

## **PRODUÇÃO TÉCNICA ITV DS**

### **CATEGORIZAÇÃO FUNCIONAL DE PROTEÍNAS DE UM CULTIVO BIOLÓGICO DA BACTÉRIA *RHODOCOCCUS OPACUS***

### **RELATÓRIO FINAL DE PESQUISA**

Aline Madeira Marques Saraiva  
Lana Patrícia da Silva Fonseca  
Rafael Borges da Silva Valadares

Belém – PA  
Agosto/2019

<b>TÍTULO:</b> Investigação da rota metabólica da produção de biossurfactantes na bactéria <i>Rhodococcus opacus</i>	
<b>PROD. TEC. ITV DS - N009.2019</b>	Revisão
<b>Classificação:</b> ( ) Confidencial ( ) Restrita ( ) Uso Interno ( x ) Pública	00

**Informações Confidenciais** - Informações estratégicas para o Instituto e sua Mantenedora. Seu manuseio é restrito a usuários previamente autorizados pelo Gestor da Informação.

**Informações Restritas** - Informação cujo conhecimento, manuseio e controle de acesso devem estar limitados a um grupo restrito de empregados que necessitam utilizá-la para exercer suas atividades profissionais.

**Informações de Uso Interno** - São informações destinadas à utilização interna por empregados e prestadores de serviço

**Informações Públicas** - Informações que podem ser distribuídas ao público externo, o que, usualmente, é feito através dos canais corporativos apropriados

### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S243

Saraiva, Aline Madeira Marques.

Categorização funcional de proteínas de um cultivo biológico de bactéria *Rhodococcus opacus*. / Aline Madeira Marques Saraiva, Lana Patrícia da Silva Fonseca, Rafael Borges da Silva Valadares. -- Belém, 2019.

31 f. : il.

1. Biotecnologia. 2. Biossurfactante. 3. *Rhodococcus opacus*. I. Fonseca, Lana Patrícia da Silva. II. Valadares, Rafael Borges da Silva. II. Título

CDD 23. ed. 660.6

Bibliotecária responsável: Nisa Gonçalves / CRB 2 – 525

## RESUMO EXECUTIVO

O conhecimento das rotas metabólicas e da fisiologia da bactéria *Rhodococcus opacus* permitiu compreender como as reações orgânicas impactam o micro-organismo e a produção de biosurfactantes. A amostra analisada neste relatório apresenta no metabolismo do amido e sacarose, a reação de conversão de glicose em trealose, composto constituinte da parede celular de *Rhodococcus* e carreador de ácido micólico. A identificação da presença de enzimas e proteínas da via de produção de trealose na bactéria *Rhodococcus opacus* deve estar associada a produção de glicolipídeos do tipo trealolípídios. O conhecimento das rotas envolvidas na produção do biosurfactante pode ser útil para o aprimoramento e aumento da eficiência do processo.

**Palavras-chave:** Biosurfactante. *Rhodococcus opacus*. Rota metabólica.

## ABSTRACT

Knowledge of the metabolic pathways and physiology of *Rhodococcus opacus* bacteria allowed us to understand how the organic reactions impact the microorganism. The sample analyzed in this report presents in the metabolism of starch and sucrose, the reaction of conversion of glucose to trehalose, *Rhodococcus* cell wall compound and mycolic acid carrier. The identification of enzymes and proteins of the trehalose production pathway in *Rhodococcus opacus* bacteria should be associated with the production of trehalolipid glycolipids. Knowledge of the routes involved in biosurfactant production can be useful for improving and increasing process efficiency.

**Keywords:** Biosurfactant. Metabolic Pathways. *Rhodococcus opacus*.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>06</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>08</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	08
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	08
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>09</b>
3.1	CULTIVO E CRESCIMENTO DA BACTÉRIA <i>RHODOCOCCLUS OPACUS</i> .....	09
3.2	EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS .....	10
3.3	DIGESTÃO DAS PROTEÍNAS .....	11
3.4	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA BIDIMENSIONAL ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA .....	12
3.5	BIOINFORMÁTICA .....	12
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>14</b>
4.1	QUANTIFICAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE PROTEÍNAS .....	14
4.2	CATEGORIZAÇÃO FUNCIONAL .....	16
4.3	ENZIMAS .....	19
4.4	IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS NO METABOLISMO BACTERIANO .....	20
4.5	ROTA METABÓLICA DA BIOSÍNTESE DE TREALOSE .....	22
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES .....</b>	<b>24</b>
<b>6</b>	<b>APLICAÇÕES POTENCIAIS .....</b>	<b>25</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>26</b>
	<b>APÊNDICES</b>	

## 1 INTRODUÇÃO

O enfoque no beneficiamento de minérios de baixa qualidade e alta complexidade, devido à crescente demanda por minerais, aliado ao esgotamento de depósitos; trouxe uma nova realidade para a pesquisa científica (ROSÁRIO, 2017). É o caso da bactéria *Rhodococcus opacus* capaz de sintetizar compostos com propriedades surfactantes como subprodutos metabólicos. Estes micro-organismos são capazes de produzir biosurfactantes, compostos anfifílicos que atuam na interface das emulsões, contendo partes hidrofóbicas e hidrofílicas e que, em termos de tensão superficial, estabilidade à temperatura e pH, são comparáveis, ou superiores, aos surfactantes sintéticos.

Algumas bactérias efetuam mudanças na química superficial dos minerais, devido a presença de grupos apolares (cadeias hidrocarbônicas) e grupos polares (carboxilas, fosfatos, hidroxilas) na parede celular microbiana, possibilitando o uso dos produtos metabólicos (proteínas e polissacarídeos) como agentes coletores e modificadores (ROSÁRIO, 2017; RAO, VILINSKA, CHERNYSHOVA, 2010; VILINSKA, RAO, 2008) Estes grupos, quando ionizados, formam sítios ativos capazes de adsorver espécies iônicas presentes no sistema mineral, mediante vários mecanismos de adsorção (específicos e não específicos), como: troca iônica, ligações químicas e interações eletrostáticas (OLIVEIRA, 2015). O mecanismo de adsorção é o papel de biosurfactante da bactéria.

A amostra trabalhada neste relatório refere-se a um cultivo biológico do gênero *Rhodococcus* (Tabela 1). Esta bactéria produz biosurfactantes classificados como glicolipídios do tipo trealolipídio, que na sua composição contêm um dissacarídeo trealose unido a grupos de ácidos graxos, por ligação éster (Figura 2) (OLIVERA, 2018; DHANARAJAN, SEN, 2014), e estão envolvidos na assimilação de hidrocarbonetos de baixa polaridade. (COLLA, COSTA, 2003; SHAFI, KHANNA, 1995). Os biosurfactantes da classe glicolipídeos são amplamente utilizados em tecnologias de biorremediação e bioflotação mineral, devido à disponibilidade de hidrocarbonetos (OLIVEIRA, 2018; DHANARAJAN, SEN, 2014).

As vias do metabolismo central deste gênero de micro-organismo são altamente conservadas. Produzem energia e metabólitos intermediários, não somente em períodos de crescimento, mas também sob condições de estresse, com aparente metabolismo de compostos de reserva. Podendo transformar diferentes hidrocarbonetos em lipídeos, e estes

são utilizados como carbono e energia para manter a viabilidade da célula (HERNÁNDEZ *et al.*, 2008, 2017, 2019; ALVAREZ, 2003; ALVAREZ *et al.*, 1997; ANDERSON *et al.*, 1995).

Os lipídeos de trealose, composição dos biossurfactantes característicos deste gênero de bactérias são parte da parede celular das espécies de *Rhodococcus*. E são produzidos na superfície ativa durante o crescimento em meio de cultura rico em cadeias longas de n-alcanos. A liberação de biossurfactante, a partir da biossíntese de trealose, pode ser observada na Figura 5.

O presente relatório propõe a comprovação da atividade das rotas metabólicas através da anotação funcional do proteoma de *Rhodococcus opacus* em meio de cultura. O domínio destas vias pode ser útil para o aprimoramento da produção de biossurfactantes visando a aplicação como biorreagente na flotação de minério de ferro.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o proteoma da bactéria *Rhodococcus opacus* em busca de rotas metabólicas p na produção de biossurfactantes úteis para a flotação de minério de ferro.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Identificar lista de proteínas presentes no cultivo biológico de *Rhodococcus opacus*.
- b) Mapear as proteínas e peptídeos identificados em categorias funcionais e identificar rotas metabólicas possivelmente envolvidas na produção de biossurfactantes.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 CULTIVO E CRESCIMENTO DA BACTÉRIA *RHODOCOCCUS OPACUS*

A bactéria *Rhodococcus opacus* foi fornecida pela Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria – CBMAI – UNICAMP.

Fez-se a propagação das bactérias em meio sólido utilizando placas de Petri, mantidas em refrigerador a 2°C. Para a propagação (em meio sólido) e crescimento (em meio líquido) das células *Rhodococcus opacus*, o meio de cultura TSB (Caldo Triptona Soja) foi empregado, conforme é mostrado na tabela 1.

O procedimento de inoculação do micro-organismo foi realizado em capela de fluxo laminar previamente esterilizada com lâmpada germicida de luz ultravioleta para evitar contaminação microbiana.

**Tabela 1** - Meio de cultura TSB

<b>Componente</b>	<b>Sólido (g/l)</b>	<b>Líquido (g/l)</b>
Extrato de caseína	17	17
Extrato de farinha de soja	3	3
Cloreto de sódio	5	5
Fosfato dipotássico	2.5	2.5
Glicose	2.5	2.5
Agar	20	-
pH	-	7.2

**Fonte:** Oliveira, (2018).

A partir das placas de Petri foi realizado um subcultivo em meio líquido, utilizando frascos Erlenmeyer de 500 ml. Esses frascos foram levados a um *shaker* rotatório (CIENITEC CT-712) durante 144 horas, a uma temperatura de 28°C e 150 rpm, para atingir o crescimento máximo do micro-organismo e realizarem seus processos metabólicos. O cultivo bacteriano foi liofilizado e enviado para o Instituto Tecnológico Vale, localizado em Belém-Pará, para

então serem realizadas as etapas de análise das proteínas presentes, e dos mapas metabólicos relacionados.

As amostras de biorreagente para flotação foram denominadas:

BS1: Biossurfactante 1

BS2: Biossurfactante 2

CB1: Cultivo Bacteriano (*Rhodococcus. opacus*) 1

CB2: Cultivo Bacteriano (*Rhodococcus. opacus*) 2

### 3.2 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

A extração da amostra CB1 foi realizada utilizando método proposto por (WANG *et al.*, 2006) adaptado, no qual foram realizadas etapas de pré-limpeza para remover contaminantes que afetam a separação (lavagem de ácido tricloro-acético /acetona) e adicionalmente remover compostos (poli)fenóis (lavagem de metanol).

Foram pesadas aproximadamente 3 g de amostra liofilizada e dispostas em falcons de 15 mL, posteriormente foi adicionado 630 µL de DTT (Ditiotreitol) (70 mM final) 10 mL de tampão contendo sacarose (1,5 M), Tris-HCL (1 M, pH 8), SDS (Dodecilsulfato de Sódio, 10%), PMSF (Fluoreto de Metilfenilsulfonil, 100 mM), PVPP (Polivinilpolipirrolidona) e H<sub>2</sub>O miliQ, seguido da adição de 10 µL de inibidor de proteases (Protease Inhibitor cocktail - P8340 Sigma-Aldrich) e repouso em temperatura ambiente por 10 minutos.

As amostras foram submetidas à sonicação por seis repetições de 30 segundos, com potência de em torno de 80 e com intervalos de aproximadamente 30 – 60 segundos, no gelo, evitando o aquecimento. Em sequência, a amostra contida em cada falcon foi dividida em oito eppendorfs (epp) de 2 mL, transferindo aproximadamente 1000 µL da amostra em cada epp, e adicionados 700 µL de fenol em cada epp.

As amostras foram homogeneizadas durante 15 minutos em um vortex, em seguida centrifugadas por sete minutos, a 14000 rpm à temperatura de 4°C, para que houvesse a separação da fase fenólica, a qual foi transferida para um epp novo. O processo de centrifugação foi repetido para que fossem eliminados quaisquer resíduos da fase aquosa ou de SDS. Foi então transferido 700 µL do sobrenadante para um novo epp e adicionado outros 700 µL de acetato de amônia em metanol, para a precipitação das proteínas, as amostras foram vortexadas rapidamente apenas para misturá-las e armazenadas à -80°C overnight.

Para a limpeza, as amostras foram submetidas a repetidas etapas de lavagem. Inicialmente centrifugadas por 20 minutos, a 14000 rpm a temperatura de 4°C, todo o líquido foi descartado, e adicionou-se 1500 µL de acetona 80% gelada; o líquido foi continuamente pipetado até o pellet se dissolver, nesta etapa todos os pellets foram unidos em um epp, em seguida este epp foi vortexado e o líquido descartado, este processo foi repetido três vezes. Foi adicionado 1500 µL de etanol 70% gelado e os tubos epp centrifugados por 7 minutos, a 14000 rpm a temperatura de 4 C. Todo o líquido foi descartado e as amostras foram deixadas para secar por 30 minutos. Após secas, foram adicionadas 50µL de *RapiGest* SF 0,2% em cada amostra, pipetando repetidamente até a dissolução do pellet. Em seguida foi realizada a quantificação das proteínas através do Quibit 2.0 (Invitrogen).

### 3.3 DIGESTÃO DAS PROTEÍNAS

A digestão de proteínas foi realizada utilizando 50 µg de proteína de cada amostra, para um volume final de 150 µL cada, este volume foi padronizado utilizando *RapiGest* SF 0,1%. O preparo da digestão foi realizado inicialmente com a redução de proteínas com Ditioneitol (DTT, 5 mM), incubando-as por 25 minutos a 56°C; em seguida realizou-se a alquilação com a adição de Iodoacetamida (IAA, 14 mM), incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente e protegido da luz.

Posteriormente, ocorre a etapa de remoção de IAA residual, adicionando novamente DTT 5mM, com incubação de 15 minutos em temperatura ambiente, protegido da luz. As amostras foram diluídas em 1:5 de bicarbonato de amônio 50 mM, seguida pela adição de CaCl<sub>2</sub> 1 mM. O tratamento foi realizado com tripsina (20 ng/µL<sup>-1</sup>) por 16 horas à 37°C, a 200rpm. Para interromper a reação enzimática, adicionou-se ácido trifluoacético (TFA) na concentração final de 0,4% do volume 20 das amostras.

No dia seguinte foi adicionado TFA a 0,4% do volume total das amostras para parar a reação da tripsina. O pH foi verificado em 2 e em seguida as amostras foram vortexadas e incubadas a 37°C por 90 minutos. Após as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm, em temperatura de 6 C por 30 minutos e o sobrenadante transferido para o vial. O pH das amostras foi ajustado para 10 a partir da adição de 5 µL de 1 N NH<sub>4</sub>OH.

As amostras BS1 e BS2 foram refeitas, e quantificadas no vial com volume de 120µL. Neste caso, não foi utilizada a quantificação com a complementação do reagente *RapiGest* SF

01%. As amostras CB1, CB2, RE1 e RE2 foram quantificadas no vial com volume de aproximadamente 100  $\mu\text{L}$ , e utilizando 1  $\mu\text{L}$  de amostra.

A partir dos resultados da quantificação de proteínas, o cultivo biológico foi escolhido para a análise do proteoma, pois é o tratamento ideal para avaliar a fisiologia do micro-organismo.

### 3.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA BIDIMENSIONAL ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA

Foi utilizado o cromatógrafo Nano Acquity UPLC (Waters), configurado para um fracionamento em duas dimensões. Para a primeira dimensão foi utilizada uma coluna analítica de 5  $\mu\text{m}$  XBridge BEH130 C18 (300  $\mu\text{m}$  x 50 mm) em um fluxo de 2  $\mu\text{L}$  por minuto. A segunda dimensão foi montada com uma coluna trap C18, 5  $\mu\text{m}$  (180  $\mu\text{m}$  x 20 mm) e uma coluna analítica 1.7  $\mu\text{m}$  BEH130 C18 (100  $\mu\text{m}$  x 100 mm) em um fluxo de 400  $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$ . As amostras foram separadas em cinco frações a partir de um gradiente de 10.8, 14.0, 16.7, 20.4, e 65.0% de ACN.

O cromatógrafo foi acoplado diretamente a um espectrômetro de massas ESI-Q-ToF Synapt G2S (Waters) configurado para operar em modo positivo, e fragmentação contínua (MSE) com a energia de colisão oscilando entre 5 a 40 eV. Foram adquiridos espectros de massas dentro da faixa de 50 a 1200 Da, com scan de 0,5 segundos e um intervalo entre scans de 0,1 segundos. A largura do pico e resolução dos espectros de massas foram configurados no modo automático. O peptídeo (lockmass) [Glu<sup>-1</sup>] fibrinopeptídeo, de massa 785.4827 Da e cargas +2, foi utilizado como referência e lido a cada 30 segundos (segundo configurações do lockmass spray).

### 3.5 BIOINFORMÁTICA

Os dados brutos oriundos da espectrometria de massas foram processados no ProteinLynx Global Server 3.0.2 (Waters). Para a quantificação e identificação de proteínas foi utilizada a plataforma Mascot (PERKINS *et al.*, 1999). Para tal faz-se necessário um banco de dados de peptídeos trópticos, neste caso o proteoma de *Rhodococcus opcaus* depositado no NCBI.

A análise funcional e enzimática das proteínas identificadas foi realizada utilizando a plataforma Unipept (<https://unipept.ugent.be/>) (MESUERE *et al.*, 2015). Foi utilizado como

arquivo de entrada uma lista contendo as sequências dos peptídeos identificados com mais de 95% de certeza. O algoritmo retorna quais enzimas estão presentes na amostra, além da ontologia genética (gene ontology), dividida em três categorias: i) processos biológicos; ii) componente celular; e iii) função molecular. A plataforma KEGG (Enciclopédia de Genes e Genoma de Kioto) (KANEHISA *et al.*, 2018) foi utilizada para o mapeamento das enzimas em rotas metabólicas baseado na sequência completa das proteínas.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 QUANTIFICAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE PROTEÍNAS

A partir da análise da amostra de cultivo biológico da bactéria *Rhodococcus opacus* foram identificadas 991 proteínas (Anexo B). Estas proteínas foram analisadas na plataforma KEEG e identificadas conforme suas funções no metabolismo bacteriano (Tabela 2). Um total 761 proteínas foram mapeadas em rotas metabólicas. Neste trabalho, as vias do metabolismo de carboidratos foram ressaltadas devido ao conhecimento de o número de n-alcanos influenciar diretamente na composição da parede celular das bactérias do gênero *Rhodococcus*, na constituição de ácido micólico, assim como no metabolismo energético das células. Na via do amido e sacarose foram identificadas 26 proteínas, esta via é a responsável pela produção do composto trealose, um glicolípido que unido ao ácido micólico e à glicoproteína arabinogalactana formam o esqueleto da parede celular. As vias destacadas no metabolismo dos lipídeos, também estão relacionadas à produção de trealose; a biossíntese de ácidos graxos – relacionada à biossíntese de ácido micólico - e dos componentes da membrana.

**Tabela 2** - Número de proteínas identificadas no metabolismo da bactéria *Rhodococcus opacus*

<b>METABOLISMO</b>	<b>DESCRIÇÃO</b>	<b>Nº DE PROTEÍNAS</b>
<b>MAPAS GERAIS</b>	Rotas metabólicas	761
	Biossíntese de metabólitos secundários	261
	Metabolismo microbiano em diversos ambientes	276
	Biossíntese de antibióticos	186
	Metabolismo do carbono	97
	Metabolismo do ácido 2-Oxocarboxílico	24
	Metabolismo de ácidos graxos	22
	Biossíntese de aminoácidos	102
	Degradação de compostos aromáticos	46

Continuação...

<b>METABOLISMO DOS CARBOIDRATOS</b>	*Glicólise/ Gliconeogênese*	32
	*Ciclo do Citrato (Ciclo TCA) *	24
	*Via Pentose Fosfato*	24
	Inter conversões Pentose e glucoronato	10
	*Metabolismo da frutose e manose*	19
	*Metabolismo da galactose*	16
	Metabolismo do ascorbato e aldarato	6
	***Metabolismo do amido e sacarose***	26
	*Metabolismo de açúcares amino e nucleotídeos*	29
	*Metabolismo do piruvato*	37
	*Metabolismo do glioxilato e dicarboxilato*	33
	*Metabolismo do propanoato*	32
	*Metabolismo do butanoato*	33
	Metabolismo do ácido dibásico ramificado emC5	9
	Metabolismo do fosfato inositol	10
<b>METABOLISMO ENERGÉTICO</b>	*Fosforilação oxidativa*	40
	Fotossíntese	8
	Fixação do carbono em organismos fotossintetizantes	11
	Vias de fixação do carbono em procariotos	27
	Metabolismo do metano	32
	Metabolismo do nitrogênio	15
	Metabolismo do enxofre	23
<b>METABOLISMO DE LIPÍDEOS</b>	*Biossíntese de ácidos graxos*	9
	*Degradação de ácidos graxos*	19
	Síntese e degradação de corpos cetoados	6
	Biossíntese de esteroide	1
	Biossíntese de ácido primário de bile	1
	Biossíntese de hormônio esteroide	3
	*Metabolismo de glicerolipídeos*	13
	*Metabolismo de glicerofosfolipídeos*	15
	Metabolismo de éter lipídico	2
	Metabolismo de esfingolipídeos	3
	Metabolismo de ácido aracnoide	1
	Metabolismo de ácido alfa-linoléico	2
	Biossíntese de ácidos graxos insaturados	6

Continuação...		
<b>METABOLISMO DE NUCLEOTÍDEOS</b>	Metabolismo da purina	55
	Metabolismo da pirimidina	28
<b>METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS</b>	Metabolismo de alanina, aspartato e glutamato	29
	Metabolismo de glicina, serina e treonina	38
	Metabolismo de cisteína e metionina	27
	Degradação de valina, leucina e isoleucina	26
	Biossíntese de valina, leucina e isoleucina	11
	Biossíntese de lisina	13
	Degradação de lisina	13
	Biossíntese de arginina	24
	Metabolismo de arginina e prolina	25
	Metabolismo de histidina	20
	Metabolismo de tirosina	21
	Metabolismo de fenilalanina	29
	Metabolismo de triptofano	16
	Biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano	20

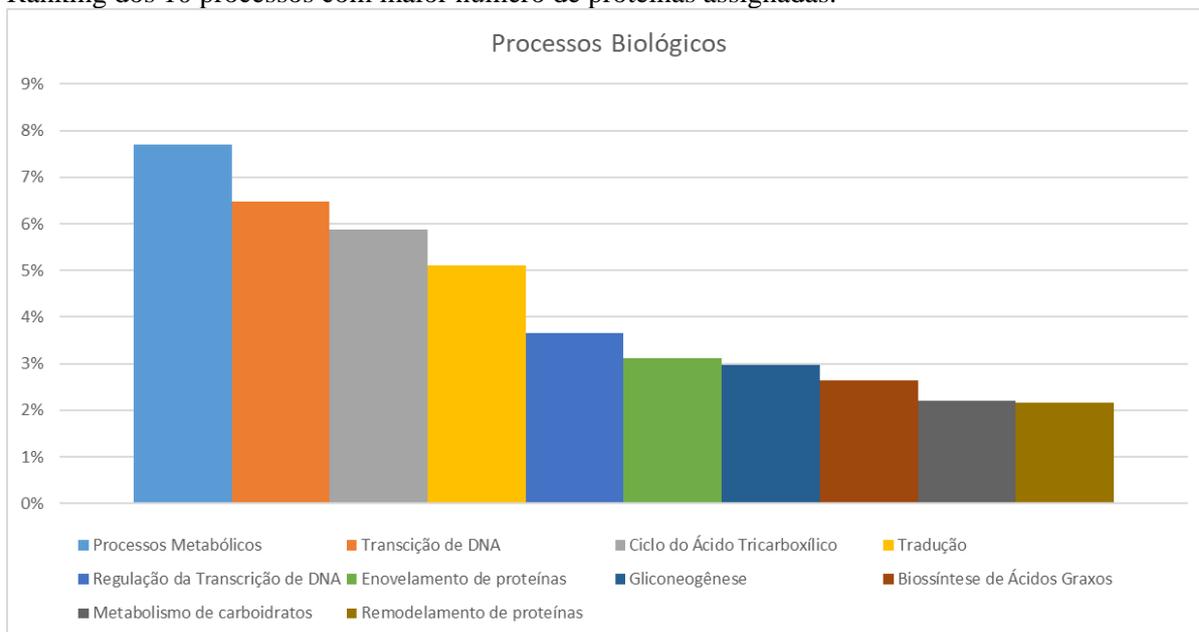
Legenda: \*: destaque para as vias metabólicas ligadas à produção de biossurfactante; \*\*\*: Via metabólica onde é possível a produção de Trealose

Fonte: KEGG

## 4.2 CATEGORIZAÇÃO FUNCIONAL

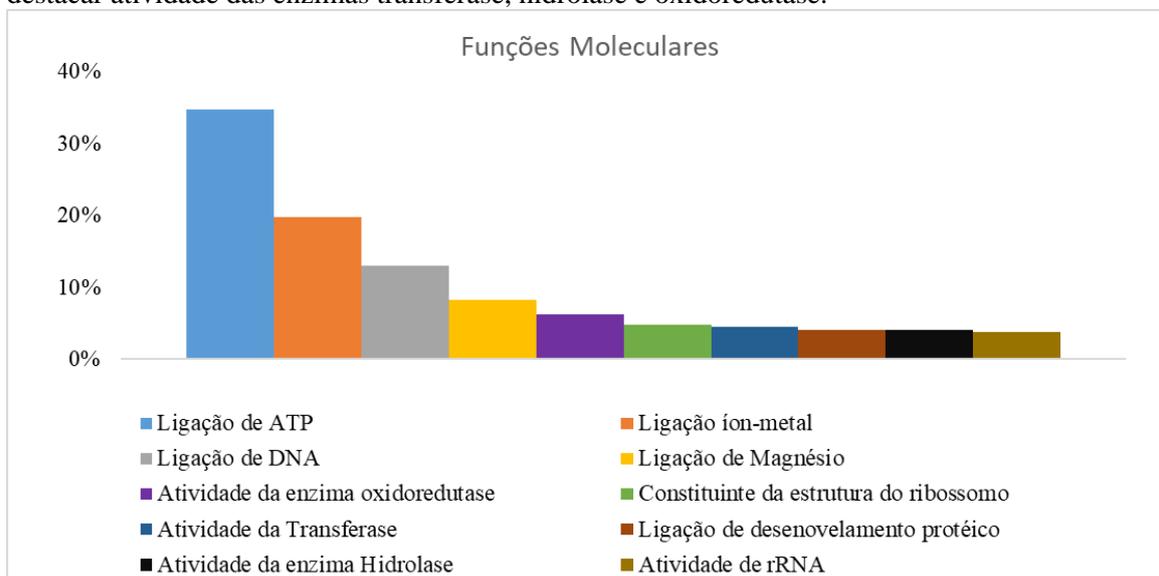
A ferramenta Unipept foi utilizada para obter informações funcionais da bactéria *Rhodococcus opacus*. Para tal, as sequências dos peptídeos identificados foram inseridas na plataforma, gerando dados de Ontologia Genética (gene ontology). Definida como funções gênicas relacionadas umas às outras, e divididos em três aspectos: processo biológico (os processos maiores, ou 'programas biológicos' realizados por múltiplas atividades moleculares) (Figura 1); função molecular (atividades de nível molecular realizadas por produtos genéticos) (Figura 2), e componentes celulares (as localizações relativas a estruturas celulares nas quais um produto gênico desempenha uma função) (Figura 3) (ASHBURNER *et al.*, 2000).

**Figura 1** - Processos Biológicos mapeados a partir do proteoma da bactéria *Rhodococcus opacus*. Ranking dos 10 processos com maior número de proteínas assignadas.



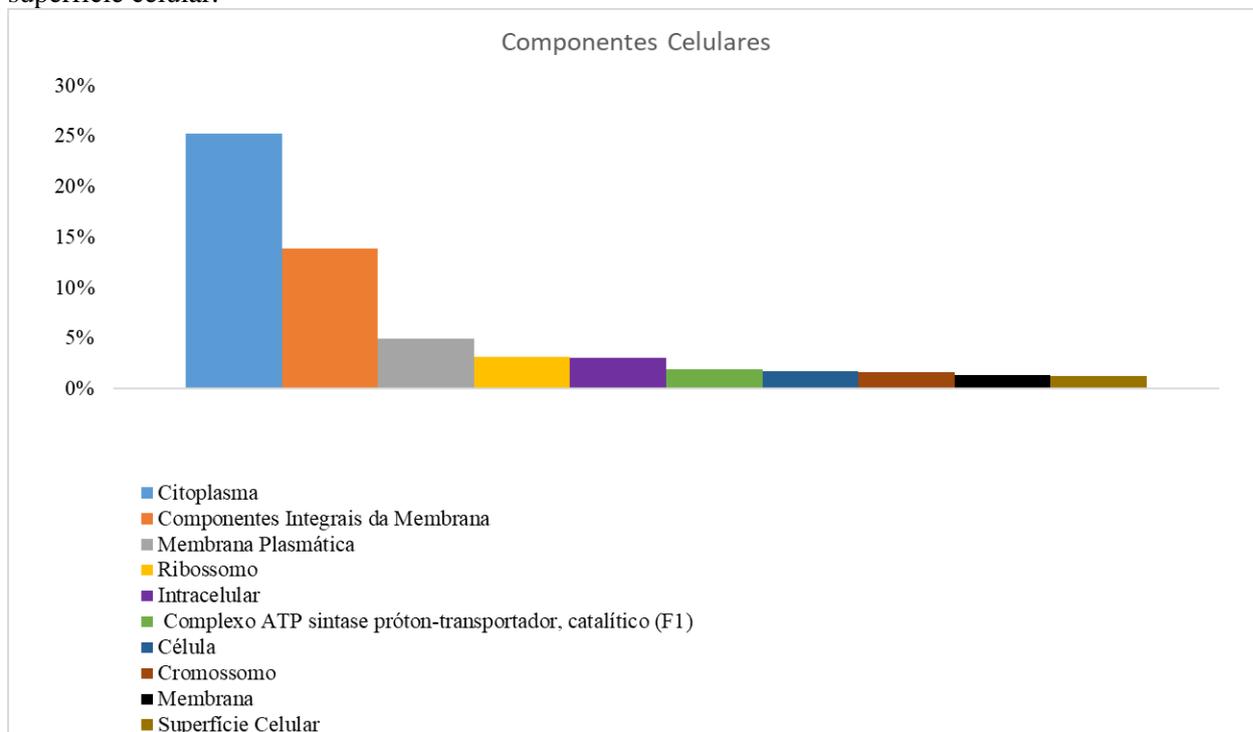
Fonte:

**Figura 2** - Função molecular da bactéria *Rhodococcus opacus*. Ranking dos top 10, no qual podemos destacar atividade das enzimas transferase, hidrolase e oxidoreductase.



Fonte:

**Figura 3** - Componentes celulares presentes na bactéria *Rhodococcus opacus*. Destaque para o número de peptídeos relacionados à constituição do citoplasma, componentes da membrana e da superfície celular.



**Fonte:**

Os peptídeos identificados foram agrupados nas três categorias, como demonstrado na figura acima. Na análise das 10 funções mais abundantes, a “ligação de ATP” foi a mais bem representada (1369 sequências), seguida de “ligação a íons metálicos” (781 sequências) e “ligação de DNA” e (512 sequências). Juntas, essas categorias representam o equivalente a 67,5% dos peptídeos detectados em todo o experimento. Infere-se que a maioria dos peptídeos estão envolvidos na produção de energia e expressão gênica. Sabe-se que este gênero de bactérias está fortemente associado à tolerância a metais, o que “exige” alterações na permeabilidade da membrana, mutações e mecanismos de reparo do DNA (PRESENTATO *et al*, 2019) As funções relacionadas a atividade da hidrolase e da transferases associam-se à possível produção de biosurfactantes, visto que possivelmente estão envolvidas nas vias metabólicas do mesmo.

A partir dos componentes celulares verifica-se a provável localização da proteína. Das 109 categorias presentes, aquelas observadas com a maioria dos peptídeos identificados estão presentes no citoplasma (997) e formando as proteínas de membrana (547), o que pode estar

relacionado à produção de gliconcojugados de ácido micólico, os quais são constituintes da parede celular do gênero *Rhodococcus* (RYLL *et al.*, 2001).

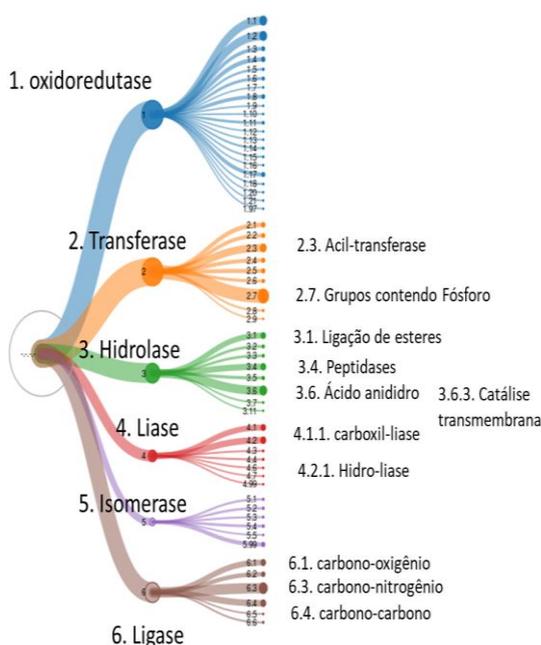
Dentre os 430 processos biológicos detectados, as categorias de maior destaque relacionadas à possível produção de biossurfactantes, são o ciclo do ácido Tricarboxílico (TCA) (232 sequências); este pode produzir substratos finais como citrato, succinato e acetato, os quais auxiliam no fracionamento de ácidos graxos componentes de Triacilgliceróis (TGA) (ALVAREZ; STEINBÜCHEL, 2019). O processo biológico para a biossíntese de ácidos graxos, apresentou 104 sequências. Há forte relação com a constituição da parede celular de *Rhodococcus*, pois são carreadores de ácido micólico durante a biossíntese da parede celular. Os processos de gliconeogênese (117) e metabolismo de carboidratos (87) podem relacionar-se à biossíntese de TAG, pois são produzidos a partir de diversas fontes de carbono (ALVAREZ; STEINBÜCHEL, 2019).

#### 4.3 ENZIMAS

As reações bioquímicas são catalisadas por enzimas, sendo então caracterizadas como indicadores de atividade biológica (ALKORTA *et al.*, 2003). As enzimas são divididas em seis grupos: oxirredutases, hidrolases, transferases, liases, isomerases e ligases. Cada grupo possui subgrupos que determinam a classe, o número de códigos e o tipo de reação catalisada, tais parâmetros foram determinados de acordo com a Comissão de Enzimas da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular.

Os peptídeos analisados geraram números EC (Números de Classificação Enzimática) indicando a presença de 3097 peptídeos relacionados a enzimas do gênero *Rhodococcus*. Destes, 977 são relativos à oxirredutases; 955 às transferases, das quais 442 são transferases relativas a grupos contendo fósforo e 221 a acil-transferase (Figura 4). Na classe das hidrolases, 657 peptídeos foram identificados, dos quais 264 atuam como ácidos anidridos, sendo 125 relacionados à catálise do movimento de substâncias transmembranas, como por exemplo os biossurfactante; 168 como peptidases e 150 atuando nas ligações ésteres. Na classe liase foram identificados 359 peptídeos, dos quais 117 são carboxil-liases e 164 são hidro-liases. A classe de isomerases apresentou 218 peptídeos, foi a classe menos representada. Os últimos 672 peptídeos foram identificados na classe ligase, caracterizada pela formação de ligações carbono-nitrogênio, carbono-oxigênio e carbono-carbono.

**Figura 4** - Árvore taxonômica enzimática. Apresentação das 6 classes de enzimas e dos peptídeos relacionados a enzimas do gênero *Rhodococcus*



**Fonte:**

As classes mais expressivas de enzimas identificadas, demonstram que estas bactérias estão em um ambiente que demanda uma taxa energética elevada. Visto o número de enzimas relacionadas à produção de compostos fosfatados, como as nucleotidiltransferases, são enzimas transferase de grupos contendo fósforo, que por exemplo, são substituintes de ácidos nucleotídicos. No metabolismo podem atuar na adenililação ou uridililação, permitindo a ativação ou inativação de uma enzima ou alteração de sua especificidade, isto pode levar a regulação de atividades enzimáticas, de forma que somente os compostos necessários sejam produzidos (VOET *et al.*, 2008). A classe de oxidoreductases está envolvida com o metabolismo energético da bactéria, atuando nas etapas de respiração celular, cadeia transportadora de elétrons.

**4.4 IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS NO METABOLISMO BACTERIANO**

Metabolismo é a soma de processos químicos e físicos que ocorrem dentro de um organismo vivo. A obtenção de energia ocorre através da oxidação de moléculas orgânicas e o metabolismo destas moléculas (carboidratos, lipídeos e proteínas) fornecendo a energia (adenosina trifosfato - ATP) necessária para as bactérias desenvolverem suas funções vitais.

As vias metabólicas são uma série de reações químicas, nas quais o produto de uma reação serve de substrato para uma próxima, e são catalisadas por enzimas. Com auxílio da ferramenta KEGG obteve-se a o número de proteínas identificadas nas rotas metabólicas da bactéria *Rhodococcus* (Tabela 2). Na aba de metabolismo dos carboidratos, destaca-se o metabolismo do amido e sacarose no qual se realiza a conversão de glicose em trealose, composto constituinte da parede celular de *Rhodococcus* e carreador de ácido micólico (OLIVEIRA, 2015) (Figura 4). Com o auxílio da ferramenta KEGG PATHWAY foi possível verificar o número de rotas metabólicas presentes na bactéria em questão (Tabela 4), assim como o número de proteínas em cada via.

**Tabela 3** - Lista de mapas metabólicos presentes na bactéria *Rhodococcus opacus*. A bactéria apresentou correlação à cepa *Rhodococcus opacus* B4

MAPA METABÓLICO	Nº DE PROTEINAS
Vias metabólicas	19
Metabolismo microbiano em diversos ecossistemas	7
Biossíntese de metabólitos secundários	7
Biossíntese de antibióticos	6
Metabolismo do nitrogênio	5
Metabolismo da Arginina e Prolina	5
Metabolismo do carbono	4
Metabolismo do metano	3
Metabolismo de Glicerofosfolipídeos	2
Metabolismo do Glioxilato e Dicarboxilato	2
Metabolismo da alanina, aspartato e glutamina	2
Degradação de lisina	2
Metabolismo do triptofano	2
Degradação de ácidos graxos	2
Degradação de benzoato	2
Ciclo do Ácido Tricarboxílico (Ciclo TCA)	1
Degradação de cloroalcano e cloroalqueno	1
Biossíntese de terpenóides	1
Biossíntese de arginina	1
Metabolismo do piruvato	1
Metabolismo da fenilalanina	1
Metabolismo da riboflavina	1

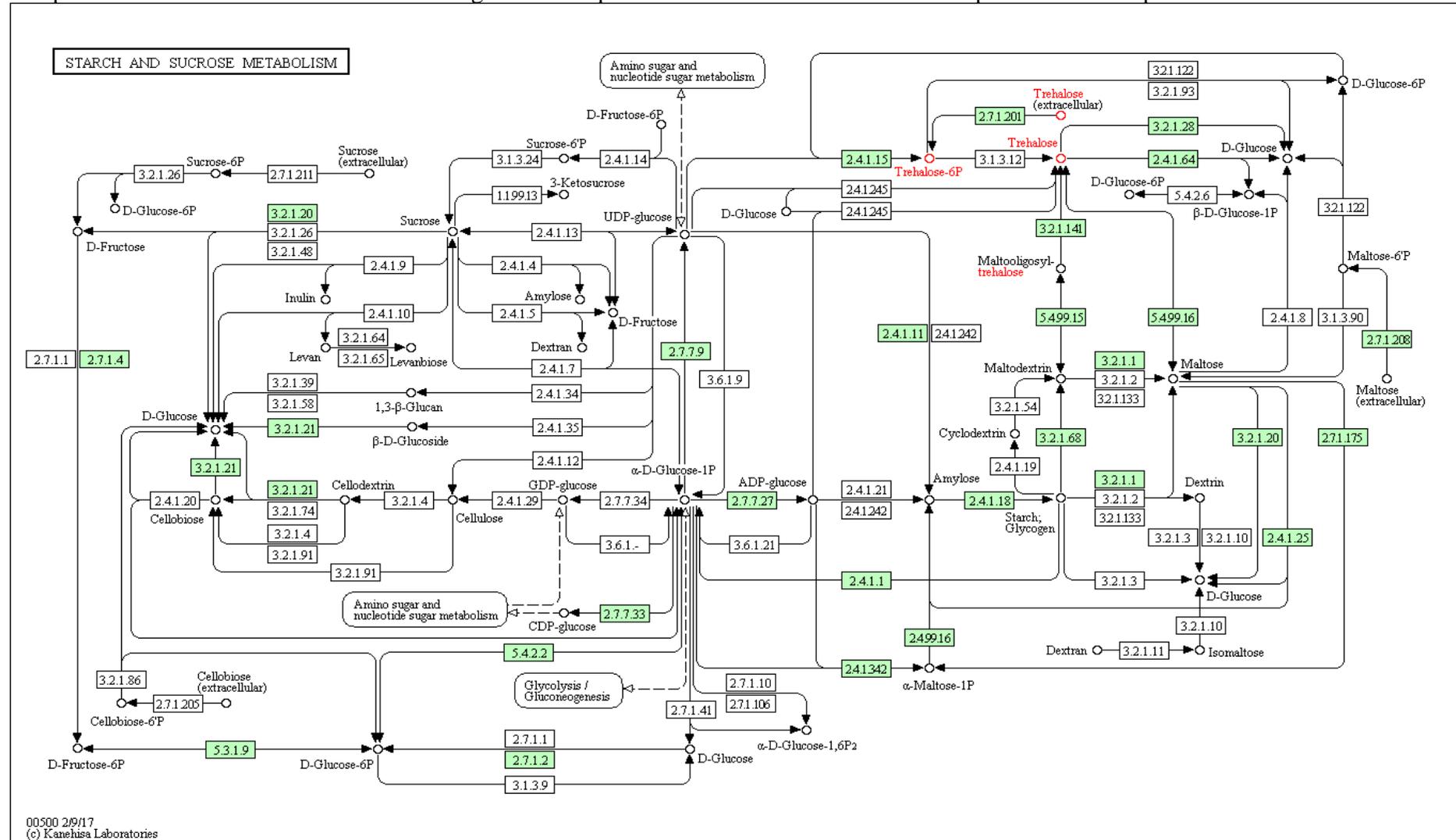
**Fonte:** KEGG PATHWAY

#### 4.5 ROTA METABÓLICA DA BIODSSÍNTESE DE TREALOSE

Existem quatro rotas até então conhecidas para a biossíntese de trealose: (1) a via induzida por TerYZ – produz trealose a partir de glicogênio (MARUTA *et al.*, 1995); (2) a rota TreS- converte maltose em trealose (TSUSAKI *et al.*, 1996, 1997); (3) a formação de trealose por glicosiltransferase (QU *et al.*, 2004); e (4) a via OtsAB – converte glicose e/ou glicose-6-fosfato em trealose (ELBEIN *et al.*, 2003), segundo (MURPHY *et al.*, 2005) é considerada a via mais importante (Figura 5).

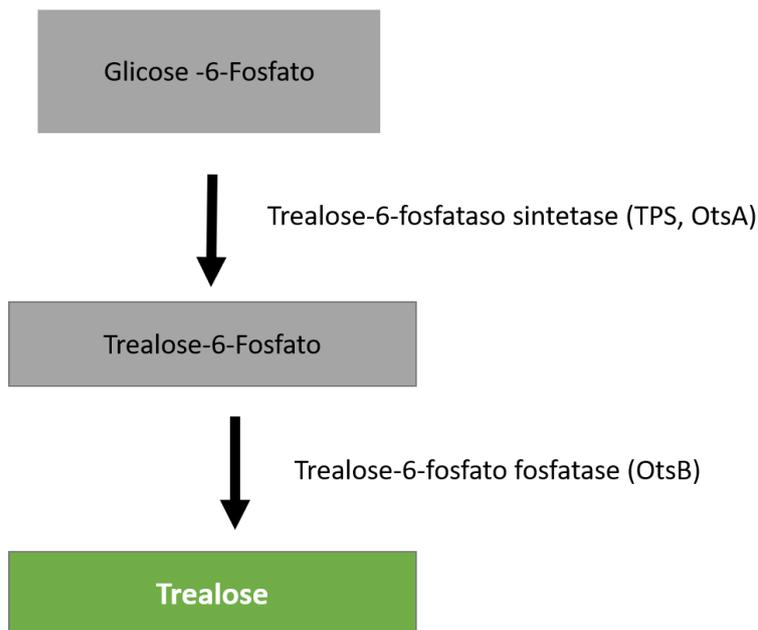
Nesta via, a Trealose-6-Fosfato Sintetase (TPS, OtsA) catalisa a formação de trealose-6-fosfato. Seguido da Trealose-6-Fosfato Fosfatase (OtsB) catalizando a desfosforilação para trealose, podemos observar esses passos na Figura 6. TPS também pode se envolver na biossíntese de trealose contendo glicolípídeos, importantes constituintes do grupo Mycolata, onde o gênero *Rhodococcus* está incluso (TISCHLER *et al.*, 2013; KRETSCHMER; WAGNER, 1983; ASSELINEAU; LAN\_EELLE, 1998; SUTCLIFFE, 1998; SHIMAKATA; MINATOGAWA, 2000; MINNIKIN *et al.*, 2002).

**Figura 5 - Rota metabólica de biossíntese de Trealose.** É possível confirmar as etapas de biossíntese da trealose, partindo da desfosforilação de componentes n-alcânicos unidos a nucleotídeos glicosil. Os quadros em verde indicam as enzimas presentes nas etapas de biossíntese da trealose.



Fonte:

**Figura 6** - Rota metabólica da biossíntese de Trealose em *Rhodococcus*



**Fonte:**

## 5 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

O metabolismo amido e sacarose foi bem representado no proteoma de *Rhodococcus*, com destaque de biossíntese da trealose. Este composto constituinte da parede celular das bactérias do gênero *Rhodococcus*, atua como carreadora de ácido micólico; unidos facilitam a adsorção de metais, atuando assim na flotação mineral, ou seja, como biossurfactante.

O agrupamento dos peptídeos em categorias da análise de Gene Ontology permitiu identificar peptídeos relacionados a alterações na permeabilidade da membrana, mutações e mecanismos de reparo do DNA, possivelmente associados ao ambiente que favorece o desenvolvimento da bactéria em um meio rico em metais. As enzimas foram classificadas com destaque para hidrolases e transferases, relacionadas ao metabolismo energético e dos carboidratos.

Em relação aos componentes celulares foi possível identificar peptídeos relacionados à formação do ácido micólico, constituinte da parede celular de *Rhodococcus*. Dos peptídeos detectados nos processos biológicos, os processos de gliconeogênese e metabolismo de carboidratos podem relacionar-se à biossíntese de ácidos graxos.

A identificação da presença de enzimas e proteínas da via de produção de trealose na bactéria *Rhodococcus opacus* está provavelmente associada a produção de glicolipídeos do tipo trealolípídeos.

Para a produção deste componente, segundo a literatura, o meio de cultura deve estar adicionado de fontes de carbono suficientes, pois há uma relação direta entre o número de carbonos e a quantidade de ácido micólico produzido, relacionando-se à emulsificação de moléculas de n-alcenos na parede celular de *Rhodococcus* e a consequente liberação de biossurfactante.

## **6 APLICAÇÕES POTENCIAIS**

Segundo Rosário (2017) a rota biotecnológica de processamento mineral é uma alternativa atrativa sob o aspecto comercial, pois oferece baixo custo, e é ambientalmente aceita. Os bioreagentes são capazes de substituir, total ou parcialmente, certos reagentes convencionais de flotação em operações de processamento mineral, permitindo separações seletivas de minerais através de alterações na química de suas superfícies.

A bioflotação pode ser de particular importância para as indústrias de mineração e siderurgia, devido à crescente demanda global por matérias primas e o esgotamento de recursos de minérios de maior qualidade.

Segundo Niescher *et al.* (2006) há uma correlação entre a formação de biomassa (crescimento bacteriano), o consumo de n-alcenos e a formação de glicolipídeos, nos experimentos realizados na cepa bacteriana *Rhodococcus opacus* 1CP. O consumo de substratos n-alcenos está diretamente relacionado à produção dos lipídeos de trealose. Segundo Colla e Costa (2003), nos cultivos bacterianos em batelada, o acúmulo de lipídios é favorecido quando no meio há excesso da fonte de carbono sobre outros nutrientes limitantes. Estas itações nos levam a compreender que alterações nas proporções de nutrientes podem favorecer ao acúmulo de lipídeos de trealose.

A utilização de ferramentas moleculares, para o aumento da produção de biossurfactantes podem também ser utilizadas, visto o conhecimento da via metabólica, genes e proteínas envolvidos no processo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA F. C. G. de. **Produção de biosurfactante por *Bacillus licheniformis* utilizando rejeito do abacaxi (*Ananas comosus* L.) como fonte renovável e de baixo custo.**

Orientadora: Galba Maria de Campos Takaki, Dra. 2009. 83 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) – Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2009.

ALVAREZ, H. M., Steinbüchel A. Biology of Triacylglycerol Accumulation by *Rhodococcus*. In: Alvarez H. (Ed). **Biology of Rhodococcus**. Charm: Springer, 2019. (Microbiology Monographs, v. 16).

ALVAREZ H. M, KALSCHUEER R., STEINBÜCHEL, A. Accumulation of storage lipids in species of *Rhodococcus* and *Nocardia* and effect of inhibitors and polyethylene glycol. **Fett-Lipid**, v. 99, p. 239-246, 1997.

ALVAREZ H. M. Relationship between  $\beta$ -oxidation pathway and the hydrocarbon-degrading profile in actinomycetes bacteria. **Int. Biodeterior Biodegrad**, v. 52, p. 35-42, 2003.

ANDERSON A. J. *et al.* Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in *Rhodococcus ruber*. **Can. Jour. Microbiol.** v. 41, p. 4–13, 1995.

ASHBURNER, M. *et al.* Gene Ontology: tool for the unification of biology. **Nature Genetics**, v. 25, n. 1, p. 25-29, maio, 2000.

ASSELINÉAU J; LAN\_EELLE G. Mycobacterial lipids: a historical perspective. **Front. Biosci.** v. 3, p. 164-174, 1998.

BELL, K. S.; PHILP, J. C.; AW, D. W.; CHRISTOFI, N. The genus *Rhodococcus*. **J. Appl. Microbiol.** v. 85, n. 2, p. 195-210, ago. 1998.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. **Beneficiamento de Minérios**. Brasília, DF: MME, [20??]. Disponível em:  
<http://www.mme.gov.br/documents/10584/177708/Beneficiamento+de+Min%C3%A9rios/0b762ba9-35a6-4e73-9e7b-6d1e957e5d8f?version=1.0>

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hidrocarbons. **Colloids and Surfaces**, n. 152, p. 41-52, 1999.

BUENO, S. M. **Bactérias produtoras de biosurfactantes: isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo**. Orientador: Crispin Humberto Garcia-Cruz, Dr. 2008. 99 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2008.

COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Obtenção e aplicação de biosurfactantes. **Vetor**, Rio Grande, v. 13, p. 85-103, 2003.

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**, n. 25, p. 322-329, 1999.

DHANARAJAN, G.; SEN, R. Amphiphilic Molecules of Microbial Origin: Classification, Characteristics, Genetic Regulations, and Pathways for Biosynthesis. In: MULLIGAN, C. N.; SHARMA, S. K.; MUDHOO, A. (Eds.). **Biosurfactants: Research Trends and Applications**. [S. l.]: CRC, 2014.

DIDYK-MUCHA, A., POLOWCZYK, I., SADOWSKI, Z.; KUDELKO, J. Electrokinetic and flotation investigations of surface properties modification of magnesite and serpentinite using biosurfactants and surfactants. **Journal of Physical Science and Application**, v. 5, p. 87-95, 2015.

ELBEIN, A. D.; PAN, Y. T.; PASTUSZAK, I.; CARROLL, D. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. **Glycobiology**, v. 13, n. 4, p. 17R-27R, jan. 2003.

ESCH, S. W.; MORTON, M. D.; WILLIAMS, T. D.; BULLER, C. S. A novem trisaccharide glycolipid biosurfactant containing trehalose bears ester-linked hexanoate, succinate, and acyloxyacyl moieties: NMR and MS characterization of the underivatized structure. **Carbohydr. Res.** v. 319, p. 112-123, 1999.

FAZAEIPOOR, M. H.; KHOSHDAST, H.; RANJBAR, M. Coal flotation using a biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* as a frother. **Korean J. Chem. Eng.**, v. 27, p. 1527-1531, 2010.

FELIPE, L. de O.; DIAS, S. C. Surfactantes sintéticos e biosurfactantes: vantagens e desvantagens. **Quím. nova esc.**, São Paulo, v. 39, n. 3, p. 228-236, 2017.

FINNERTY, W. R. The biology and genetics of genus *Rhodococcus*. **Ann. Rev. Microbiol.** v. 46, p. 193-218, 1992.

HERNÁNDEZ, M. A. *et al.* Central Metabolism of Species of the Genus *Rhodococcus*. In: ALVAREZ, H. (Ed). **Biology of *Rhodococcus***. Springer, Cham, 2019. p 61-85. (Microbiology Monographs, vol 16)

HERNÁNDEZ, M. A.; GLEIXNER, G.; SACHSE, D.; ALVAREZ, H. M. Carbon allocation in *Rhodococcus jostii* RHA1 in response to disruption and overexpression of nlpR regulatory gene, based on <sup>13</sup>C-labeling analysis. **Front Microbiol.**, v. 8, p. 1992, 2017.

HERNÁNDEZ, M. A. *et al.* Biosynthesis of storage compounds by *Rhodococcus jostii* RHA1 and global identification of genes involved in their metabolism. **BMC Genomics**, v. 9, p. 600, 2008.

KANEHISA, M. *et al.* New approach for understanding genome variations in KEGG. **Nucleic Acids Research**, p. 1-6, 2018.

KHAN, M. S. A.; SINGH, B.; CAMEOTRA, S. S. Biological Applications of Biosurfactants and Strategies to Potentiate Commercial Production. In: **BIOSURFACTANTS: Production and Utilization-Processes, Technologies, and Economics**. [S. l.]: CRC, 2015. (Surfactant Science).

KIM, H. *et al.* Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, n. 1, p. 41-46, 1997.

KOSARIC, N.; CAIRNS, W. L. **Biosurfactants and biotechnology** Apud Marcel Dekker, New York. p. 21-46 e 47-88, 1987.

KRETSCHMER, A; WAGNER, F. Characterization of biosynthetic intermediates of trehalose dicorynomycolates from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. **Biochim Biophys Acta**, v. 753, p. 306-313, 1983.

LARKIN, M. J.; KULAKOV, L. A.; ALLEN, C. C. Biodegradation and *Rhodococcus*-masters of catabolic versatility. **Curr Opin Biotechnol**, v. 16, p. 282-290, 2005.

LI, D. *et al.* MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. **Bioinformatics**, v. 31, n. 10, p. 1674–1676, 15 maio 2015.

LOPES, G. M. **Flotação Direta de Minério de Ferro**. Orientador: Rosa Malena Fernandes Lima. 2009. 129 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mineral) – Departamento de Engenharia de Minas, Escola de Minas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2009

CAPPELLETTI, M. *et al.* Degradation of Alkanes in *Rhodococcus*. In: ALVAREZ, H. (eds) **Biology of Rhodococcus**. Cham: Springer, 2019. (Microbiology Monographs, v. 16)

MAEDA, J. M. M. **Estudo de caracterização mineral e de reagentes na flotação de minério de ferro**. Orientador: Song Won Park, Dr. 2014. 38 f. Relatório (Disciplina PQI2000 - Trabalho de Conclusão de Curso II) - Departamento de Engenharia Química, Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

MARTÍNKOVÁ, L.; UHNÁKOVÁ, B.; PÁTEK, M.; NÉSVERA, J.; KRÉN, V. Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. **Environ Int**, v. 35, p. 162-177, 2009.

MARUTA, K. *et al.* Formation of trehalose from maltooligosaccharides by a novel enzymatic system. **Biosci Biotechnol Biochem**. v. 59, p. 1829-1834, 1995.

MERMA, A. G. **Aspectos Fundamentais da Bioflotação do Sistema Apatita Quartzo usando a bactéria *Rhodococcus opacus* como biorreagente**. Orientador: Mauricio Leonardo

Torem. 2012. 145 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Materiais e de Processos Químicos) – Departamento de Engenharia de Materiais, Centro Técnico Científico, Pontifícia Universidade Católica, Rio de Janeiro, 2012.

MERMA, A. G.; TOREM, M. L.; MORÁN, J. J.; MONTE, M. B. On the fundamental aspects of apatite and quartz flotation using a Gram-positive strain as a bioreagent. **Minerals Engineering**, p. 61-67, 2013.

MESQUITA, L. M. de, LINS, F.; TOREM, M. L. Interaction of a Hydrophobic Bacterium Strain in a Hematite-Quartz Flotation System. **International Journal of Mineral Processing**. v. 71, p. 31-44, 2003.

MESUERE, B. *et al.* The Unipept metaproteomics analysis pipeline. **Proteomics**, v. 15, p. 1437-1442, 2015.

MINNIKIN, D. E. *et al.* The methyl-branched fortifications of Mycobacterium tuberculosis. **Chem Biol**, v. 9, p. 545–553, 2002.

MINNIKIN, D. E. Chemical principles in the organization of lipid components in the mycobacterial cell envelope. **Res. Microbiol.** 142: 423–427, 1991.

MULLIGAN, C. N.; SHARMA, S. K.; MUDHOO, A.; MAKHIJANI, K. Green chemistry and biosurfactant research. **In:** MULLIGAN, C. N.; SHARMA, S. K.; MUDHOO, A. (Eds.). Taylor & Francis Group, 2014. **Biosurfactants: Research Trends and Applications**. p. 1-30. (Cap. 1).

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering Geology**. n. 60, p. 371-380, 2001.

MURPHY, H. N. *et al.* The OtsAB pathway is essential for trehalose biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. **J Biol Chem**, v. 280, p. 14524-14529, 2005.

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

OLIVEIRA, C. A. **Biofotação da hematita usando a bactéria: *Rhodococcus Erythropolis***. Orientador: Mauricio Leonardo Torem. 2014. 130 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais e Processos Químicos) – Departamento de Engenharia de Materiais, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

OLIVERA, C. A. C. **Flotação do sistema hematita-quartzo utilizando o biossurfactante solúvel produzido por *Rhodococcus erythropolis***. Orientador: Maurício Leonardo Torem. 2018. 134 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Materiais e de Processos Químicos e Metalúrgicos) - Departamento de Engenharia de Materiais, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

PACHECO, G. J. **Produção de biossurfactantes por *Rhodococcus erythropolis* e sua aplicação na remoção de óleo de sedimentos arenosos.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

PERKINS, D. N. *et al.* Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. **Electrophoresis**, v. 20, n. 18, p. 3551-3567, 1 dez. 1999.

PIMENTEL, A. M. R. **Remoção de Co (II) e Mn (II) de soluções aquosas utilizando a biomassa *R. opacus*.** Orientador: Maurício Leonardo Torem. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais e de Processos Químicos e Metalúrgicos) - Departamento de Engenharia de Materiais, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

PRESENTATO, A.; PIACENZA, E.; CAPPELLETTI, M.; TURNER, R. J. Interaction of *Rhodococcus* with Metals and Biotechnological Applications. In: ALVAREZ, H. (eds) **Biology of *Rhodococcus***. Springer, Cham, 2019. (Microbiology Monographs, v. 16)

PRUTHI, V.; CAMEOTRA, S. S. Production and properties of a biosurfactant synthesized by *Arthrobacter protophormiae* – an Antarctic strain. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 13, n. 1, p.137-139, Jan. 1997.

QU, Q; LEE, S. J.; Boos, W. TreT, a novel trehalose glycosyltransfering synthase of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. **J Biol Chem**, v. 279, p. 47890-47897, 2004.

RAO, K. H.; VILINSKA, A.; CHERNYSHOVA, I. V. Minerals Bioprocessing: R & D Needs in Mineral Biobeneficiation. **Hydrometallurgy**. 2010.

ROSÁRIO, L. M. do. **Bioflotação de apatita: Análise comparativa entre o uso da estirpe microbiana *Rhodococcus erythropolis* e do seu biossurfactante.** Orientador: Mauricio Leonardo Torem. 2017. 119 f. Dissertação (Mestrado em engenharia de materiais e de processos químicos) - Departamento de Engenharia Química e de Materiais, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

RYLL, R.; KUMAZAWA, Y.; YANO, I. Immunological Properties of Trehalose Dimycolate (Cord Factor) and Other Mycolic Acid-Containing Glycolipids-A Review **Microbiol. Immunol.**, v. 45, n. 12, p. 801-811, 2001.

SAHARAN, B. S.; SAHU, R. K.; SHARMA, D. A review on biosurfactants: fermentation, current developments and perspectives. **Genetic Engineering and Biotechnology Journal**. 2011.

SHAFI, R.; KHANNA, S. Biosurfactants. **Indian Journal of Microbiology**, n. 33, p. 163-184, 1995.

SHIMAKATA, T.; MINATOGAWA, Y. Essential role of trehalose in the synthesis and subsequent metabolism of corynomycolic acid in *Corynebacterium matruchotii*. **Arch Biochem Biophys**, v. 380, p. 331-338, 2000.

SUTCLIFFE IC. Cell envelope composition and organization in the genus *Rhodococcus*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 74, p. 49-58, 1998.

TISCHLER, D. *et al.* Trehalose phosphate synthases OtsA1 and OtsA2 of *Rhodococcus opacus* 1CP. **FEMS Microbiology Letters** v. 342, n. 2, p. 113-122, maio 2013.

TSUSAKI K, *et al.* Cloning and sequencing of trehalose synthase gene from *Pimelobacter sp.* R48. **Biochim Biophys Acta**, v. 1290, p. 1-3, 1996.

TSUSAKI K. *et al.* Cloning and sequencing of trehalose synthase gene from *Thermus aquaticus* ATCC33923. **Biochim Biophys Acta**, v. 1334, p. 28-32, 1997.

VILINSKA; HANUMANTHA, R. K. “LeptosirillumFerrooxidans – Sulfide Mineral Interaction with Reference to Bioflotation and Bioflocculation.” **Trans. Nonferrous Met. Soc. China**, v. 18, p. 1403-1409, 2008.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentals of Biochemistry** (3rd ed.). [S. l.]: John Wiley & Sons, 2008.

WARHURST, A. M.; FEWSON, C. A. Biotransformation catalyzed by the genus *Rhodococcus*. **Crit. Rev Biotechnol**, v. 14, p. 29-73, 1994.

WINTERBURN, J. B.; MARTIN, P. J. Foam mitigation and exploitation in biosurfactant production. **Biotechnol Lett**, v. 34, n. 2, p. 187-195, 2012.

ZHENG, X.; ARPS, P. J.; SMITH, R. W. Adhesion of two bacteria onto dolomite and apatite: their effect on dolomite depression in anionic flotation. **International Journal Minerals Processing**, v. 62, p. 159-172, 2001.

## **APÊNDICES**

**APÊNDICE A – Tabelas com valores de solução estoque para a produção de tampão SDS denso e solução de precipitação**

**Tabela 1 - Tampão SDS denso**

<b>Componentes</b>	<b>Conc. Estoque</b>	<b>Conc. Final</b>	<b>Vol. Final (9ml)</b>
<b>Sacarose</b>	1,5M	0,85 M	5,7 ml
<b>Tris-HCl pH 8,0</b>	1 M	0,1 M	1 ml
<b>SDS</b>	10%	2% (v/v)	2 ml
<b>PMSF</b>	100 mM	1 mM	0,1 ml
<b>PVPP**</b>	-	2%	0,2 g
<b>H<sub>2</sub>O miliQ</b>	-	-	0,2 mL

**Fonte:** Wang 2003, adaptado

**Tabela 2 - Solução de precipitação**

<b>Componentes</b>	<b>Conc. final</b>	<b>Quantidade (g)</b>	<b>Metanol</b>
<b>Acetato de amônia em metanol</b>	0,1 M	0,77	100 ml

**Fonte:** Wang, 2003

Dissolver o acetato de amônia em metanol e manter a -20°C

**APÊNDICE B** – Tabela de identificação das proteínas presentes na bactéria *Rhodococcus opacus*  
Disponível em anexo (Arquivo excel)