habitat pode produzir metabólitos diferentes, com novas propriedades, ampliando a possibilidade de descobrir novos compostos (SHEKHAR et al., 2015). Microrganismos isolados de múltiplos ambientes têm sido relatados como produtores de biossurfactantes: *Brevibacillus borstelensis* isolado de uma fonte termal localizada na Índia foi capaz de produzir um biossurfactante com capacidade de 57,54 % de emulsão (DHAGAT et al., 2020); a cepa *Bacillus licheniformis* isolada de mangue produziu um biossurfactante com atividade emulsificante de 75,17 % (KUMAR et al., 2016);

Sabe-se que frutas e vegetais carregam em sua filosfera, inúmeros microrganismos e que a diversidade desses, depende de fatores como grau de maturação da fruta, qualidade do solo em que ela se encontrava, práticas agrícolas, qualidade da água utilizada, condições ambientais na colheita etc. Algumas bactérias naturalmente presente nesses vegetais são conhecidas por produzirem ampla variedade de metabólitos primários e secundários, com propriedades antimicrobiana e antibiótica (PARANITHIOTIS et al., 2012; Di CAGNO et al., 2013; FESSARD; REMIZE, 2019). Além de serem produzidos por diversos gêneros de leveduras, bactérias e fungos, na produção de biossurfactantes podem ser utilizados diversos substratos como glicose, sacarose, etanol, glicerol, óleos, resíduos agroindustriais, resíduos

alimentícios, melaços, efluentes, parafina etc. (SAKTHIPRIYA et al., 2015; SHEKHAR et al., 2015). A fonte de carbono é essencial para o crescimento e o metabolismo microbiano, a glicose geralmente é a fonte de energia amplamente utilizada (VIGNESHWARAN et al. 2018) e também responsável pelo alto custo do processo (DHAGAT; JUJJAVARAPU, 2021), no entanto, neste estudo, visando a redução de custos na fermentação, como alternativa à glicose, foi utilizado o glicerol como fonte de carbono.

Considerando essa microbiota diversa presente em frutas, e da grande variedade frutícola que o Brasil dispõe devido às condições climáticas favoráveis, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de biossurfactante pela cepa de *Brevibacillus borstelensis* ISM04, isolada de resíduo de manga descartada em feiras livres, utilizando glicerol como fonte de carbono. Planejamento fatorial do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi realizado para projetar execuções experimentais e as respostas foram geradas em termos de rendimento, biomassa, tensão superficial e índice de emulsificação, visando otimizar o processo, os resultados obtidos viabilizaram a produção de um biossurfactante com capacidade de emulsificante em querosene que apresentou ausência de toxicidade em sementes de tomate e alface.

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Coleta, armazenagem do resíduo de fruta

Foram coletadas mangas descartadas de feiras livres da cidade de Sorocaba-SP, Brasil. Após a retirada dos caroços, a polpa e casca da fruta foram triturados em processador culinário. A amostra foi homogeneizada e armazenada em sacos plásticos herméticos, mantidos sob refrigeração a 4°C até sua utilização.

4.2.2 Seleção e isolamento de microrganismos

Em frascos reagentes de 500 mL, foram adicionados 25 g/L da polpa de manga homogeneizada em caldo LB (Luria-Bertami) e mantidos em shaker a 34 °C, 150 rpm durante 5 dias. Após o período, uma alíquota foi transferida para outro frasco contendo caldo LB e 1 % de glicerol, mantido nas mesmas condições de temperatura e agitação, por 7 dias.

Esse procedimento foi repetido mais uma vez e após o período determinado, diluições seriadas (até 10⁻⁸) foram realizadas para semeadura em superfície em placas de Petri contendo ágar nutriente. As placas foram mantidas em estufa a 35 °C por 48 horas. Após crescimento e

sucessivas estrias de esgotamento os isolados foram mantidos em tubos com ágar inclinado “*slant*” e mantidos sob refrigeração.

As 15 cepas isoladas do resíduo de manga foram previamente testadas quanto a produção de biossurfactante e a melhor avaliada como potencial produtora, denominada com o código ISM04, foi identificada e posteriormente submetida aos testes de produção.

4.2.3 Identificação de microrganismo produtor de biossurfactante, isolado de amostra de resíduo de manga

A cepa utilizada neste trabalho, denominada ISM04 do banco de cultura do Laboratório de Microbiologia Aplicada, da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) *campus* Sorocaba-SP, Brasil, foi previamente isolada do resíduo de manga e classificada como potencial produtora de biossurfactante.

O isolado ISM04 foi submetido à extração de DNA utilizando o kit Dneasy PowerSoil seguindo todo o protocolo conforme o fabricante. A purificação do produto de PCR foi feita em coluna (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare) e o sequenciamento Sanger foi realizado na Universidade Estadual Paulista (Unesp) *campus* Jaboticabal-SP, Brasil. Os *primers* universais para o domínio Bacteria utilizados no sequenciamento foram 27f 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' e 1100r 5'-AGGGTTGCGCTCGTTG-3' (LANE, 1991).

A edição, conferência dos cromatogramas parciais das sequências do gene 16S rDNA e o alinhamento das mesmas, foram realizadas no *software* Geneious V8. As sequências consenso geradas foram alinhadas e comparadas com sequências conhecidas de organismos depositados no Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). As distâncias genéticas foram analisadas através do programa MEGA versão 10.2 (TAMURA et al., 2013) e calculadas segundo o modelo de Kimura dois-parâmetros (K2P) (KIMURA, 1980). A partir das distâncias genéticas, a árvore filogenética foi gerada pelo método de Neighbor-Joining (SATOU; NEI, 1987) calculadas com valores de *bootstrap* com 1000 amostragens.

As sequências do isolado ISM04 foram depositadas no banco de dados de anotações de sequências e nucleotídeos GenBank, e está disponível publicamente através do número de acesso OR197713.

4.2.4 Ensaios de produção de biossurfactante utilizando glicerol como fonte de carbono

Planejamento fatorial do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi realizado no *software* online Protimiza (<https://experimental-design.protimiza.com.br/>), visando obter a otimização do processo, contou com quatro variáveis: concentração inicial de extrato de levedura (%); concentração inicial de sulfato de magnésio (MgSO_4) (%); concentração inicial de glutamato monossódico (%) e concentração inicial de glicerol (%) (Tabela 4.1). Foram realizados 28 experimentos em triplicatas, sendo oito condições experimentais distintas e três pontos centrais utilizados para cálculo do erro puro. Para cálculo das respostas, foram consideradas as médias das triplicatas. Os ensaios foram realizados em reatores em batelada, em triplicata, totalizando 84 reatores, em frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 200 mL de meio reacional e 5 % de inóculo (v/v) e mantidos em incubadora do tipo shaker a 200 rpm e 37 °C durante 72 horas.

Tabela 4.1. Valores utilizados no DCCR para a avaliação das variáveis.

Variável	Código	Níveis		
		-1	0	1
Concentração de extrato de levedura (%)	X ₁	0,2	0,4	0,6
Concentração de MgSO_4 (%)	X ₂	0,05	0,1	0,15
Concentração de glutamato monossódico (%)	X ₃	0,75	1,375	2
Concentração de glicerol (%)	X ₄	2	3	4

O meio de cultivo McKeen para a produção de biossurfactantes foi adaptado de Daghat et al. (2021) e era composto por: glicerol (X₄); glutamato monossódico (X₃); extrato de levedura (X₁); MgSO_4 (X₂); K_2HPO_4 (0,1 %); KCl (0,05 %) e 0,05 % de solução traço. A solução traço era composta por (g/L): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5,0); $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1,6) e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,15).

Após obtidas as respostas, foi realizado o modelo preditivo em função das variáveis e a análise de variância ANOVA. A partir da superfície de resposta para verificar e definir as faixas ótimas operacionais de cada variável, foi realizada a validação experimental com os ensaios nas condições otimizadas.

4.2.5 Monitoramento dos ensaios de produção de biossurfactante

Após o término das 72 horas de fermentação, alíquotas de 20 mL foram retiradas para ensaios de monitoramento da produção. O caldo fermentado foi centrifugado a 10.000 rpm por 20 minutos a 4 °C (KUMAR; JANARDHAN; VISWANATH, 2016), a biomassa microbiana foi determinada na porção precipitada pelo método de biomassa seca (SUWANSUKHO et al., 2016).

O sobrenadante foi utilizado para a avaliação do índice de emulsificação em querosene após 24 horas (E_{24}) (TABATABAEE et al., 2005; MARCELINO et al., 2019). Também foi realizado teste de tensão superficial (TS) utilizando o método da gota suspensa, utilizando um medidor de ângulo de contato Ramé-Hart 250, a 25 °C, com TS inicial considerando a água 72 mN/m (PATHAK; KEHARIA, 2014). No *software* DROPimage Advanced a gota suspensa foi fotografada e a tensão mensurada no ImageJ pelo plugin Pedit_Drop (DAERR; MOGNE, 2016).

O rendimento do biossurfactante foi calculado a partir do peso do extraído do sobrenadante. Um volume de 5 mL do sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,22 μ m e adicionado o mesmo volume de acetona. A mistura ficou em repouso por 24 horas e mantida a 4 °C. Após o período, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos, 8000 rpm a 4 °C, o precipitado foi seco em estufa a 105 °C (PRUTHI; CAMEOTRA, 2003).

4.2.6 Ensaios de produção de biossurfactante da condição otimizada e monitoramento

Os ensaios da condição otimizada foram realizados em triplicata, em Erlenmeyer de 500 mL contendo 350 mL de volume reacional e 5 % de inóculo. As concentrações das variáveis do meio de cultivo foram as seguintes (%): X_1 – extrato de levedura (0,40); X_2 – $MgSO_4$ (0,10); X_3 – glutamato monossódico (0,0) e X_4 – glicerol (1,06), as concentrações dos demais reagentes e as condições experimentais mantiveram-se as mesmas.

Alíquotas foram retiradas ao longo da fermentação nos tempos 0 h, 24 h, 36 h, 48 h e 72 h e foram realizados determinações de biomassa seca e índice de emulsificação conforme descrito no item 4.2.5. O consumo de glicerol foi avaliado através do método de determinação de glicerol por espectrofotometria segundo Bondioli e Bella (2005).

Após as 72 horas de fermentação, o biossurfactante foi extraído conforme item 4.2.5 e submetido a teste de estabilidade para avaliar a capacidade de emulsão em diferentes condições de temperatura (40 °C, 60 °C e 80 °C) e pH (3, 6 e 10) (DAS; KUMAR, 2018). O

biossurfactante extraído também foi submetido aos testes deslocamento de óleo (YOUSSEF et al., 2004; KUMAR et al., 2016) e teste de toxicidade em sementes (RUFINO et al., 2014).

4.2.7 Fitotoxicidade do biossurfactante extraído

A fitotoxicidade do biossurfactante foi avaliada por meio de ensaios de germinação e alongamento radicular de sementes de tomate cereja (*Solanum lycopersicum* ISLA REF. 261) e de alface Boston branca lisa (*Lactuca sativa* ISLA REF. 027) segundo protocolo de Tiquia et al. (1996) modificado. Vinte sementes de cada variedade foram superficialmente desinfectadas em solução contendo álcool absoluto durante 5 minutos. As sementes foram então adicionadas em 25 mL do biossurfactante extraído na concentração de 1,2 g/L mantidas sob imersão à 25 °C, e em shaker a 110 rpm por 24 horas. Após o período as sementes foram acondicionadas em placas de Petri contendo papel filtro umedecidas com água destilada estéril e incubadas em câmara B.O.D a 22/16 °C por 7 dias, sob fotoperíodo de 10/8 h (dia/noite). O grupo controle foi estabelecido com 20 sementes adicionadas diretamente no papel filtro com água destilada estéril. A germinação da semente, o alongamento da raiz e o índice de germinação foram determinados seguindo as equações (1), (2) e (3):

$$\text{Germinação relativa (\%)} = \frac{\text{número de sementes germinadas após imersão}}{\text{número de sementes germinadas no controle}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Comprimento relativo da raiz (\%)} = \frac{\text{comprimento médio da raiz após imersão}}{\text{comprimento médio da raiz no controle}} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Índice de germinação} = \% \text{ germinação relativa} \times \% \text{ comprimento relativo da raiz} / 100 \quad (3)$$

4.2.8 Caracterização parcial do biossurfactante

A determinação da carga iônica do biossurfactante foi realizada com o método de difusão em ágar, em gel de agarose 1%. Foram adicionadas uma solução de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) 20 mM como carga positiva e uma solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 20 mM como carga negativa, o biossurfactante extraído foi adicionado no centro do gel, entre os dois padrões (MEYLHEUC et al., 2001).

O biossurfactante extraído foi liofilizado e caracterizado por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Os espectros FTIR foram coletados de 500 a 4000 cm^{-1} usando um espectrômetro infravermelho da marca PerkinElmer modelo *Spectrum 65* do Laboratório Caracterizações de Polímeros da Faculdade de Tecnologia José

Crespo Gonzales (Fatec-Sorocaba). Os espectros foram gerados na resolução 4 cm^{-1} e varredura 64 scan .

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Identificação do microrganismo produtor de biosurfactante

O isolado ISM04 foi identificado como *Brevibacillus borstelensis* (Figura 4.1) na árvore filogenética, com base na sequência de genes 16S rDNA com 949 pb de comprimento e *bootstrap* = 100 e a divergência genética entre as sequências da espécie *Brevibacillus borstelensis* foi a mais baixa (0 – 0,007%) indicando que o isolado pertence à ela (Tabela 4.2).

Figura 4.1. Árvore filogenética gerada no programa MEGA 10.2 com 1.000 bootstrap, construída pelo método Neighbor-Joining, com base no sequenciamento parcial do gene 16S rDNA do isolado ISM04 e das sequências parciais do gênero *Brevibacillus borstelensis* depositadas no GenBank.

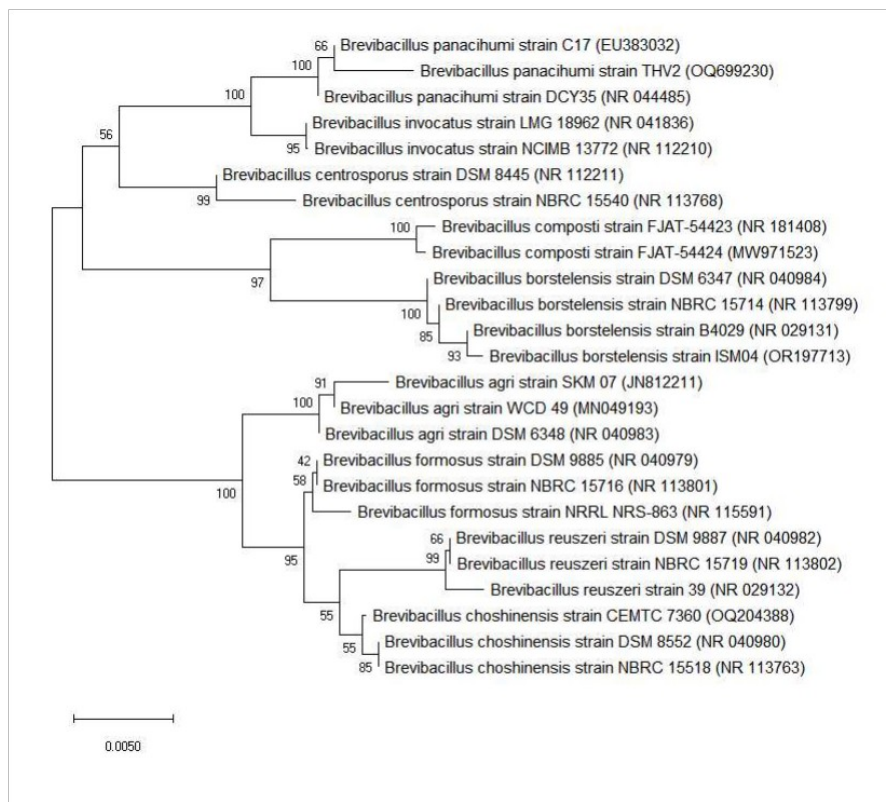


Tabela 4.2. Divergência genética método Kimura dois-parâmetros obtida entre sequências de 16S entre os clados e dentro de cada clado recuperado no gênero *Brevibacillus*, método Kimura dois-parâmetros, valores em porcentagem (%).

	<i>B. agri</i>	<i>B. formosus</i>	<i>B. reuszeri</i>	<i>B. choshinensis</i>	<i>B. centrosporus</i>	<i>B. invocatus</i>	<i>B. panacihumi</i>	<i>B. borstelensis</i>	<i>B. composti</i>
<i>B. agri</i>	0 – 0,35	0,74 – 1,2	1,22 – 1,74	0,88 – 1,68	2,12 – 3,23	2,46 – 3,02	2,57 – 3,26	3,09 – 3,76	3,02 – 3,52
<i>B. formosus</i>	-	0 – 0,21	0,88 – 1,08	0,20 – 0,65	1,85 – 2,85	2,45 – 2,79	2,36 – 3,26	3,31 – 4,26	2,88 – 3,11
<i>B. reuszeri</i>	-	-	0 – 0,21	0,72 – 1,08	2,34 – 3,22	2,89 – 3,32	3,00 – 3,95	3,52 – 4,73	3,17 – 3,62
<i>B. choshinensis</i>	-	-	-	0 – 0,10	1,64 – 3,35	2,83 – 4,05	2,79 – 4,45	3,52 – 4,36	3,38 – 3,90
<i>B. centrosporus</i>	-	-	-	-	0,20	1,30 – 1,74	1,45 – 2,21	2,06 – 2,86	2,84 – 3,34
<i>B. invocatus</i>	-	-	-	-	-	0	0,61 – 1,03	2,20 – 2,49	2,76 – 2,83
<i>B. panacihumi</i>	-	-	-	-	-	-	0,06 – 0,43	2,26 – 2,95	3,03 – 3,58
<i>B. borstelensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	0 – 0,007	1,46 – 2,38
<i>B. composti</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0,14

4.3.2 Ensaios de produção de biossurfactante

Os ensaios realizados a partir do DCCR com variação nas concentrações de extrato de levedura (X_1), $MgSO_4$ (X_2), glutamato monossódico (X_3) e glicerol (X_4) estão demonstrados na Tabela 4.3, as respostas são referentes à biomassa seca (g/L), ao rendimento do biossurfactante (g/L), tensão superficial mN/m e atividade emulsificante (%) em querosene. Os resultados estão relacionados à produção de biossurfactante em 72 horas de fermentação.

Tabela 4.3. Delineamento composto central rotacional empregado na produção de biossurfactante por *Brevibacillus borstelensis* ISM04. As variáveis independentes: concentração de extrato de levedura (X_1); concentração de $MgSO_4$ (X_2); concentração de glutamato monossódico (X_3) e concentração de glicerol (X_4) estão representadas pelos níveis codificados e reais (%), as respostas correspondem a 72 horas de fermentação.

	Variáveis				Respostas			
	X_1	X_2	X_3	X_4	Biomassa seca (g/L)	Rendimento (g/L)	Tensão superficial (mN/m)	E_{24} em querosene (%)
1	-1 (0,2)	-1 (0,05)	-1 (0,75)	-1 (2,0)	3,83	1,93	58,85	65,63
2	+1 (0,6)	-1 (0,05)	-1 (0,75)	-1 (2,0)	0,00	0,16	60,72	29,81
3	-1 (0,2)	+1 (0,15)	-1 (0,75)	-1 (2,0)	3,90	0,12	67,10	56,66
4	+1 (0,6)	+1 (0,15)	-1 (0,75)	-1 (2,0)	0,00	0,24	49,37	65,98
5	-1 (0,2)	-1 (0,05)	+1 (2,0)	-1 (2,0)	3,76	1,07	64,59	40,00
6	+1 (0,6)	-1 (0,05)	+1 (2,0)	-1 (2,0)	6,10	0,52	58,55	18,52
7	-1 (0,2)	+1 (0,15)	+1 (2,0)	-1 (2,0)	5,16	1,07	66,52	59,38
8	+1 (0,6)	+1 (0,15)	+1 (2,0)	-1 (2,0)	5,50	2,88	67,69	26,92
9	-1 (0,2)	-1 (0,05)	-1 (0,75)	+1 (4,0)	4,33	2,41	37,76	41,86
10	+1 (0,6)	-1 (0,05)	-1 (0,75)	+1 (4,0)	4,80	0,99	64,95	35,00
11	-1 (0,2)	+1 (0,15)	-1 (0,75)	+1 (4,0)	1,68	0,45	63,61	63,94
12	+1 (0,6)	+1 (0,15)	-1 (0,75)	+1 (4,0)	5,03	1,79	52,96	60,65
13	-1 (0,2)	-1 (0,05)	+1 (2,0)	+1 (4,0)	4,32	1,34	54,82	53,09
14	+1 (0,6)	-1 (0,05)	+1 (2,0)	+1 (4,0)	5,51	0,86	44,68	42,54

Continua

Variáveis				Respostas				
X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Biomassa seca (g/L)	Rendimento (g/L)	Tensão superficial (mN/m)	E ₂₄ em querosene (%)	
15	-1 (0,2)	+1 (0,15)	+1 (2,0)	+1 (4,0)	2,96	1,82	51,80	56,46
16	+1 (0,6)	+1 (0,15)	+1 (2,0)	+1 (4,0)	6,29	0,91	62,79	42,86
17	+2 (2,78E ⁻¹⁷)	0 (0,1)	0 (1,375)	0 (3,0)	2,04	1,35	56,94	45,00
18	+2 (0,8)	0 (0,1)	0 (1,375)	0 (3,0)	4,79	0,94	51,93	41,67
19	0 (0,4)	-2 (6,94E ⁻¹⁸)	0 (1,375)	0 (3,0)	3,44	0,71	52,34	24,27
20	0 (0,4)	+2 (0,2)	0 (1,375)	0 (3,0)	5,19	4,58	48,10	60,45
21	0 (0,4)	0 (0,1)	-2 (0,125)	0 (3,0)	3,73	1,14	45,00	62,33
22	0 (0,4)	0 (0,1)	2 (2,625)	0 (3,0)	5,54	1,82	57,50	32,06
23	0 (0,4)	0 (0,1)	0 (1,375)	-2 (1,0)	4,69	0,14	51,44	27,04
24	0 (0,4)	0 (0,1)	0 (1,375)	2 (5,0)	7,19	1,76	56,10	47,00
25	0 (0,4)	0 (0,1)	0 (1,375)	0 (3,0)	4,32	2,12	56,23	35,16
26	0 (0,4)	0 (0,1)	0 (1,375)	0 (3,0)	6,00	4,35	45,43	36,74
27	0 (0,4)	0 (0,1)	0 (1,375)	0 (3,0)	0	0,99	65,22	40,69
28	0 (0,4)	0 (0,1)	0 (1,375)	0 (3,0)	5,23	1,73	54,48	31,79

As respostas rendimento do biossurfactante (g/L) e tensão superficial (mN/m) não tiveram nenhuma variável significativa, ou seja, nenhuma alteração nas variáveis preditoras estão relacionadas à essas respostas, o máximo rendimento alcançado foi 4,35 g/L e a mínima tensão superficial foi 37,76 mN/m, porém tais resultados não podem ser considerados significativos. Já os efeitos que cada variável e suas interações exerceram sobre a produção do

biossurfactante em relação às respostas biomassa seca (g/L) e índice de emulsificação (E_{24}) estão apresentados na Tabela 4.4 e 4.5 respectivamente, e foram considerados significativos os parâmetros com valores de p menores do que 10 %.

Tabela 4.4. Coeficientes de regressão para a resposta Biomassa seca (g/L). Apenas os fatores com coeficientes significativos foram considerados ($p \leq 0,1$). As variáveis independentes: concentração de extrato de levedura (X_1); concentração de $MgSO_4$ (X_2); concentração de glutamato monossódico (X_3) e concentração de glicerol (X_4).

Fatores	Coeficiente de regressão	Erro Padrão	t calculado	p-valor
Média	0,19	0,01	13,61	0,0000
X_3	0,04	0,01	2,51	0,0194
$X_1.X_3$	0,03	0,02	1,73	0,0958
$X_1.X_4$	0,04	0,02	2,09	0,0474

Tabela 4.5. Coeficientes de regressão para a resposta Índice de Emulsificação E_{24} (%). Apenas os fatores com coeficientes significativos foram considerados ($p \leq 0,1$). As variáveis independentes: concentração de extrato de levedura (X_1); concentração de $MgSO_4$ (X_2); concentração de glutamato monossódico (X_3) e concentração de glicerol (X_4).

Fatores	Coeficiente de regressão	Erro Padrão	t calculado	p-valor
Média	42,192	2,303	18,32	$2,16E^{-14}$
X_1	-5,058	1,881	-2,689	0,013
X_2	7,449	1,881	3,961	0,0007
X_3	-5,846	1,881	-3,108	0,0053
X_3^2	2,589	1,759	1,471	0,1559
X_4	3,059	1,881	1,626	0,1187
$X_3.X_4$	4,173	2,303	1,811	0,0843

Para a resposta biomassa seca, foram significativas as variáveis X_3 e interação entre $X_1.X_3$ e $X_1.X_4$ sendo todos os coeficientes positivos (Tabela 4.5), indicando que quanto maior a concentração de glutamato monossódico (X_3), maior será a biomassa seca no intervalo de 72 horas, bem como para as interações entre concentração de extrato de levedura e glutamato monossódico e para a concentração de extrato de levedura e glicerol. A partir da ANOVA obtida, a regressão pode ser considerada significativa (Tabela 4.6), porém a falta de ajuste não foi significativa e o valor de $R^2 = 36,27\%$ não foi satisfatório, indicando falta de repetibilidade já que os valores preditos e experimentais estão discrepantes. Apesar da falta de repetibilidade que os resultados sugeriram, sabe-se que a quantidade e a natureza da fonte de carbono está intimamente relacionada ao crescimento e metabolismo microbiano. A síntese do biossurfactante isubtilina por *Bacillus subtilis*, por exemplo, é controlada pelo crescimento/densidade celular e a fase de crescimento microbiano (SÁNCHEZ et al., 2010), enquanto que a fonte de nitrogênio é um fator determinante para o rendimento do produto (SINGH et al., 2017; DHAGAT E JUJJAVARAPU, 2021). No entanto, Chooklin et al. (2014) relataram que o uso de glutamato monossódico como fonte de nitrogênio para a cepa *H. archaeon* AS65 além de promover um rendimento de 5,8 vezes maior que o obtido com o uso de sulfato de amônio $(NH_4)_2SO_4$, também aumentou a biomassa e potencializou os resultados de redução da tensão superficial e o E_{24} .

Para a resposta índice de emulsificação em querosene (E_{24}) as interações entre $X_3.X_4$ foram significativas, com um coeficiente negativo, indicando que as variáveis possuem uma relação inversamente proporcional. A variável X_1 (concentração de extrato de levedura) foi significativa, com um coeficiente negativo (-5,06), sugerindo que a mínima concentração poderia ser utilizada na otimização, o que diminui os custos do processo. Outra variável que não teve interação, mas foi significativa isoladamente, foi a concentração de $MgSO_4$ (X_2) com um coeficiente forte positivo, sendo uma variável que interfere na produção da emulsão do biossurfactante.

A proporção entre carbono e nitrogênio (C/N) no meio de cultivo é significativo e interfere no rendimento do biossurfactante (FONSECA et al., 2007). A fonte de nitrogênio e sua concentração é muito importante na produção do biossurfactante, seja ela de natureza orgânica ou inorgânica. Geralmente os íons nitrato são consumidos na fase estacionária do crescimento microbiano, a fase de produção de metabólitos secundários, e quando o biossurfactante é sintetizado. Muitos estudos indicam que em concentrações baixas de

nitrogênio nesta fase de crescimento, há um efeito de impedimento do metabolismo microbiano devido à insuficiência de transporte de nutrientes, sendo um fator essencial para a produção do biossurfactante e um alto rendimento na produção é alcançado (DAVIS; LYNCH, VARLEY, 1999; FONSECA et al., 2007; VIGNESHWARAN et al. 2018; DARWESH et al., 2021; KASHIF et al., 2022). No processo fermentativo quando é usado uma fonte orgânica simultaneamente com uma fonte inorgânica de nitrogênio, a assimilação do nitrogênio inorgânico é mais lenta, o que simula uma condição limitante (SARUBBO et al., 2022), no presente estudo, como as duas fontes de nitrogênio utilizadas (glutamato monossódico e extrato de levedura) são orgânicas, o fator limitante delas deve ser de utilizá-las em baixas concentrações como sugeriu o modelo. Segundo Casas e Ochoa (1999), observaram que utilizando baixas concentrações de extrato de levedura, *Candida bombicola* teve a produção de soforolipídios favorecida, fato que não ocorreu quando utilizado em grandes concentrações devido ao grande crescimento da biomassa e consequente exaustão da fonte de carbono.

Diversos outros fatores interferem na produção do biossurfactante, como condições de pH, temperatura, agitação, micro e macronutrientes. Um dos macronutrientes essenciais é o magnésio, que também auxilia na comunicação intercelular e síntese de proteínas, no presente estudo, a concentração de magnésio foi um fator determinante para a produção do biossurfactante com capacidade emulsificante, a presença de sais e consequentemente a salinidade do meio afeta o comportamento da emulsão do biossurfactante (KASHIF et al., 2022).

Tabela 4.6. Análise de variância ANOVA para os parâmetros Biomassa seca (g/L) e Índice de Emulsificação E_{24} (%).

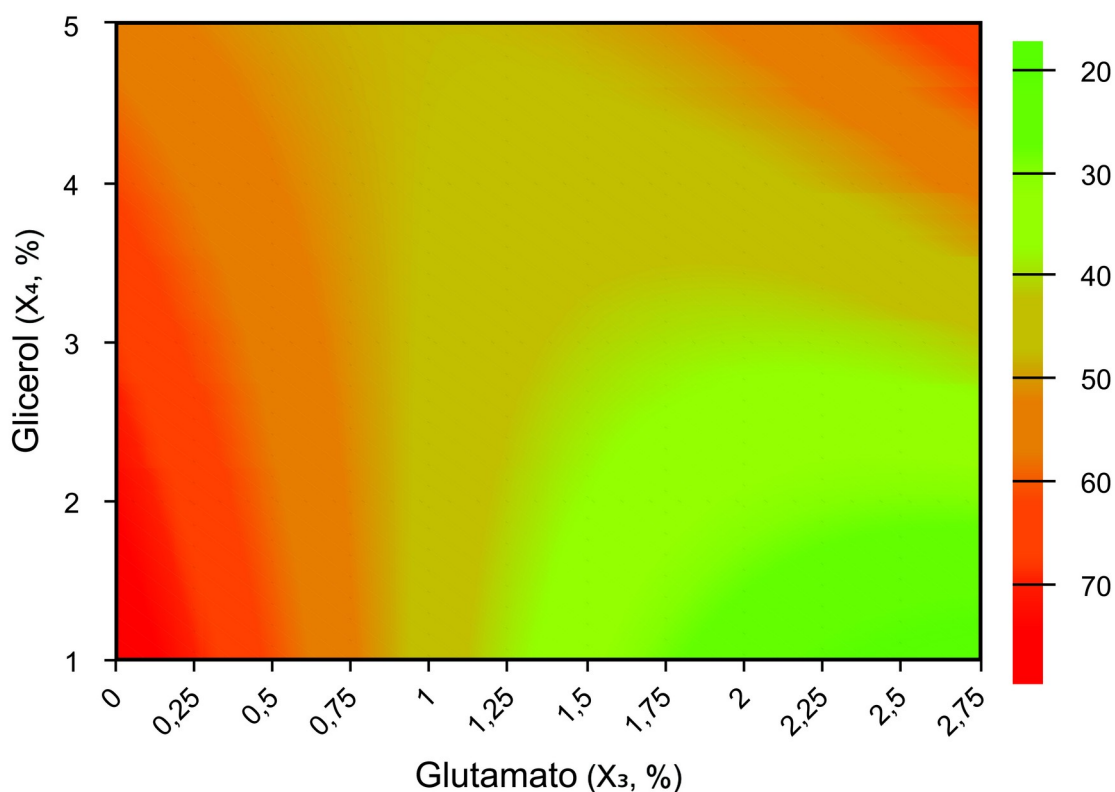
Fontes da variação	Soma dos quadrados		Graus de liberdade		Quadrados médios		F_{calc}	
	Biomassa	E_{24}	Biomassa	E_{24}	Biomassa	E_{24}	Biomassa	E_{24}
Regressão	0,1	3452,9	3	6	0,0	575,5	4,6	6,8
Resíduos	0,1	1782,7	24	21	0,0	84,9		
Total	0,2	5235,6	27	27	0,0	660,4		

Biomassa seca: $R^2 = 36,27\%$ | E_{24} : $R^2 = 65,95\%$

4.3.3 Produção de biossurfactante da condição otimizada

Com base nos dados estatísticos gerados nos ensaios do DCCR, os ensaios de validação da otimização da produção de biossurfactante pela cepa *Brevibacillus borstelensis* ISM04, visando alcançar uma máxima emulsão em querosene ($79,46 \% \pm 14,31$ conforme predito pelo modelo), tiveram as seguintes concentrações iniciais de acordo o gráfico gerado pelo modelo (Figura 4.2): X_1 – concentração de extrato de levedura (0,40 %); X_2 – concentração de $MgSO_4$ (0,10 %); X_3 – concentração de glutamato monossódico (0 %) e X_4 – concentração de glicerol (1,06 %), mantendo as demais concentrações dos reagentes conforme o meio de cultivo utilizado citado no item 4.2.4.

Figura 4.2. Curva de contorno para a produção de biossurfactante por *Brevibacillus borstelensis* ISM04 em função das variáveis glicerol e glutamato monossódico para a otimização da emulsão em querosene.



Nas condições otimizadas, a cepa *Brevibacillus borstelensis* ISM04 apresentou um consumo de glicerol de 96,79 % em 72 horas de fermentação, alcançando a fase estacionária de crescimento em torno de 12 horas e manteve-se estável até as 72 horas de ensaio (Figura 4.3). O índice de emulsificação aumentou ao longo do tempo, atingindo seu máximo ao final da fermentação (67,7 %) (Figura 4.4), sendo um forte indicador da presença de biosurfactante com capacidade emulsificante, pois manteve a emulsão estável de no mínimo 50 % dentro de 24 horas (WILLUMSEN e KARLSON, 1996). Apesar do resultado obtido estar dentro do desvio do valor previsto, ainda assim, o valor da predição foi melhor do que os valores experimentais, isso ocorre devido ao fato dessas ferramentas estatísticas maximizarem as funções, porém, réplicas biológicas e metabolismo podem interferir no resultado final. Dhagat e Jujjavarapu (2020) relataram um índice de emulsificação máximo de 58,13 % em 48 horas de fermentação com a cepa *Brevibacillus borstelensis* isolada de uma fonte de termal e utilizando glicose como fonte de carbono com o meio McKeen, a cepa atingiu a fase estacionária de crescimento em 24h de fermentação e manteve-se estável até 120 horas. Além disso, os autores também relataram uma diferença entre valores previstos e experimentais. Estes dados corroboram com a produção de um bioemulsificante durante a fase estacionária de crescimento microbiano, caracterizando um metabólito secundário.

Figura 4.3. A) Consumo de glicerol e B) Crescimento microbiano, da cepa *Brevibacillus borstelensis* ISM04 ao longo de 72h de fermentação.

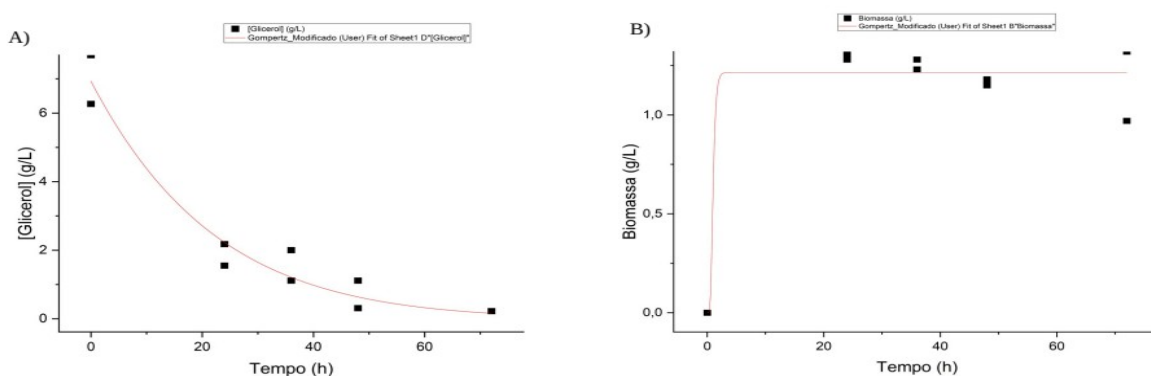
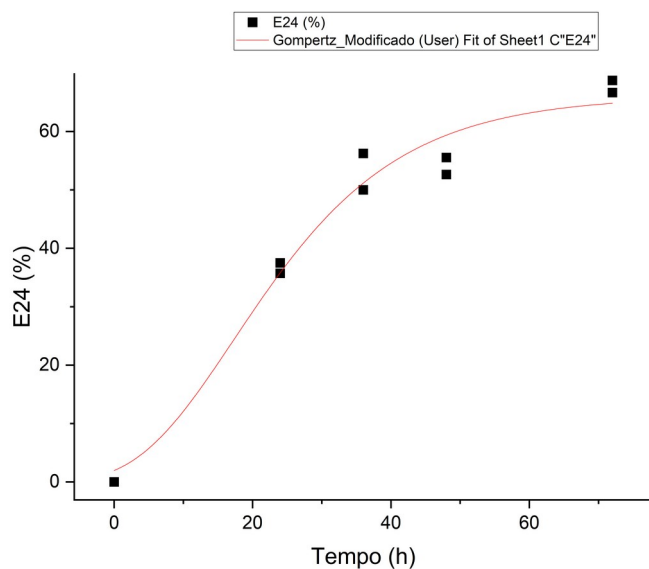
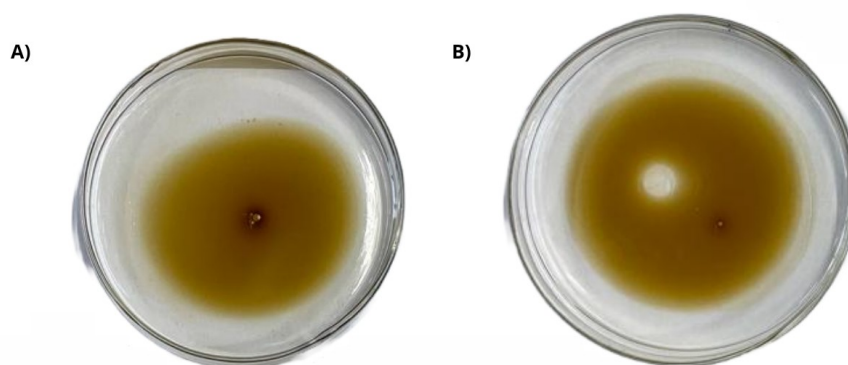


Figura 4.4. Índice de emulsificação alcançado pela cepa *Brevibacillus borstelensis* ISM04 em querosene ao longo de 72h de fermentação.



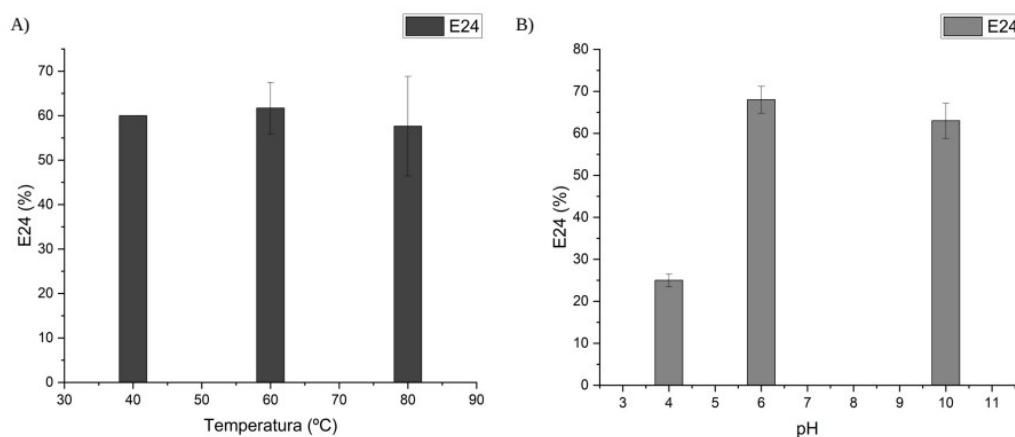
O teste de deslocamento de óleo realizado com o sobrenadante foi positivo, podendo observar a redução da tensão superficial da interface água/óleo de motor queimado a partir da formação de um halo (Figura 4.5), confirmando o potencial que a cepa utilizada possui para produzir agentes tensoativos utilizando glicerol como fonte de carbono. É um método simples, mas confiável na detecção da produção de biossurfactantes (PLAZA; ZJAWIONY; BANAT, 2006). Porém, apesar de uma molécula ter a capacidade de formar uma emulsão estável, tal característica não está relacionada à capacidade de reduzir a tensão superficial. Geralmente quando um microrganismo produz um biossurfactante de baixo peso molecular, este pode não produzir emulsões totalmente estáveis, enquanto que polímeros que atuam efetivamente na estabilização de emulsões, podem não reduzir tanto a tensão superficial (SILVA et al., 2010).

Figura 4.5. Teste de deslocamento de óleo realizado com o sobrenadante após 72h de fermentação da cepa *Brevibacillus borstelensis* ISM04. A) controle negativo água/óleo de motor, B) biossurfactante extraído/óleo de motor.



O biossurfactante mostrou-se termoestável (Figura 4.6A) nas temperaturas submetidas de 40 e 60 °C mantendo a emulsão em 60 %, porém, quando submetido à 80 °C o índice de emulsificação caiu para 57,6 %. Vigneshwaran et al. (2018) relataram que a cepa *Brevibacillus* sp. AVN 13 isolada de solo contaminado com petróleo, produziu um biossurfactante termoestável na faixa de temperatura de 30-90 °C em relação ao índice de emulsificação (72 %) e quando submetido a temperatura acima de 100 °C este caiu para 64 %.

Figura 4.6. Estabilidade do biossurfactante produzido por *Brevibacillus borstelensis* ISM04: A) estabilidade da emulsão em temperatura, B) estabilidade da emulsão em pH.



Quanto à estabilidade em pH, o índice de emulsificação manteve-se estável em 67 % entre pH 6 e 10, enquanto que em pH abaixo de 6 (4,0) a emulsão apresentou uma redução (Figura 4.6B), o que corrobora com Reddy et al. (2016), Sakthipriya et al. (2015) e Vigneshwaran et al. (2018) que também relataram instabilidade da emulsão do biossurfactante em pH mais ácido devido à precipitação parcial do mesmo, prejudicando a formação de micelas que se tornam menos carregadas negativamente em condições ácidas. A emulsão da surfactina produzida por *Bacillus subtilis*, em querosene manteve-se estável a 98 % em pH 11, porém, em pH 3,0 a emulsão não ocorreu, Long et al. (2017) explicaram tal fato pela ocorrência de ionização ou protonação do grupo carboxila na estrutura molecular da surfactina, causada pelo pH ácido. Portanto, o biossurfactante extraído de *Brevibacillus borstelensis* ISM04 mostrou-se mais estável em condições alcalinas do que em condições ácidas.

4.3.4 Fitotoxicidade do biossurfactante extraído em sementes de tomate e alface

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que o biossurfactante extraído não apresentou efeito inibitório na germinação das sementes testadas e nem no alongamento de suas raízes, alcançando um índice de germinação de 147 % contra sementes de *Solanum*

lycopersicum e 102 % contra sementes de *Lactuca sativa* além disso, também foi observado o crescimento foliar (Tabela 4.7). Tiquia et al. (1996), estabeleceram que o índice de germinação de 80 % é um indicador de ausência de fitotoxicidade.

Tabela 4.7. Fitotoxicidade do biossurfactante extraído de *Brevibacillus borstelensis* ISM04 contra *Solanum lycopersicum* e *Lactuca sativa* após 24h em imersão.

	Germinação relativa (%)	Comprimento radicular relativo (%)	Índice de germinação (%)
<i>Solanum lycopersicum</i>	100	147	147
<i>Lactuca sativa</i>	94,44	108	102

Outros índices encontrados na literatura com biossurfactantes foram os de Luna et al. (2013) que descreveram o biossurfactante produzido por *Candida sphaerica* UCP0995 não apresentando fitotoxicidade contra *Lactuca sativa* ao atingirem um índice máximo de germinação de 167 % na concentração de 0,5 g/L. Um índice de germinação de 136 % foi alcançado contra sementes de repolho utilizando biossurfactante produzido por *Candida lipolytica* UCP0988 (RUFINO et al., 2014).

Há ainda trabalhos relatando espécies de *Brevibacillus* como bons agentes de biocontrole na agricultura por sintetizarem moléculas antimicrobianas (RAY; PATEL; AMIN, 2020), promovendo um aumento significativo no índice de vigor das sementes de tomate e protegendo-o contra a doença do cancro bacteriano (GIRISH; UMESHA, 2005), e reduzindo o impacto causado pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* (CHANDEL; ALLAN; WOODWARD, 2010). *Brevibacillus brevis* também potencializou o crescimento de sementes de algodão através de ensaios de germinação (NEHRA; SAHARAN. CHOUDHARY, 2016).

4.3.5 Caracterização parcial do biossurfactante

A partir do teste de carga iônica com o biossurfactante extraído, foi possível visualizar a linha de precipitação no sentido do componente catiônico (CTAB), indicando que o biossurfactante produzido por *Brevibacillus borstelensis* ISM04 é de natureza aniônica (Figura 4.7), ou seja, sua porção hidrofílica é negativamente carregada. Os surfactantes de maneira geral, em sua porção apolar possuem uma cadeia composta de hidrocarboneto ao

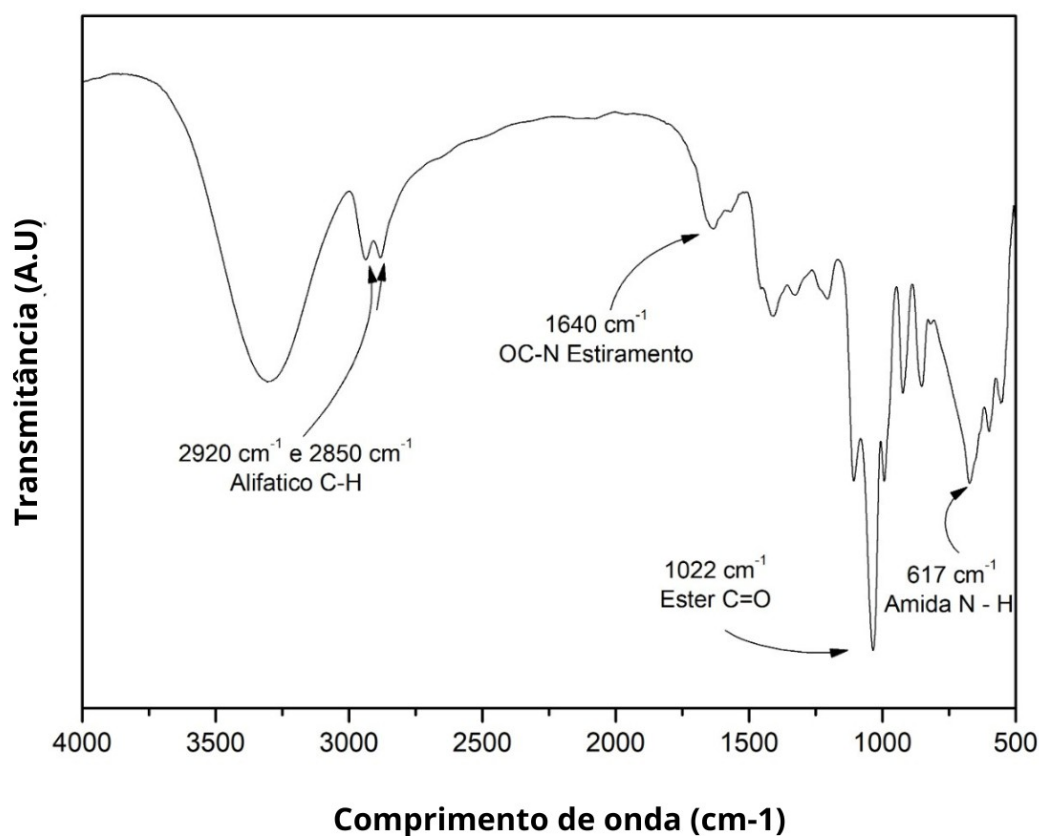
passo que a porção polar pode ser catiônica, aniônica ou não-iônica. A maioria dos biossurfactantes são aniônicos ou neutros, podendo ser desde pequenos ácidos graxos até grandes polímeros. Estudos reportaram que *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992 em meio contendo glicerol, *Corynebacterium aquaticum* usando resíduos de peixe e glicerol, *Rhizopus arrhizus* UCP 1607 em meio contendo glicerol bruto e licor de milho, produziram biossurfactantes de natureza aniônica (SILVA et al., 2010; MARTINS e MARTINS, 2018; PELE et al., 2019).

Figura 4.7. Carga iônica do biossurfactante produzido pela cepa *Brevibacillus borstelensis* ISM04, isolada de resíduo de manga, utilizando glicerol como fonte de carbono. A seta preta indica a linha de precipitação.



A partir do espectro obtido para o biossurfactante extraído (Figura 4.8) foi possível observar picos de absorção em 2920 cm^{-1} e 2850 cm^{-1} indicando o grupo C-H do alcano, confirmando a presença de cadeia alifática no composto. A presença do grupo éster indicada pela absorção em 1022 cm^{-1} , corresponde a -C=O no grupo -COOR e a banda em 1640 cm^{-1} de estiramento nas ligações OC-N ilustram a existência de grupamentos amina e ligações peptídicas na estrutura da molécula e a presença da ligação amida (617 cm^{-1}) N-H de amidas primárias confirma a fração peptídica. Portanto, esses resultados indicam fortemente que este biossurfactante possui natureza lipopeptídica.

Figura 4.8. Espectro infravermelho por transformada de Fourier do biossurfactante extraído produzido por *Brevibacillus borstelensis* ISM04 isolado de resíduo de manga em meio contendo glicerol como fonte de carbono.



4.4 CONCLUSÃO

Este estudo apresentou uma nova cepa isolada de resíduo de manga, *Brevibacillus borstelensis* ISM04 com capacidade para produzir um biossurfactante com potencial emulsificante, utilizando glicerol como fonte de carbono, uma fonte de carbono alternativa de baixo custo. A emulsão produzida mostrou-se estável em pH entre 6 e 10 e temperaturas até 80 °C. O biossurfactante extraído não apresentou toxicidade em sementes de *Solanum lycopersicum* e *Lactuca sativa* (tomate e alface, respectivamente). Os resultados sugerem tratar-se de um biossurfactante lipopeptídico, com potencial para uso em aplicações ambientais, em atividades de biorremediação e no campo agrícola devido a ausência de toxicidade.

4.5 REFERÊNCIAS

BONDIOLI, P.; BELLA, L.D. An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biosiesel. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 107 (3), p. 153-157, 2005.

CASAS, J.A.; GARCÍA-OCHOA, F. Sophorolipid production by *Candida bombicola*: medium composition and culture methods. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 88 (5), p. 488-494, 1999.

CHANDEL, S.; ALLAN, E.J.; WOODWARD, S. Biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *Lycopersici* on tomato by *Brevibacillus brevis*. **Journal of Phytopathology**, v. 158, p. 470-478, 2010.

CHOOKLIN, C.S.; MANEERAT, S.; SAIMMAI, A. Utilization of banana peel as a novel substrate for biosurfactant production by *Halobacteriaceae archaeon* AS65. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 173 (2), p. 624-645, 2014.

COOPER, D.G.; GOLDENBERG, B.G. Surface-active agentes from two *Bacillus* species. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 53, p. 224-229, 1987.

DARWESH, O.M.; MAHMOUD, M.S.; BARAKAT, K.M.; ABUELLIL, A.; AHMAD, M.S. Improving the bioremediation technology of contaminated wastewater using biosurfactants produced by novel bacillus isolates. **Heliyon**, v. 7, p. e08616, 2021.

DAS, A.J.; KUMAR, R. Utilization of agro-industrial waste for biosurfactant production under submerged fermentation and its application in oil recovery from sand matrix. **Bioresource Technology**, v. 260, p. 233-240, 2018.

DAVIS, D.A.; LYNCH, H.C.; VARLEY, J. The production of surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 322-329, 1999.

DHAGAT, S.; JUJJAVARAPU, S.E. Isolation of a novel thermophilic bacterium capable of producing high-yield bioemulsifier and its kinetic modelling aspects along with proposed metabolic pathway. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 135-143, 2020.

DHAGAT, S.; JUJJAVARAPU, S.E. Simulated annealing and artificial neural network as optimization tools to enhance yields of bioemulsifier and exopolysaccharides by thermophilic *Brevibacillus borstelensis*. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9 (4), p. 105499, 2021.

Di CAGNO, R.; CODA, R.; De ANGELIS, M.; GOBBETTI, M. Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. **Food Microbiology**, v. 33, p. 1-10, 2013.

FESSARD, A.; REMIZE, F. Genetic and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from tropically grown fruits and vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, v. 301, p. 61-72, 2019.

FONSECA, R.R.; SILVA, A.J.R.; De FRANÇA, F.P.; CARDOSO, V.L.; SÉRVULO, E.F.C. Optimizing carbon/nitrogen ratio for biosurfactant production by a *Bacillus subtilis* strain. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 134-140, p. 471-486, 2007.

GAUR, V.K.; SHARMA, P.; GUPTA, S.; VARJANI, S.; SRIVASTAVA, J.K.; WONG, J.W.C.; NGO, H.H. Opportunities and challenges in omics approaches for biosurfactant production and feasibility of site remediation: strategies and advancements. **Environmental Technology & Innovation**, v. 25. p. 102-132, 2022.

GIRISH, N.; UMESHA, S. Effect of plant growth promoting rhizobacteria on bacterial canker of tomato. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 38 (8), p. 235-243, 2005.

KASHIF, A.; REHMAN, R.; FUWAD, A.; SHAHID, M.K.; DAYARATHNE, H.N.P.; JAMAL, A.; AFTAB, M.N.; MAINALI, B.; CHOI, Y. Current advances in the classification, production, properties and applications of microbial biosurfactants – A critical review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 306, p. 102718, 2022.

KIRAN, G.S.; HEMA, T.A.; GANDHIMATHI, R.; SELVIN, J.; THOMAS, T.A.; RAVJI, T.R.; NATARAJASEENIVASAN, K. Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 73, p. 250-256, 2009.

KUMAR, A.P.; JANARDHAN, A.; VISWANATH, B.; MONIKA, K.; JUNG, J-Y.; NARASIMBA, G. Evaluation of Orange peel for biosurfactant production by *Bacillus licheniformis* and their ability to degrade naphthalene and crude oil. **Biotech**, v. 6, n. 23, 2016.

LONG, X.; HE, N.; HE, Y.; JIANG, J.; WU, T. Biosurfactant surfactin with pH-regulated emulsification activity for efficient oil separation when used as emulsifier. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 200-206, 2017.

LUNA, J.M.; RUFINO, R.D.; SARUBBO, L.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Characterization, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 202-209, 2013.

MARCELINO, P.R.F.; PERES, G.F.D.; TÉRAN-HILARES, R.; PAGNOCCA, F.C.; ROSA, C.A.; LACERDA, T.M.; SANTOS, J.C.; SILVA, S.S. Biosurfactants production by yeasts using sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate as new sustainable alternative for lignocellulosic biorefineries. **Industrial Crops & Products**, v. 129, p. 212-223, 2019.

MARTINS, P.C.; MARTINS, V.G. Biosurfactant production from industrial wastes with potential remove of insoluble paint. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 127, p. 10-16, 2018.

MEYLHEUC, T.; VAN, O.; BELLON-FONTAINE, M.N. Adsorption of biosurfactants on solid surfaces and consequences regarding the biohesion of *Listeria monocytogenes* LO28. **Journal Applied Microbiology**, v. 91, p. 822-832, 2001.

MULLIGAN, C.N.; COOPER, D.G.; NEUFELD, R.J. Selection of microbes producing biosurfactants in media without hydrocarbons. **J. Ferment. Technol.**, v. 62, p. 311-314, 1984.

NEHRA, V.; SAHARAN, B.S.; CHOUDHARY, M. Evaluation of *Brevibacillus brevis* as a potential plant growth promoting rhizobacteria for cotton (*Gossypium hirsutum*) crop. **SpringerPlus**, v. 5, p. 948, 2016.

PARAMITHIOTIS, S.; DOULGERAKI, A.I.; TSILIKIDIS, I.; NYCHAS, G-J.E.; DROSINOS, E.H. Fate of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium during spontaneous cauliflower fermentation. **Food Control**, v. 27, p. 178-183, 2012.

PELE, M.A.; RIBEAUX, D.R.; VIEIRA, E.R.; SOUZA, A.F.; LUNA, M.A.C.; RODRÍGUEZ, D.M.; ANDRADE, R.F.S.; ALVIANO, D.S.; ALVIANO, C.S.; BARRETO-BERGTER, E.; SANTIAGO, A.L.C.M.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Conversion of renewable substrates for biosurfactant production by *Rhizopus arrhizus* UCP 1607 and enhancing the removal of diesel oil from marine soil. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 38, p. 40-48, 2019.

PLAZA, G.A.; ZJAWIONY, I.; BANAT, I.M. Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 50, p. 71-77, 2006.

PRUTHI, V.; CAMEOTRA, S.S. Effect of nutrients on optimal production of biosurfactants by *Pseudomonas putida* – a Gujarat oil field isolate. **Journal Surfactant and Detergents**, v. 6, p. 65-68, 2003.

RAY, S.; PATEL, N.; AMIN, D. *Brevibacillus*. In: **Beneficial Microbes in Agro-Ecology**, Elsevier, p. 149-167, 2020.

REDDY, K.S.; KHAN, M.Y.; ARCHANA, K.; REDDY, G.; HAMEEDA, B. Utilization of mango kernel oil for the rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* DR1 towards its application as biocontrol agent. **Bioresource Technology**, v. 221, p. 291-299, 2016.

RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; TAKAKI, G.M.C.; SARUBBO, L.A. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, p. 34-38, 2014.

SAKTHIPRIYA, N.; DOBLE, M.; SANGWAI, J.S. Biosurfactant from *Pseudomonas* species with waxes as carbon source – their production, modeling and properties. **Journal of Industrial and Engineering**, v. 31, p. 100-111, 2015.

SÁNCHEZ, S.; CHÁVEZ, A.; FORERO, A.; GARCÍA-HUANTE, Y.; ROMERO, A.; SÁNCHEZ, M.; ROCHA, D.; SÁNCHEZ, B.; ÁVALOS, M.; GUZMÁN-TRAMPE, S.; RODRÍGUEZ-SANOJA, R.; LANGLEY, E.; RUIZ, B. Carbon source regulation of antibiotic production. **The Journal of Antibiotics**, v. 63, p. 442-459, 2010.

SARUBBO, L.A.; SILVA, M.G.C.; DURVAL, I.J.B.; BEZERRA, K.G.O.; RIBEIRO, B.G.; SILVA, I.A.; TWIGG, M.S.; BANAT, I.M. Biosurfactants: production, properties, applications, trends, and general perspectives. **Biochemical Engineering Journal**, v. 181, p.

108377, 2022.

SHEKHAR, S.; SUNDARAMANICKAM, A.; BALASUBRAMANIAN, T. Biosurfactant producing microbes and its potential applications: A Review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, p. 37–41, 2014.

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 and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79(1), p. 174-183, 2010.

SINGH, R.; MIRIYALA, S.S.; GIRI, L.; MITRA, K.; KAREENHALLI, V.V. Identification of unstructured model for subtilin production through *Bacillus subtilis* using hybrid genetic algorithm. **Process Biochemistry**, v. 60, p. 1-12, 2017.

SUWANSUKHO, P.; RUKACHISIRIKUL, V.; KAWAI, F.; H-KITTIKUM, A. Production and applications of biosurfactant from *Bacillus subtilis* MUV4. Songklanakarin. **J. Sci. Technol.** v. 30, p. 87–93, 2008.

TABATABAEE, A.; ASSADI, M. M.; NOOHI, A. A.; SAJADIAN, V. A. Isolation of biosurfactant producing bacteria from oil reservoirs. **J. Environ. Health Sci. Eng.**, v. 2, n. 1, p. 6–12, 2005.

TIQUIA, S.M.; TAM, N.F.; HODGKISS, I.J. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. **Environmental Pollution**, v. 93 (3), p. 249-256, 1996.

VIGNESHWARAN, C.; SIVASUBRAMANIAN, V.; VASANTHARAJ, K.; KRISHNANAND, N.; JEROLD, M. Potential of *Brevibacillus* sp. AVN 13 isolated from crud oil-contaminated soil for biosurfactant production and its optimization studies. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6 (4), p. 4347-4356, 2018.

YOUSSEF, N.H.; DUNCAN, K.E.; NAGLE, D.P.; SAVAGE, K.N.; KNAPP, R.M.; McINERNY, M.J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, p. 339-347, 2004.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo disponibilizou uma nova forma de analisar dados metagenômicos, para a prospecção de genes relacionados à biossíntese de biossurfactantes, por meio do *pipeline* proposto BioSurfDB+MEGAN, onde promoveu a integração de um banco de dados de domínio específico (BioSurfDB) ao MEGAN, facilitando e direcionando as análises a genes de interesse.

Através das análises metagenômica e de recuperação de MAGs de resíduos de frutas, foi estabelecido que a microbiota associada à esses resíduos são uma fonte potencial para a produção de biossurfactantes, especialmente lipopeptídios. As amostras apresentaram um *common core* formado por Gammaproteobacteria. Dos 10 MAGs recuperados em alta qualidade, o MAG atribuído taxonomicamente a *Brevibacillus laterosporus* destacou-se por apresentar grande parte das leituras e pelo potencial genético relacionado à biossíntese de lipopeptídios.

Este estudo também mostrou que a bactéria *Brevibacillus borstelensis* ISM04 isolada de resíduo de manga foi capaz de produzir biossurfactante utilizando glicerol como fonte alternativa de carbono. Os resultados sugerem que o biossurfactante produzido é de natureza lipopeptídica, demonstrou atividade emulsificante em querosene e estabilidade em pH entre 6 e 10 e em temperaturas até 80 °C e ausência de toxicidade para a germinação de sementes de alface e tomate,

Os resultados deste trabalho podem ser extrapolados para futuras pesquisas, empregando outros substratos como fonte alternativa de carbono, no processo fermentativo na produção de biossurfactantes, visando a redução de resíduos e gerando valor agregado. Ademais, os biossurfactantes lipopeptídios, dependendo de suas características podem ser aplicados na biorremediação em derramamentos de hidrocarbonetos, na indústria agrícola como fertilizantes ou agentes de biocontrole, bem como moléculas antimicrobianas.

APENDICE – A

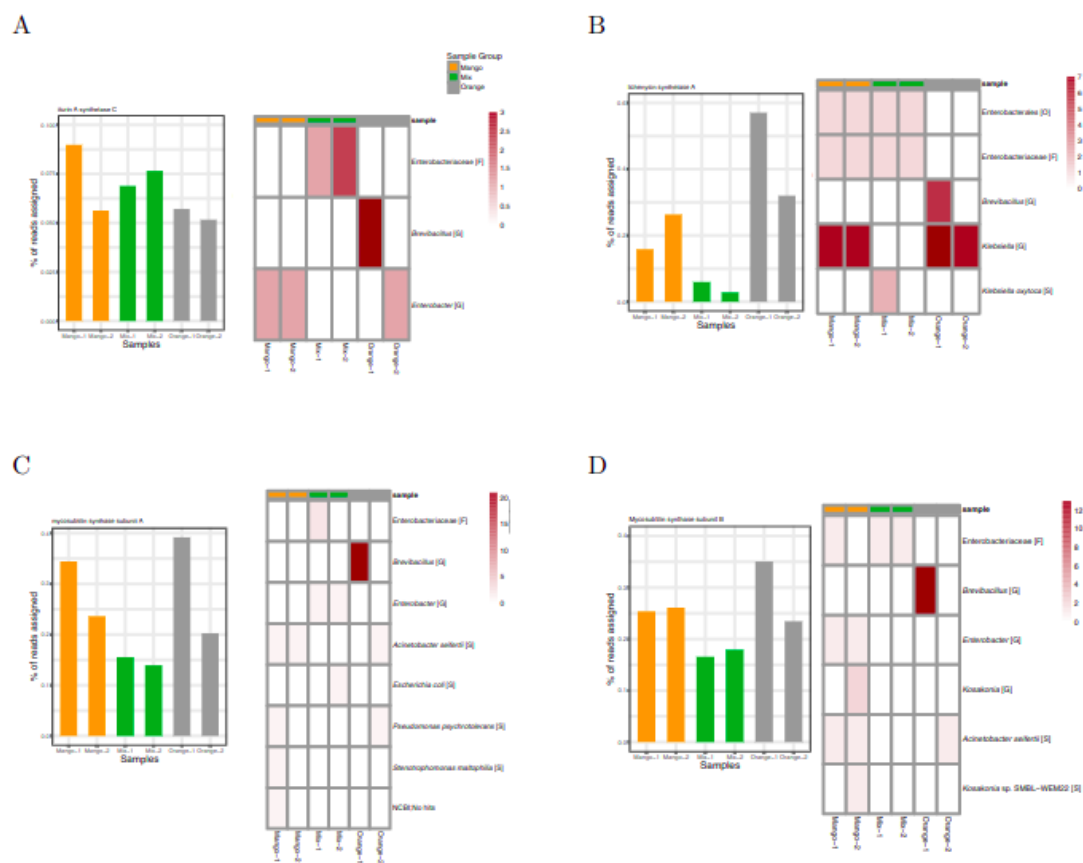


Figura A2.1. Taxonomia atribuída a genes relacionados na biossíntese de iturina A (A), liquenisin (B) e microsubitilina (C e D), os *heatmaps* ao lado de cada gene representam a quantidade de *contigs* atribuídos a uma determinada taxonomia.

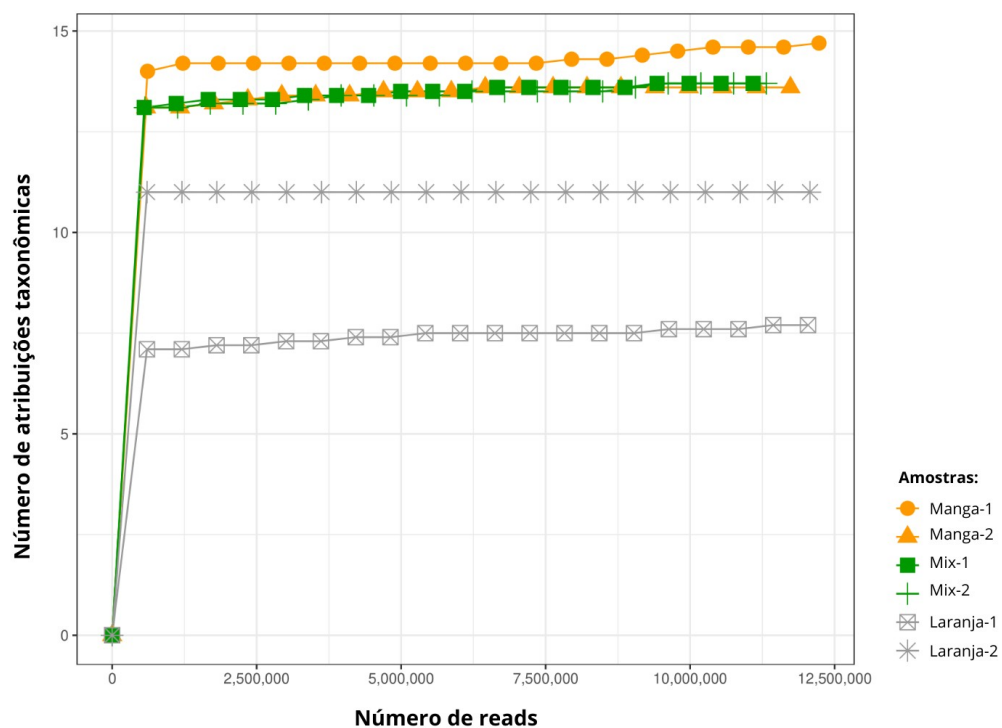


Figura A2.2. Curvas de rarefação mostrando a diversidade de gêneros em função do número de leituras.

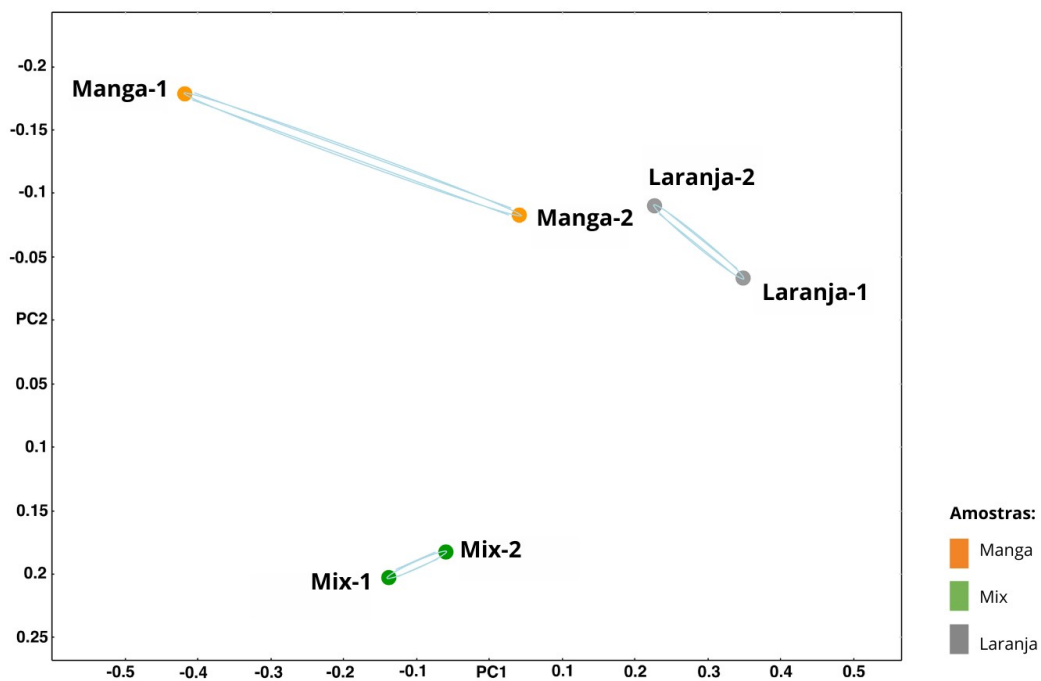


Figura A2.3. Análise da beta diversidade, as distâncias de Bray-Curtis foram calculadas a partir de contagens de gênero com os dados normalizados e submetidos a uma análise de coordenadas principais (PCoA), mostrando as duas primeiras coordenadas principais.

APENDICE – B

Tabela B1.1 – Lista de KOs de interesse, oriundos do banco de dados KEGG criada para direcionar a prospecção de genes relacionados a biossíntese de biossurfactantes.

KO	Gene	Definição	Classificação produção de biossurfactante	Referência
K00001	adh	alcohol dehydrogenase	Metabolismo de hidrocarbonetos	Phetcharat et al (2019)
K00016	ldh	L-lactate dehydrogenase	Metabolismo de hidrocarbonetos	Phetcharat et al (2019)
K00059	fabG	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase	Metabolismo de ácidos graxos	Phetcharat et al (2019)
K00067	rmlD	dTDP-4-dehydrorhamnose reductase	Biossíntese de metabólitos secundários	Phetcharat et al (2019)
K00208	fabI	enoyl-[acyl-carrier protein] reductase I	Metabolismo de ácidos graxos	Vasconcellos et al (2016)
K00209	fabV	enoyl-[acyl-carrier protein] reductase	Metabolismo de ácidos graxos	Vasconcellos et al (2016)
K00446	dmpB	Catechol 2,3-dioxygenase	Metabolismo de hidrocarbonetos	Phetcharat et al (2019)
K00455	hpaD	3,4-dihydroxyphenylacetate 2,3-dioxygenase	Metabolismo de hidrocarbonetos	Phetcharat et al (2019)
K00496	alkM	alkane 1-monooxygenase	Metabolismo de ácidos graxos	Gomes et al (2016)
K00551	pemt	phosphatidylethanolamine	Metabolismo de lipídios	BiosurfDB
K00645	ituD	Malonyl CoA-acyl-carrier protein transacylase	Metabolismo de ácidos graxos	Vasconcellos et al (2016); BiosurfDB; Plaza et al (2015)

Continua

KO	Gene	Definição	Classificação produção de biosurfactante	Referência
K00647	fabB	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase I	Metabolismo de ácidos graxos	Vasconcellos et al (2016)
K00648	fabH	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] syntase III	Metabolismo de ácidos graxos	Vasconcellos et al (2016)
K00655	plsC	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase	Metabolismo de lipídios	Vasconcellos et al (2016)
K00697	otsA	trehalose-6-phosphate phosphatase synthase	Biossíntese de metabólitos secundários	BiosurfDB
K00912	lpxK	tetraacyldisaccharide 4'-kinase	Biossíntese de lipopolissacarídeos	Vasconcellos et al (2016)
K00973	rmlA	glucose-1-phosphate thymidyltransferase	Biossíntese de metabólitos secundários	Vasconcellos et al (2016)
K01087	ostB	trehalose-6-phosphate phosphatase	Biossíntese de metabólitos secundários	BiosurfDB
K01692	paaF, echA	Enoyl-CoA hydratase	Metabolismo de ácidos graxos	Phetcharat et al (2019)
K01710	rmlB		Biossíntese de metabólitos secundários	Maier e Soberón-Chavez (2000); Abdel-Mawgoud et al (2010)
K01715	crt	Enoyl-CoA hydratase	Metabolismo de ácidos graxos	Maier e Soberón-Chavez (2000); Abdel-Mawgoud et al (2010)

Continua

KO	Gene	Definição	Classificação produção de biosurfactante	Referência
K01782	fadJ	Enoyl-CoA hydratase	Metabolismo de ácidos graxos	Maier e Soberón- Chavez (2000); Abdel-Mawgoud et al (2010)
K01790	rmlC		Biossíntese de metabólitos secundários	Maier e Soberón- Chavez (2000); Abdel-Mawgoud et al (2010)
K01825	fadB	Enoyl-CoA hydratase	Metabolismo de ácidos graxos	Maier e Soberón- Chavez (2000); Abdel-Mawgoud et al (2010)
K01946-		Biotin carboxylase of acetyl-CoA carboxylase	Metabolismo de ácidos graxos	Vasconcellos et al (2016)
K01961 -		Biotin carboxylase of acetyl-CoA carboxylase	Metabolismo de ácidos graxos	Vasconcellos et al (2016)
K02371 -		enoyl-[acyl-carrier protein] reductase	Metabolismo de ácidos graxos	Vasconcellos et al (2016)
K02527	waaA	3-deoxy-D-manno-octulosonic- acid transferase	Biossíntese de lipopolissacarídi os	Vasconcellos et al (2016)
K02759	licA3	lichenan-specific phosphotransferase enzyme	Biossíntese de lipopeptídios	Phetcharat et al (2019)
K06076	fadL	long-chain fatty acid transport protein	Metabolismo de ácidos graxos	Phetcharat et al (2019)
K06133	sfp	4'-phosphopantetheinyl transferase	Biossíntese de lipopeptídios	Jimoh e Lin (2019); Plaza et al (2015) – explicação de como atua

Continua

KO	Gene	Definição	Classificação produção de biosurfactante	Referência
K07272	rgpF	Rhamnosyltransferase	Biossíntese de lipopolissacarídeos	Phetcharat et al (2019)
K07514	EHHADH	Enoyl-CoA hidratase	Metabolismo de ácidos graxos	Phetcharat et al (2019)
K10616-		alkane 1-monoxygenase	Metabolismo de hidrocarbonetos	Phetcharat et al (2019)
K12986	waaS, rfaS	1,5-rhamnosyltransferase	Biossíntese de lipopolissacarídeos	Phetcharat et al (2019)
K12987	migA	alpha-1,6-rhamnosyltransferase	Biossíntese de lipopolissacarídeos	Phetcharat et al (2019)
K12988	wapR	alpha-1,3-rhamnosyltransferase	Biossíntese de lipopolissacarídeos	Phetcharat et al (2019)
K12990	rhIC, rfbF	rhamnosyltransferase	Biossíntese de ramnolipídios	Phetcharat et al (2019); Maier e Soberón-Chavez (2000); Araújo et al (2020)
K12992	rfbN	rhamnosyltransferase	Biossíntese de lipopolissacarídeos	BiosurfDB
K13061	rhII	rhamnosyltransferase subunit B	Biossíntese de ramnolipídios	BiosurfDB
K13767	fadB	Enoyl-CoA hidratase	Metabolismo de ácidos graxos	BiosurfDB
K15016-		Enoyl-CoA hidratase	Metabolismo de ácidos graxos	BiosurfDB

Continua

KO	Gene	Definição	Classificação produção de biosurfactante	Referência
K15312	pksh	Enoyl-CoA hydratase	Metabolismo de ácidos graxos	BiosurfDB
K15313	pksl	Enoyl-CoA hydratase	Metabolismo de ácidos graxos	BiosurfDB
K15654	srfAA	-	Produção de surfactina	Vasconcellos et al (2016); Araújo et al (2020)
K15655	srfAB	-	Produção de surfactina	Vasconcellos et al (2016); Araújo et al (2020)
K15656	srfAC	-	Produção de surfactina	Vasconcellos et al (2016); Araújo et al (2020)
K15657	srfATE, srfAD	-	Produção de surfactina	Vasconcellos et al (2016)
K15661	bmyA, ituA	-	Biossíntese de lipopeptídios	BiosurfDB ; Plaza et al (2015)
K15662	bmyB, ituB	-	Biossíntese de lipopeptídios	BiosurfDB
K15663	bmyC, ituC	-	Biossíntese de lipopeptídios	BiosurfDB ; Plaza et al (2015)
K15664	ppsA, fenC	-	Biossíntese de fengicina	BiosurfDB ; Plaza et al (2015)
K15665	ppsB, fenD	-	Biossíntese de fengicina	BiosurfDB ; Plaza et al (2015)
K15666	ppsC, fenE	-	Biossíntese de fengicina	BiosurfDB ; Plaza et al (2015)
K15667	ppsD, fenA	-	Biossíntese de fengicina	BiosurfDB ; Plaza et al (2015)

Continua

KO	Gene	Definição	Classificação produção de biosurfactante	Referência
K15668	ppsE, fenB	-	Biossíntese de fengicina	Plaza et al (2015)
K15757		alkane 1-monooxygenase	Metabolismo de hidrocarbonetos	Gomes et al (2016)
K16119	licA	lichenysin synthetase A	Biossíntese de lipopeptídios	BiosurfDB
K18100	rhIA	Rhamnosyltransferase subunit A	Biossíntese de ramnolipídios	Phetcharat et al (2019); Maier e Soberón-Chavez (2000); Araújo et al (2020)
K18101	rhIB	rhamnosyltransferase subunit B	Biossíntese de ramnolipídios	Phetcharat et al (2019); Maier e Soberón-Chavez (2000); Araújo et al (2020)
K20391	plcR	transcriptional activator plcR	Biossíntese de ramnolipídios	BiosurfDB