



Biotensioactivos producidos por *Sphingobacterium detergens* sp. nov.: Producción, caracterización y propiedades

César Burgos Díaz

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Facultat de Farmàcia
Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries

**Biotensioactivos producidos por
Sphingobacterium detergens sp. nov.:
Producción, caracterización y propiedades**

**César Burgos Díaz
2012**



Universitat de Barcelona

Facultat de Farmàcia

Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries

Programa de doctorado: Biotecnología

Biotensioactivos producidos por
***Sphingobacterium detergens* sp. nov.:**
Producción, caracterización y propiedades

Memoria presentada por **César Burgos Díaz** para optar al título de
Doctor por la Universitat de Barcelona.

Director/a:

Doctorando:

Dra. Ana M. Marqués Villavecchia

César Burgos Díaz

César Burgos Díaz

2012

Ana M. Marqués Villavecchia, Profesora Titular de Microbiología del Departamento de Microbiología (Farmacia) de la Universitat de Barcelona,

INFORMA:

Que la memoria titulada "Biotensioactivos producidos por *Sphingobacterium detergens* sp. nov.: Producción, caracterización y propiedades". Presentada por CÉSAR BURGOS DÍAZ para optar al título de Doctor por la Universitat de Barcelona, ha sido realizada bajo mi dirección en el Departamento de Microbiología (Farmacia), y considerándola finalizada, autorizo su presentación para ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y, para que así conste, firmo la presente en Barcelona, el día 26 de octubre de 2012

Dra. Ana M. Marqués Villavecchia

La presente tesis doctoral ha sido financiada gracias a la beca concedida por la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica, gobierno de Chile (CONICYT) y al Ministerio de Educación y Ciencia de España a través del proyecto CTQ2007-66244

AGRADECIMIENTOS

La presente Tesis Doctoral es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas leyendo, corrigiendo, opinando, dando ánimo, acompañando en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad.

Agradezco enormemente a la Dra. Ana M. Marqués V., directora de la presente Tesis Doctoral, por haber confiado en mí, por la dedicación que me ha mostrado durante todos estos años y especialmente durante el periodo de elaboración de este trabajo. Sin sus conocimientos, consejos y ánimos, esta tesis no hubiera sido posible.

En segundo lugar agradezco a la Dra. Àngels Manresa por el interés que ha puesto en mi trabajo, por sus consejos, apoyo y el ánimo que me ha brindado durante todos estos años. Agradezco enormemente a la Dra. María José Espuny, por su amistad, por su preocupación, por escucharme y apoyarme, y por su gran aporte en esta tesis doctoral.

Al Dr. Ramón Pons por aportarme sus conocimientos de la fisicoquímica de los tensioactivos, por su buena disposición a contestar mis dudas y por su apoyo durante mi estancia en el CSIC. Igualmente agradecer a Inma Carrera por su ayuda.

Agradezco también a la Dra. Maribel Farfán por la ayuda entregada durante la realización de caracterización filogenética de la bacteria. A Dra. Mercedes Berlanga, por atender mis dudas, y por apoyarme durante la realización de la tesis. Además, me gustaría agradecer a Dra. Carmen Fusté, Dr. Gaspar Lorén y Dr. David Miñana por estar siempre dispuestos a ayudarme y contestar mis dudas.

A Raquel Martín, Verónica Martínez y Carolina Storniolo del Departamento de Fisiología de la Facultat de Farmacia de la Universitat de Barcelona, por la ayuda y los conocimientos aportados en el estudio de las propiedades biológicas del biotensioactivo.

A Dr. Francesc Rabanal y al Dr. Antonio Delgado por la ayuda en la caracterización química de los compuestos, y a Francesc García del Laboratori de Sanitat Vegetal, Departament d'Agricultura, Alimentació i Acció Rural, Generalitat de Catalunya, Barcelona, por la ayuda en la determinación de los ácidos grasos.

Gracias también a mis queridos compañeros y amigos, porque siempre he encontrado apoyo y ayuda cuando lo he necesitado y por permitirme entrar en sus vidas durante estos cinco años de convivir dentro y fuera del laboratorio. Agradezco en primer lugar a unos de los pilares del laboratorio, Nacho, por todos estos años que convivimos en el laboratorio, por su amistad y compañerismo, y sobre todo por su gran ayuda en los inicios del doctorado, fuera y dentro del laboratorio. A mi amigo Andreu, por su compañerismo y apoyo, por alegrar el laboratorio y por esas cervecitas de los viernes comentando todas las jugadas de la semana. A Vicentica, por su amistad, por su preocupación, por ser la mami del laboratorio, por nuestras conversaciones tratando de arreglar el mundo, por su apoyo, y por ser mi compañera de viaje. A mi corazón Jhoane (pequeña JLO) por su cariño, por su compañía y nuestras risas. A Noelia por su amistad de todos estos años, por escucharme y ayudarme con sus conocimientos. A Ester por su preocupación, consejos y ayuda.

Agradezco también a Ariadna Grau por su compañerismo, simpatía, y por su gran ayuda en la caracterización química del biotensioactivo, por su tiempo y paciencia, a Ariadna Sanglas, por todos los años que convivimos en el laboratorio, A Eleonora por nuestra amistad y por los inicios en Barcelona, y a Guillermo, Ornella y Alina.

A todos los compañeros y amigos que ya no están el departamento y que me ayudaron directa e indirectamente durante la parte experimental del doctorado, a mi gran amigo Santi, Mireia, Patricia (Patri), Daniel, Gladys, Paloma, Emma, Karla (Bruni), Vivi, Teresa, Danielle, Silvana, Giovanna y Carmen.

A mis grandes amigos Silvia, Iulia y Oscar, por todos estos años de amistad, por estar siempre dispuestos a ayudarme y escucharme, y por nuestros viajes y vacaciones, etc.

A todas las personas del departamento de microbiología de la Facutat de Farmacia. Especialmente a la Dra. María Jesús Montes y a Carmen Guillen, técnicos del departamento, por la ayuda recibida durante todos estos años. A Lucia Muñoz, secretaria del departamento, por su buena disposición y por estar siempre dispuesta ayudarme.

Agradecer especialmente a Trinitat, mi yaya catalana. Por su cariño y aportarme su sabiduría, por apoyarme y soportarme durante estos tres años de convivencia.

Muchas gracias a mi familia que desde la distancia me acompañaron y apoyaron en esta aventura que significó el doctorado y que, de forma incondicional, entendieron mis ausencias y mis malos momentos.

Finalmente, a todas esas personas que no han sido mencionadas anteriormente, pero que seguro me han aportado de una forma u otra en la realización del doctorado.

Índice de contenidos

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. TENSIOACTIVOS: definición y clasificación	2
1.1.1. Clasificación de los tensioactivos.....	3
- Tensioactivos aniónicos	3
- Tensioactivos catiónicos	3
- Tensioactivos anfóteros	4
- Tensioactivos no iónicos	4
1.1.2. Propiedades y características de los tensioactivos.....	4
a) Actividad superficial e interfacial	5
b) Concentración micelar crítica (CMC)	6
c) Formación de agregados	7
d) Formación de cristales líquidos liotrópicos por tensioactivos	8
e) Capacidad emulsionante	10
f) Balance Hidrofílico e hidrofóbico (HLB)	10
1.2. BIOTENSIOACTIVOS	11
1.2.1. Clasificación de los biotensioactivos.....	12
1.2.1.1 Glicolípidos	13
- Ramnolípidos.....	13
- Trealosalípidos.....	13
- Soforolípidos	13
1.2.1.2. Lipopéptidos	14
1.2.1.3. Fosfolípidos y ácidos grasos	15
1.2.1.4. Sideróforos	16
- Flavolípidos	16
1.2.1.5. Biotensioactivos poliméricos.....	16
1.2.2. Función de los biotensioactivos en los microorganismos	17
1.2.3. Búsqueda y selección de nuevos microorganismos productores de biotensioactivos.....	18
1.2.4. Producción de biotensioactivos	19
1.2.4.1. Factores que afectan en la optimización de las condiciones de cultivo	20
a) Efecto de la fuente de carbono	20
b) Fuentes de nitrógeno	20
c) Efecto de las condiciones de cultivo	21
1.2.5. Aplicaciones industriales de los biotensioactivos	21
1.2.6. Biotensioactivos frente a los tensioactivos sintéticos.....	23
1.2.7. Descripción de género <i>Sphingobacterium</i> sp.	24

2. OBJETIVOS.....	27
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN (PUBLICACIONES).....	34
3.1. Isolation and partial characterization of a biosurfactant mixture produced by <i>Sphingobacterium</i> sp. isolated from soil.....	34
3.2. <i>Sphingobacterium detergens</i> sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from soil.....	47
3.3. The Production and Physicochemical Properties of a Biosurfactants Mixture Obtained from <i>Sphingobacterium detergens</i>	69
3.4. Propiedades Biológicas de los biotensioactivos producidos por <i>Sphingobacterium detergens</i>	94
4. DISCUSIÓN GENERAL.....	118
4.1. Aislamiento, selección e identificación de microorganismos productores de biotensioactivos	118
4.1.1 Búsqueda, aislamiento y selección de microorganismos a partir de muestras de suelos volcánicos.....	118
4.2 Identificación del microorganismo productor de biotensioactivos.....	120
4.2.1. Secuenciación parcial del gen chaperona 60 (<i>cpn60</i>).....	121
4.2.2. Hibridación DNA-DNA y contenido de guanina-citosina (G+C).....	122
4.2.3 Pruebas bioquímicas y quimiotaxonómicas del aislado 6.2S	123
4.2.4. Descripción de la nueva especie <i>Sphingobacterium detergens</i> sp. nov.	123
4.3. Optimización de la producción de BT por <i>S. detergens</i>	123
4.3.1. Curvas de crecimiento y viabilidad de <i>S. detergens</i>	126
4.4. Caracterización química de la mezcla de biotensioactivos.....	129
4.4.1. Caracterización del extracto orgánico producido por <i>S. detergens</i>	129
4.4.2. Caracterización química de la Fracción A	130
a) Cromatografía en capa fina bidimensional (TLC-BD).....	130
b) Identificación de los grupos funcionales de la fracción A por espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier (FT-IR).....	131
c) Estudio de los ácidos grasos de la fracción A	132
4.4.3. Caracterización química de la fracción B (resultados no publicados) ..	132
4.5. Propiedades fisicoquímicas de los tensioactivos producidos por <i>Sphigobacterium detergens</i>	135
4.5.1. Estudio de la concentración micelar crítica (CMC).....	135
4.5.2 Estabilidad del biotensioactivo e índice de emulsificación del sobrenadante del medio de cultivo de <i>S.detergens</i>	137
4.5.3. Efecto del pH en la CMC del extracto crudo.....	139

4.5.4. Efecto de la fuerza iónica en la CMC del biotensioactivo.....	139
4.5.5. Estudio mediante microscopia con filtro de luz polarizada, y dispersión de rayos X (SAXS) y modelaje molecular.....	140
4.5.6. Estudio de la distribución del diámetro de partícula y potencial ζ del biotensioactivo.....	141
4.5.7. Estudio de la solubilidad del extracto.....	142
4.6. Propiedades biológicas del biotensioactivo producido por <i>S. detergens</i>	143
4.6.1. Efecto del biotensioactivo sobre los eritrocitos (hemólisis).....	143
4.6.2. Estudio de citotoxicidad del BT sobre queratinocitos y fibroblastos (IC ₅₀).....	145
4.6.3. Estudio del efecto de los biotensioactivos producidos por <i>S. detergens</i> sobre la proliferación de células intestinales Caco-2: inducción de la apoptosis	146
4.6.4. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto crudo producido por la <i>S. detergens</i>	148
CONCLUSIONES.....	152
BIBLIOGRAFÍA.....	155
ANEXO 1.....	165
ANEXO 2.....	174

Capítulo 1

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

Los tensioactivos se encuentran entre los productos más versátiles de la industria química, encontrándose en productos tan diversos como detergentes, productos farmacéuticos, alimentos o en aceites para coches. Además, en las últimas décadas se han aplicado en procedimientos de alta tecnología como micro-electrónica, o virología (Rosen *et al.* 2004). De hecho, en la actualidad la utilización de estos compuestos de naturaleza anfipática es indispensable en muchos procesos industriales. Dependiendo del origen, los tensioactivos pueden clasificarse en dos grupos, tensioactivos sintéticos y tensioactivos biológicos (biotensioactivos). Los tensioactivos presentan una serie de propiedades, tales como producir el descenso de la tensión superficial, presentar capacidad emulsionante, detergente, espumante y dispersante, características que los hacen imprescindibles en diversos procesos químicos (Desai y Banat, 1997).

El consumo mundial de tensioactivos sintéticos supera los 10 millones ton/año, con un crecimiento anual estimado de 500.000 toneladas (Edser, 2006; Van Bogaert *et al.*, 2007). De la producción total de tensioactivos, aproximadamente el 70% son tensioactivos aniónicos usados como agentes espumantes en productos de limpieza industrial, doméstica y en productos de higiene personal. Sin embargo, y pese a su eficiencia y su bajo coste de producción en comparación con otras sustancias de origen químico, los tensioactivos sintéticos tienen el gran inconveniente de que presentan una alta resistencia a la degradación y alta toxicidad cuando se acumulan en el medio ambiente. Esta desventaja hace que se les considere desde el punto de vista ecológico como agentes contaminantes, razón por la cual algunas naciones desarrolladas están tomando medidas respecto a su empleo (Rosen, 2004; <http://www.bvsde.paho.org>).

Por esta razón y debido también a la concienciación de las personas sobre la necesidad de utilizar productos obtenidos por procedimientos de "química verde" o ambientalmente inocuos, los biotensioactivos están adquiriendo una mayor relevancia. En consecuencia actualmente se están estudiando y desarrollando nuevas alternativas para los tensioactivos sintetizados químicamente. Un claro ejemplo son los tensioactivos de origen biológico, o biotensioactivos (BT). Su biodegradabilidad, baja toxicidad y biocompatibilidad, son las características que en primer momento llamaron la atención sobre estos compuestos (Rosen, 2004). Estos compuestos sintetizados por microorganismos, de forma similar que los tensioactivos obtenidos por síntesis química, pueden presentar una excelente actividad superficial. Esta característica los hace candidatos para que en un futuro

no muy lejano estos compuestos puedan reemplazar a los tensioactivos de síntesis química.

En la presente tesis doctoral se ha estudiado la producción de biotensioactivos por una nueva especie bacteriana del género *Sphingobacterium*, *Sphingobacterium detergens* sp. nov., (Marqués *et al.*, 2012), aislada y caracterizada en nuestro laboratorio. La mezcla de biotensioactivos producidos por este microorganismo se ha caracterizado parcialmente y además se han estudiado las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los nuevos biotensioactivos.

1.1. TENSIOACTIVOS: definición y clasificación

Los Tensioactivos son moléculas anfipáticas que se acumulan en las interfases, gas/líquido (aire-agua), líquido/líquido (aceite-agua) o líquido/sólido (agua/superficie de sólidos), provocando un descenso de la tensión superficial e interfacial del medio. A partir de determinadas concentraciones estas moléculas tienden a formar agregados tales como micelas, bicapas y vesículas (Van Hamme *et al.*, 2006).

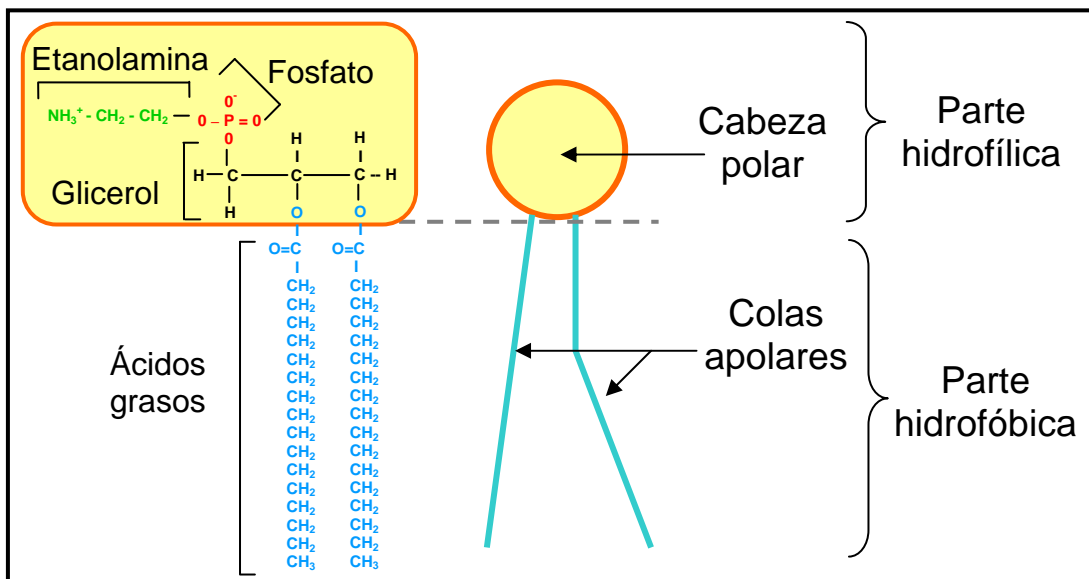


Figura 1. Representación esquemática de las partes constituyentes de los tensioactivos donde se muestra la cabeza polar y las colas hidrofóbicas. La estructura que se muestra corresponde a una fosfatidiletanolamina

Los tensioactivos presentan en su estructura química dos regiones claramente diferenciadas, lo que les confiere el carácter dual característico de todas las sustancias anfipáticas (Figura 1). Una región es la fracción hidrofílica (cabeza polar), que presenta una fuerte afinidad por disolventes polares, sobre todo agua, mientras que la otra fracción hidrofóbica (cola apolar), presenta una mayor afinidad

por disolventes orgánicos o apolares (Burgos-Díaz *et al.*, 2011). La parte hidrofóbica puede estar constituida por cadenas hidrocarbonadas, anillos hidrocarbonados saturados y anillos aromáticos, y la parte hidrofílica por grupos polares de diferente naturaleza. Los tensioactivos están disponibles en muchas formas, y generalmente se clasifican dependiendo de la carga de la cabeza polar como aniónicos, no-iónicos, catiónicos y anfóteros (Pramauro y Pelizzetti, 1996; Rieger, 1997; Rosen, 2004).

1.1.1. Clasificación de los tensioactivos

Los tensioactivos se pueden clasificar según sus aplicaciones en: jabones, detergentes, dispersantes, emulsionantes, espumantes, bactericidas, inhibidores de corrosión, agentes antiestáticos, etc.; o por las estructuras que forman: membranas, microemulsiones, cristales líquidos, liposomas o gel. Muchos tensioactivos pueden ser utilizados en diferentes aplicaciones, por lo tanto, se prefiere clasificarlos según la forma de disociación de su molécula en el agua (Salager, 2002). Según el tipo de disociación del grupo hidrofílico en fase acuosa, estos se clasifican en:

- **Tensioactivos aniónicos**, son aquellos compuestos que presentan carga negativa en su grupo polar. Son moléculas con cationes orgánicos e inorgánicos (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , NH_4^+ , etc) y en su parte hidrofílica contienen los grupos aniónicos ($-\text{COO}^-$, $-\text{SO}_3^-$, $-\text{O}-\text{PO}_3^{2-}$, etc), unidos a la fracción orgánica. Son importantes para el uso en la formulación de detergentes de uso doméstico e industrial. La mayoría de los tensioactivos aniónicos son alquil-carboxilatos (más conocidos como jabones), sulfonatos (detergentes en polvo) y sulfatos (agentes espumantes) (Salager y Fernández, 2004).

- **Tensioactivos catiónicos**, son aquellos que presentan carga positiva en el grupo polar. La mayoría están constituidos sales de amonio cuaternario o bien sales de alquilaminas, donde el grupo hidrofóbico es la cadena larga (8 a 25 átomos de carbono) y el grupo hidrófilo esta constituido por el nitrógeno cuaternario. Debido al nitrógeno cargado positivamente, los amonios cuaternarios presentan propiedades antiestáticas, suavizantes y desinfectantes, causadas por la adsorción electrostática del tensioactivo sobre las superficies (tejidos, piel, pelo... usualmente con carga superficial negativa) (García *et al.*, 2001; Esumi, 2001; García *et al.*, 2000; Esumi *et al.*, 1998).

- **Tensioactivos anfóteros** son aquellos que presentan dentro de una misma molécula grupos aniónicos y catiónicos, tal es el caso de los aminoácidos, las betaínas y los fosfolípidos. De estos últimos los principales representantes son las lecitinas, las cuales constituyen la mayoría de los elementos estructurales de las membranas biológicas. Estos tensioactivos se caracterizan por su comportamiento dependiente del pH del medio (Uphues, 1998). A pH ácido se comportan como tensioactivos catiónicos, a pH alcalino se comportan como aniónicos y en el punto isoeléctrico (más o menos cercano al pH neutro) se comportan como no iónicos. Son productos estables en sistemas ácidos y alcalinos, muy importantes en cosmética por presentar una buena tolerancia en la piel y en la formulación de productos de limpieza alcalinos o como inhibidores de la corrosión.

- **Tensioactivos no iónicos.**

Los tensioactivos no iónicos no se ionizan en solución acuosa, puesto que ellos poseen grupos hidrofílicos del tipo alcohol, fenol, éter o amida. Una alta proporción de estos tensioactivos son relativamente hidrofílicos gracias a la presencia de una cadena de polióxido de etileno. Entre estos se encuentran el Tween y Span (ésteres de sorbitán etoxilados y no etoxilados respectivamente), utilizados en aplicaciones alimentarias y cosméticas debido a su baja toxicidad (Roberts, 2000; Holmberg *et al.*, 2002; Rosen, 2004).

1.1.2. Propiedades y características de los tensioactivos

Las propiedades más interesantes de los tensioactivos sintéticos y biotensioactivos están asociadas principalmente a su carácter anfipático, el cual les confiere la capacidad de reducir la tensión superficial e interfacial de dos fases, y formar micro emulsiones de dos compuestos inmiscibles, donde los compuestos hidrofóbicos pueden solubilizarse en el agua o donde el agua puede solubilizarse en compuestos hidrofóbicos. Tal como se ha citado anteriormente, dichas características les confieren propiedades como excelentes detergentes, emulsionantes, espumantes y dispersantes que hacen de los tensioactivos uno de los productos más empleados en procesos químicos (Desai y Banat, 1997). Además de estas propiedades, cuatro parametros más caracterizan a los tensioactivos: la concentración micelar crítica (CMC), capacidad emulsionante, balance hidrofílico-hidrofóbico (HLB) y formación de cristales líquidos. A continuación se detallan las propiedades y características más importantes de los tensioactivos:

a) Actividad superficial e interfacial

Las fuerzas intermoleculares de cualquier líquido hacen que se genere una membrana de tensión en la superficie que es difícil de romper. Esto es debido a que en el seno de un líquido cada molécula está sometida a fuerzas de atracción en todas direcciones que en promedio quedan anuladas. Sin embargo, las moléculas que se encuentran en la superficie solo son atraídas hacia el interior, formándose una especie de película en la superficie que permite que floten en ella objetos de poco peso (Figura 2). Esta es la razón por la que, por ejemplo, las gotas de agua adquieren forma casi esférica, que no mojen, y que algunos insectos puedan caminar sobre la superficie del agua entre otras cosas. Matemáticamente, el trabajo necesario para llevar las moléculas hacia la superficie por unidad de área, N/m o J/m^2 , es lo que se denomina tensión superficial de un líquido y se representa mediante una letra griega gamma o sigma (Desai y Banat, 1997; Rosen, 2004), y se expresa con la siguiente fórmula:

$$\gamma_{TS} = \frac{d W_{rev.}}{d A} \quad (Nm^{-1})$$

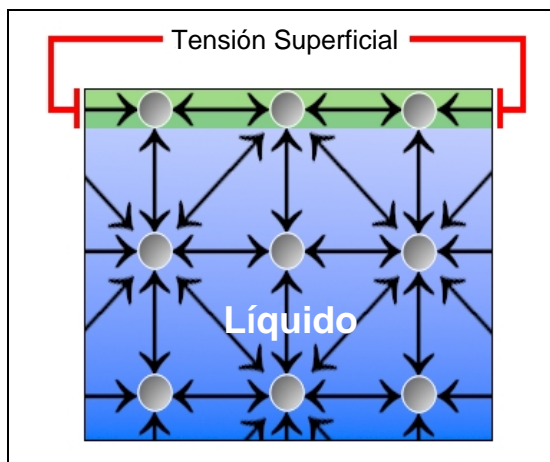


Figura 2: Representación esquemática de las fuerzas intermoleculares que actúan en el seno de un líquido y en la superficie.

La tensión superficial depende principalmente de la naturaleza del líquido y de la temperatura y puede verse afectada por la presencia de compuestos anfipáticos en solución. Los tensioactivos tienen la capacidad de adsorberse en las interfases (líquido-aire, líquido-líquido y sólido-líquido) dando lugar a la formación de monocapas y con ello la disminución de la tensión superficial de las disoluciones que los contienen (Figura 3). La adsorción de las moléculas de tensioactivo en las interfases o en las superficies que las contienen es debida, por un lado, a la débil interacción entre la parte hidrófoba del tensioactivo con las moléculas de agua y

por otro lado, a la fuerte interacción de la parte hidrófila con las propias moléculas del agua. Este fenómeno provoca la expulsión de la porción hidrófoba del tensioactivo fuera del seno de la solución acuosa. De esta manera las moléculas de tensioactivo son adsorbidas de manera ordenada en la interfase del líquido, con la parte hidrófoba fuera del seno de la fase acuosa y parte hidrófila solvatada. La adsorción progresiva de las moléculas de tensioactivo en la superficie de la solución acuosa provoca un cambio en las fuerzas de interacción de las moléculas del líquido de la superficie. Como consecuencia, el tensioactivo es capaz de disminuir la energía de los enlaces entre las moléculas y reducir de esta manera la fuerza de tensión superficial de líquido (Sánchez-Molina, 2006)

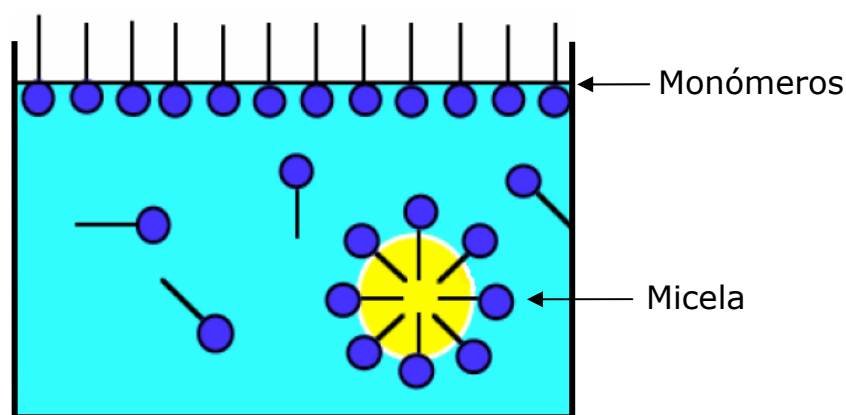


Figura 3: representación esquemática de las disposiciones que pueden adoptar las moléculas de tensioactivos en soluciones acuosas: moléculas adsorbidas en la superficie, monómeros en el seno de la solución y micelas (Figura adaptada de Salager, 1993).

b) Concentración micelar crítica (CMC)

A medida que aumenta la concentración del tensioactivo, aumenta el número de monómeros de tensioactivo en la superficie, disminuyendo la tensión superficial hasta alcanzar un valor crítico, llamado concentración micelar crítica (CMC). A esta concentración, la interfase se encuentra saturada de tensioactivo y las moléculas se comienzan a agregar para formar estructuras como micelas, bicapas y vesículas. La CMC es un parámetro característico para cada tensioactivo y es utilizado para medir la eficiencia de un tensioactivo (Figura 4). Los dos parámetros fundamentales que definen a un tensioactivo: son la eficacia que corresponde a la máxima disminución de tensión superficial o tensión interfacial que produce, y la eficiencia que está relacionada con el valor de la CMC y es la cantidad mínima de tensioactivo que produce el descenso máximo de tensión superficial (Jiménez Islas *et al.*, 2009).

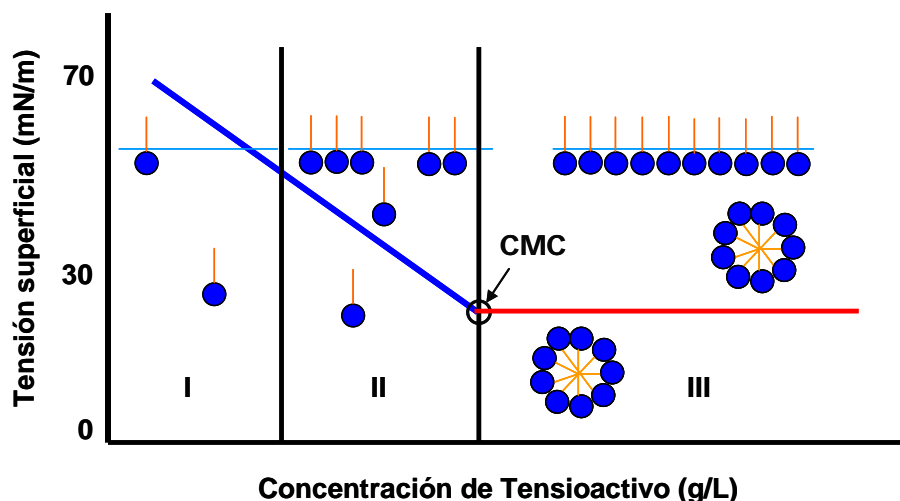


Figura 4: Representación esquemática de la organización de las moléculas de tensioactivo alrededor de la concentración micelar crítica (CMC).

c) Formación de agregados

Los agregados formados por los tensioactivos pueden estar constituidos por un único tensioactivo, agregado simple, o por varios tensioactivos, agregados mixtos. La morfología de los agregados de tensioactivo depende, entre otros factores, de la estructura química del compuesto y de la naturaleza del medio en la que está disuelto. La formación de los agregados se produce mediante interacciones intermoleculares no covalentes, como interacciones hidrofóbicas, formación de puentes de hidrógeno, etc., produciéndose en cada caso, el conjunto de interacciones que dan lugar a la estructura más estable. Además de la estructura molecular del tensioactivo y la polaridad del medio, existen otros factores como la fuerza iónica, el pH y el procedimiento utilizado para la formación del agregado que influyen de forma decisiva en el tipo de agregado formado (Morigaki *et al.*, 2003).

Los tipos de agregados simples más característicos formados por tensioactivos son las micelas esféricas, vesículas, bicapas y micelas inversas (Figura 5). En las micelas esféricas la región hidrófoba del tensioactivo se orienta hacia el interior del agregado para evitar el contacto directo con el agua, siendo las interacciones hidrofóbicas entre moléculas de tensioactivo las principales fuerzas causantes de la agregación. En las micelas inversas, formadas en disolventes apolares, es el grupo hidrófilo el que se orienta hacia el interior del agregado quedando el grupo hidrófobo en contacto con el disolvente. La bicapa consiste en una doble capa de moléculas de tensioactivo con la región hidrofóbica dirigida hacia el interior y la región hidrófila hacia el exterior de la lámina formada, siendo el espesor de dicha lámina el doble de la longitud máxima de la molécula. Finalmente, las vesículas son estructuras esféricas que contienen bicapas de tensioactivo y un núcleo acuoso. La mayoría de los tensioactivos sintéticos y naturales (biotensioactivos) con doble

cadena hidrocarbonada y determinados tensioactivos con una única cadena hidrocarbonada ramificada (Ravoo y Engberts, 1994) forman bicapas o vesículas en disolución acuosa, ya que el volumen de su región hidrófoba es muy elevado, lo que impide su empaquetamiento en estructuras micelares que mantengan un contacto adecuado del grupo cabeza con el agua. Por el contrario, la mayoría de los tensioactivos con una única cadena hidrocarbonada lineal tienen tendencia a formar micelas.

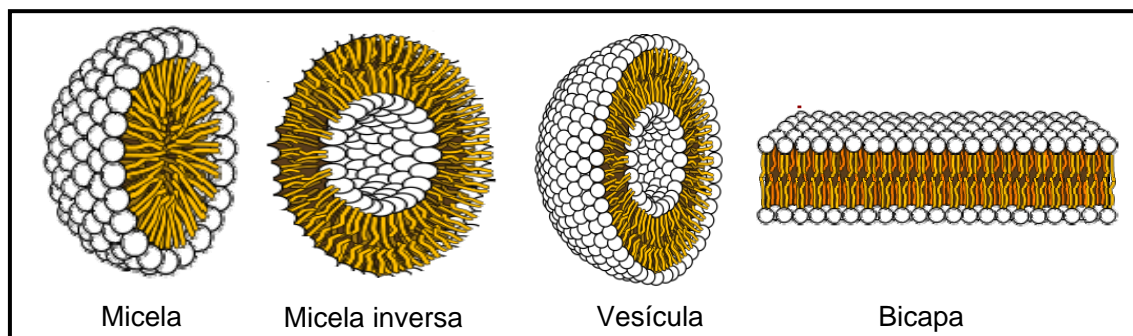


Figura 5: diferentes tipos de agregados simples formados por tensioactivos

La tendencia de los tensioactivos a adsorberse en la interfase de un sistema y de formar agregados moleculares dentro del líquido a partir de una determinada concentración, también es responsable de la serie de propiedades clásicas de los tensioactivos como reducción de la tensión superficial, emulsificación, formación de espuma, detergencia, humectabilidad, etc.

d) Formación de cristales líquidos liotrópicos por tensioactivos

Los cristales líquidos liotrópicos aparecen en un cierto rango de temperatura y de concentración al dispersar ciertas sustancias anfifílicas, como los tensioactivos en agua. A medida que la concentración de tensioactivo va en aumento las micelas se agrupan en una estructura ordenada y forman un cristal líquido liotrópico. Las principales fases liotrópicas son la laminar, hexagonal normal, hexagonal inversa y cúbicas y se presentan con mayor frecuencia en las formulaciones farmacéuticas y cosméticas, como sistemas de liberación controlada de principios activos y en la interfase de ciertas emulsiones, a las que otorgan una mayor estabilidad (Pasquali, 2006).

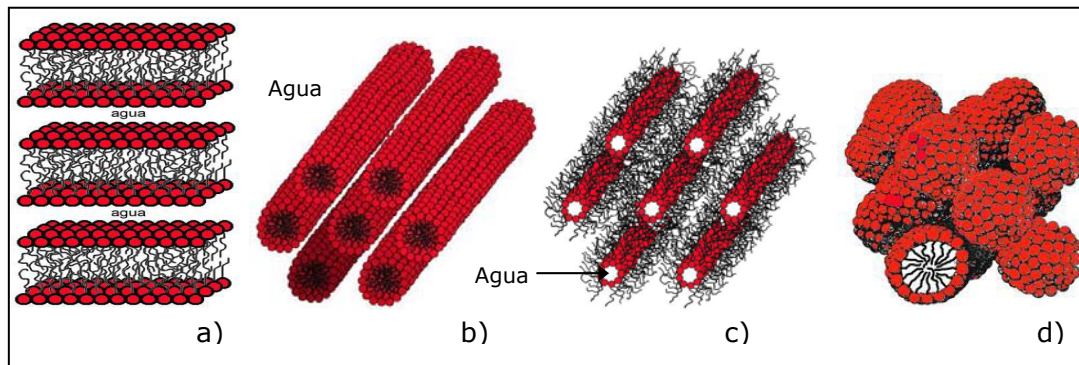


Figura 6: a) estructura de fase laminar; b) fase hexagonal normal; C) fase hexagonal inversa; d) fase cúbica micelar normal. (Figura adaptada de Pasquali, 2009)

En la fase laminar las moléculas del tensioactivo se agrupan en bicapas separadas entre sí por capas de agua de igual espesor (Figura 6; a). Esta fase líquida cristalina se caracteriza por su relativa fluidez, a pesar de poseer una elevada proporción de tensioactivo. La fase laminar es birrefringente y su único eje óptico (dirección a la cual no presenta birrefringencia) es perpendicular a las capas. La fase laminar aparece en la interfase de las emulsiones. Cuanto mayores son las características líquido-cristalinas de una solución, mayor es su estabilidad, ya que de esta forma se mantienen separados entre si los glóbulos que constituyen la fase dispersa.

Existen dos tipos de fases hexagonales, la hexagonal normal (Figura 6; b) y la hexagonal inversa (Figura 6; c). La fase hexagonal normal esta constituida por micelas cilíndricas dispuestas en un retículo bidimensional hexagonal y el agua forma una fase continua que llega a los espacios de los cilindros. Los cristales líquidos pertenecientes a esta categoría se caracterizan por no fluir bajo la acción de la gravedad, pero si se someten a un esfuerzo de corte suficientemente grande, lo hacen plásticamente. A pesar de su alta viscosidad, contienen una proporción de tensioactivo menor que la laminar.

La fase hexagonal inversa posee núcleos de agua rodeados de grupos polares de las moléculas o iones de las sustancias anfifílicas, con el volumen restante ocupado completamente por las cadenas hidrocarbonada que presentan una conformación similar a la de los alcanos líquidos. Esta fase es muy común en fosfolípidos tales como fofatidiletanolamina que tienen grupos polares pequeños, poco hidratados y que poseen interacciones de atracción entre si. También se observa en sistemas formados por fosfolípidos hidratados y otras sustancias anfifílicas, tales como mezclas de fosfatidilcolina y ácidos grasos.

Las fases cúbicas (Figura 6; d) poseen una viscosidad muy elevada y no presentan birrefringencia. Existen dos familias de fases cúbicas: las fases bicontinuas y las micelares. Ambos tipos de fases cúbicas pueden ser normales o inversas (Pasquali, 2006).

e) Capacidad emulsionante: Los tensioactivos pueden estabilizar (emulsionar) o desestabilizar emulsiones aceite en agua (O/W) y agua en aceite (W/O). Una emulsión es una mezcla de dos líquidos inmiscibles de manera más o menos homogénea, en donde un líquido (la fase dispersa) es dispersado en otro (la fase continua o dispersante) por medio de un tensioactivo. El tipo de emulsión formada depende principalmente de la naturaleza del agente emulsificante, de los procesos usados en preparación de la emulsión y de las porciones relativas de aceite y agua presentes. Esta propiedad es muy importante en procesos industriales concretamente en la preparación de emulsiones aceite/agua para cosméticos y alimentos (Nitschke y Costa, 2007).

f) Balance Hidrofílico e hidrofóbico (HLB): El carácter dual de los tensioactivos (polar-apolar) y concretamente el equilibrio entre estas dos partes hidrófila e hidrófoba de la molécula recibe el nombre de balance hidrofílico e hidrofóbico. Este concepto introducido por Griffin (1949) representa el porcentaje en peso de la parte hidrofílica e hidrofóbica de la molécula de tensioactivo y esta directamente relacionada con la solubilidad, formulación de las emulsiones y manejo de los tensioactivos (Tabla 1). El HLB se basa en un método experimental que consiste en atribuir un cierto valor (número) de HLB a los agentes tensioactivos y nos permite hacer una predicción del comportamiento, y de las propiedades fisicoquímicas de los tensioactivos. Representa numéricamente el predominio de la parte hidrófila o lipófila de la molécula en una escala de 0 a 20. Cuanto más hidrofílica sea la molécula más alto será su valor de HLB, mientras que los productos poco polares u oleosos les corresponden valores de HLB bajos (Rosen, 2004; Brown, 1991; Salanger, 1998).

HLB	Aplicación
1-3,5	Antiespumantes
4-6	Emulgentes para sistemas agua-aceite
7-9	Agentes humectantes
8-18	Emulgentes para sistemas aceite-agua
13-15	Detergentes
10-18	Solubilizantes

Tabla 1: Aplicaciones generales de los tensioactivos en base de su HLB (Jiménez Islas *et al.*, 2010).

1.2. BIOTENSIOACTIVOS

Además de los compuestos químicos que poseen propiedades tensioactivas, existen compuestos de origen biológico que también pueden presentar esta capacidad, y a los que se les denomina Biotensioactivos (BT). Los BT son moléculas que pueden ser producidas y secretadas por diferentes tipos de microorganismos y su interés se ha incrementado considerablemente en los últimos años por sus aplicaciones en la industria y el medio ambiente (Nitschke *et al.*, 2005 y Mukherjee *et al.*, 2006). Además, al presentar baja toxicidad, ser biodegradables y tener una mejor compatibilidad con el medio ambiente, los hacen candidatos para reemplazar a los tensioactivos de síntesis química.

Los biotensioactivos (BT) son moléculas anfipáticas producidas por una gran variedad de microorganismos (bacterias, hongos y levaduras) (Tabla 2). Estos se clasifican en dos grupos, los de alto peso molecular y bajo peso molecular. Los BT de bajo peso molecular son generalmente glicolípidos o lipopéptidos y son más efectivos para bajar la tensión superficial e interfacial del medio. Los BT de alto peso molecular, polisacáridos, proteínas, lipopolisacáridos y lipoproteínas, son más efectivos para estabilizar emulsiones aceite en agua (Pacwa-Plociniczak *et al.*, 2011).

El interés en los biotensioactivos se ha incrementado considerablemente en los últimos años, por ello el aumento del número de patentes internacionales para la aplicación de biotensioactivos en los sectores de la limpieza doméstica, alimentos, recuperación de crudo, remediación de sitios contaminados y aplicaciones en la agricultura crece de manera significativa año tras año. No obstante, uno de los factores que limita la comercialización de biotensioactivos en algunos casos, son los elevados costes de producción asociados a la producción a gran escala. Por esta razón, las recientes investigaciones se han enfocado tanto en la optimización de los procesos de producción y en la búsqueda de sustratos económicos con la finalidad de disminuir los costes de producción (Jiménez Islas *et al.*, 2010).

Biotensioactivo	Microorganismo productor
Glicolípidos	
Ramnolípidos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas sp.</i>
Trealosalípidos	<i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Rhodococcus sp.</i> <i>Mycobacterium phlei</i> <i>Arthrobacter paraffineus</i>

Soforolípidos	<i>Torulopsis bombicola</i> <i>Torulopsis apicola</i> <i>Torulopsis lipolytica</i> <i>Torulopsis</i> sp.
Celobiolípidos	<i>Ustilago zeae</i> <i>Ustilago maydis</i>
Mannosileritritol	<i>Candida antarctica</i> <i>Ustilago maydis</i>
Lipopéptidos y lipoproteínas	
Lichenisina	<i>Bacillus licheniformis</i>
Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Gramidicina S	<i>Bacillus brevis</i>
Fosfolípidos	
	<i>Corynebacterium</i> sp. <i>Thiobacillus</i> sp. <i>Micrococcus</i> sp.
Ácidos grasos/lípidos naturales	
	<i>Acinetobacter</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Micrococcus</i> sp. <i>Mycococcus</i> sp. <i>Candida</i> sp. <i>Penicillum</i> sp. <i>Aspergillus</i> sp.
Sideróforos	
Flavolípidos	<i>Flavobacterium</i> sp.
Tensioactivos poliméricos	
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Alasan	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
Lipomanan	<i>Candida tropicalis</i>
Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>

Tabla 2: Principales tensioactivos producidos por microorganismos. (Desai y Banat, 1997; Rosember y Ron, 1999; Muthusamy *et al.*, 2008; Van Hamme *et al.*, 2006; Makkar *et al.*, 2011; Bodour *et al.*, 2004)

1.2.1. Clasificación de los biotensioactivos

A diferencia de los tensioactivos sintetizados químicamente, los BT son clasificados principalmente por la composición química del grupo polar. Muchos biotensioactivos son aniónicos o neutros y la parte hidrofóbica consiste en largas cadenas de ácidos grasos y derivados de ácidos grasos. La parte hidrofílica puede contener carbohidratos, aminoácidos, grupos fosfatos o péptidos cíclicos. A continuación se detallan la clasificación de los biotensioactivos y sus principales estructuras.

1.2.1.1. Glicolípidos

Los BT más conocidos son glicolípidos. Son carbohidratos en combinación con una larga cadena de ácidos grasos o hidroxí ácidos grasos. La unión de las dos fracciones es por medio de un enlace éter o grupo éster. Entre los glicolípidos los más conocidos son los ramnolípidos, trealosalípidos y soforolípidos.

- Ramnolípidos

Los ramnolípidos son un grupo de glicolípidos compuestos por una o dos moléculas de ramnosa, denominándose mono-ramnolípidos y di-ramnolípidos respectivamente y una cola hidrofóbica formada por uno o dos ácidos grasos (Figura 7). Este biotensioactivo es producido por *Pseudomonas aeruginosa* cuando crece en las condiciones apropiadas. El tipo de ramnolípidos producido depende la cepa bacteriana, fuente de carbono y condiciones de cultivo. Estos presentan interesantes propiedades superficiales, reduciendo la tensión superficial del agua a valores cercanos a 30 mN/m. La concentración micelar crítica (CMC) de los ramnolípidos puros y sus mezclas depende de la composición química y sus valores están comprendidos entre 50 a 200 mg/L (Benincasa *et al.*, 2004). Los ramnolípidos representan una de las clases más importantes de biotensioactivos por sus altos rendimientos, propiedades biológicas (actividad antimicrobiana) y fisicoquímicas (emulsionantes) (Ábalos *et al.*, 2001, Haba *et al.*, 2003).

- Trealosalípidos

Los trealosalípidos (THL) están formados por disacáridos de trealosa unidos por el C-6 y C-6' a un ácido micólico (Figura 7). Los THL producidos por diferentes microorganismos, tales como *Mycobacteria*, *Corynebacteria*, *Arthrobacter*, *Nocardia*, *Gordonia* y especialmente *Rhodococcus*, pueden diferir en el tamaño y estructura del ácido micólico, el número de átomos de carbono y el grado de insaturación. Los trealosalípidos producidos por *Rhodococcus erythropolis* 51T7, tienen la capacidad de bajar la tensión interfacial a valores de 5 mN/m y un valor de CMC de 0,037 g/L; además presentan interesantes propiedades fisicoquímicas y biológicas, tales como capacidad emulsionante (Marqués *et al.*, 2009) y actividad hemolítica (Zaragoza *et al.*, 2009).

- Soforolípidos

Son dímeros de glucosa unidos mediante un enlace glucosídico a largas cadenas de ácidos grasos hidroxilados (Figura 7). En función de la longitud del ácido graso se obtienen diferentes tipos de soforolípidos. Estos glicolípidos son producidos principalmente por levaduras tales como *Torulopsis bombicola*, *Torulopsis*

petrophilum y *Torulopsis apicola*. Generalmente los soforolípidos se encuentran en forma de mezcla de macrolactonas y en forma de ácidos libres (Desai y Banat, 1997; Rosenberg y Ron, 1999).

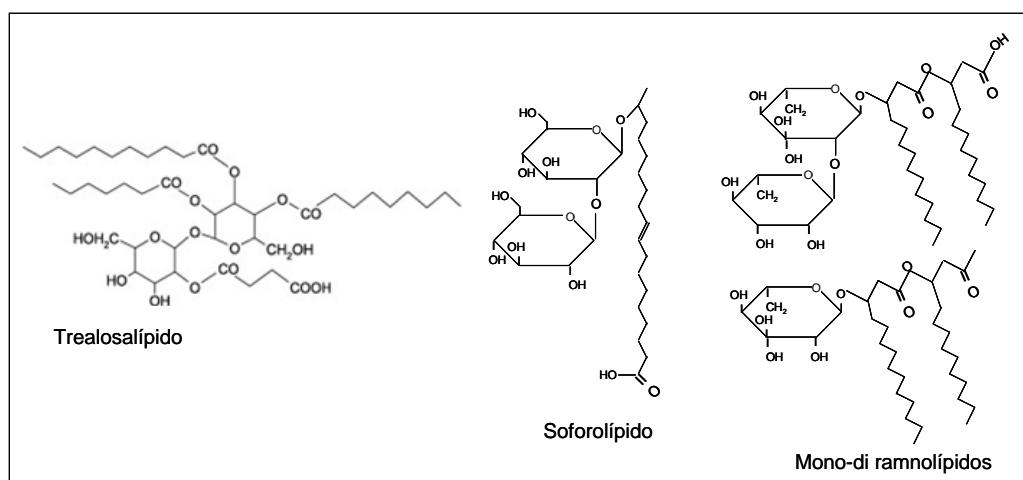


Figura 7: Ejemplos de tres glicolípidos sintetizados por bacterias, trealosalípido producido por *Rodococcus* sp., soforolípidio sintetizado por *Torulopsis* sp., y los ramnolípidos sintetizados por *Pseudomonas* sp.

1.2.1.2. Lipopéptidos

Un gran número de lipopéptidos cíclicos (lipopéptidos antibióticos) son producidos por *Bacillus subtilis* (surfactina) y *Bacillus polymyxa* (Polimixina) (Figura 8). Estas moléculas consisten en un lípido unido a una cadena péptica y presentan una marcada actividad superficial. Un claro ejemplo es la surfactina, siendo uno de los biotensioactivos más poderosos y teniendo la capacidad de bajar la tensión superficial desde valores de 72 a 27,9 mN/m a concentraciones de 0,005% (Desai y Banat, 1997). La estructura de la surfactina consiste en una cadena de 7 aminoácidos enlazados covalentemente por un extremo al grupo carboxílico y por el otro extremo al grupo hidroxilo de un beta-hidroxiácido (Figura 8). Dos de los aminoácidos, el ácido glutámico y el ácido aspártico contienen grupos carboxilos libres, el resto, poseen pequeños grupos alquílicos (Desai y Banat, 1997).

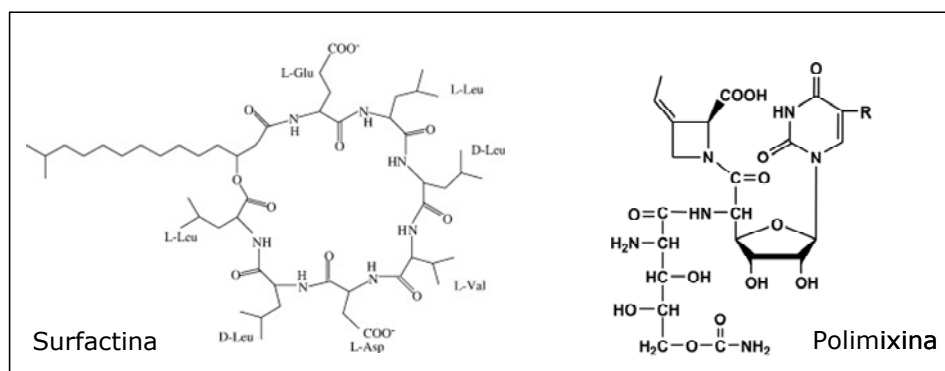


Figura 8: estructuras de dos lipopéptidos bacterianos producidos por bacterias del género *Bacillus* sp.

1.2.1.3. Fosfolípidos y ácidos grasos

Varias bacterias y levaduras producen grandes cantidades de ácidos grasos y fosfolípidos (Figura 9) durante el crecimiento en presencia de *n*-alcanos. Los fosfolípidos son los principales componentes de la membrana celular y forman parte de los llamados lípidos estructurales. Estos compuestos juegan diferentes papeles en los sistemas biológicos tales como comunicación celular, transporte de nutrientes o tensioactivos. Algunas clasificaciones dividen a los fosfolípidos en dos grupos, los que contienen glicerol, los glicerofosfolípidos y otro grupo los que contienen esfingosina, los esfingolípidos. La fosfatidiletanolamina producida por *R. erythropolis* a partir del crecimiento de la cepa en *n*-alcanos provoca una reducción de la tensión interfacial entre agua y hexadecano a valores menores que 1 mN/m y presenta una concentración micelar crítica (CMC) de 30 mg/L (Desai y Banat, 1997).

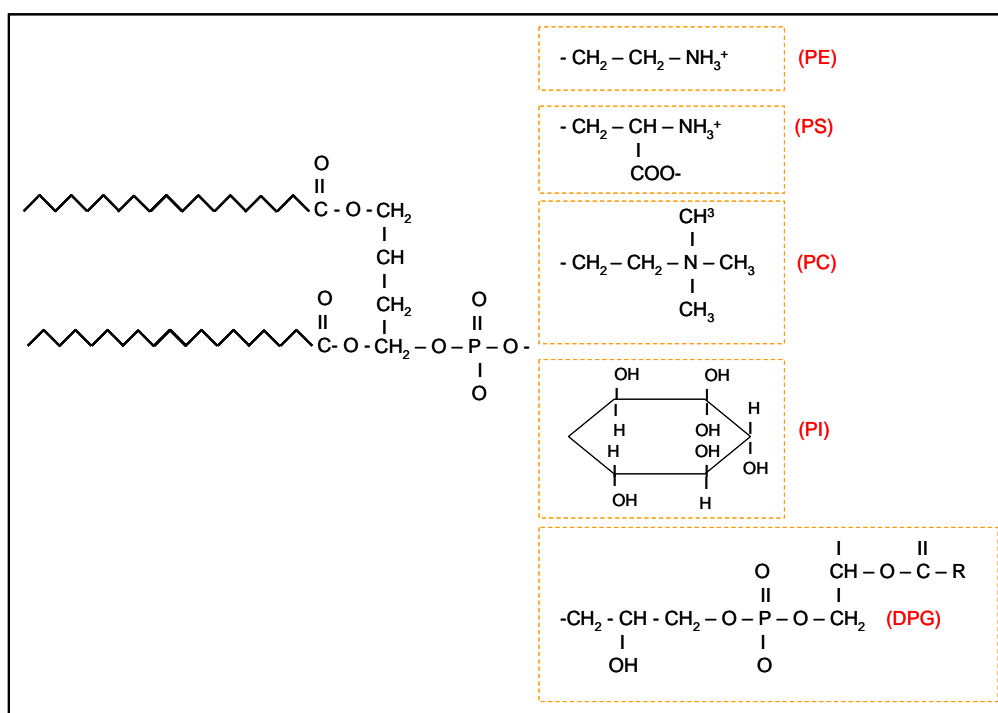


Figura 9: estructuras de los fosfolípidos fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC), difosfatidilglicerol (DPG), fosfatidilserina (PS) fosfatidilserina (PI) (Fang y Barcelona, 1998); y estructura general de un ácido graso.

Dependiendo de grupo polar unido al grupo fosfatidil, los fosfolípidos pueden clasificarse en: fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilglicerol (PG) y difosfatidilglicerol (DPG) (Domingues *et al.*, 2008). Una característica interesante de los fosfolípidos es que se agregan en soluciones acuosas y tienden a formar bicapas de manera espontánea. La estructura de bicapa en las membranas representa probablemente la organización más estable que pueden alcanzar las moléculas lipídicas en un entorno de fase

acuosa. Además, su balance hidrofóbico y hidrofílico (HLB) es directamente proporcional al largo de la cadena hidrocarbonada en su estructura (Fang y Barcelona, 1998).

1.2.1.4. Sideróforos

- Flavolípidos

Los flavolípidos son un nueva clase de biotensioactivos producidos por bacterias del género *Flavobacterium* sp. La estructura de los flavolípidos se muestra en la figura 10. La parte polar de estos compuestos contiene dos moléculas de cadaverina unidas por una molécula de ácido cítrico, mientras que la parte apolar esta compuesta por dos cadenas de ácidos grasos. Estos compuestos tienen la capacidad de bajar la tensión superficial a valores de 26 mN/m. Además, presentan una CMC relativamente alta en comparación a otros biotensioactivos 300 mg/L (Badour *et al.*, 2004). La cabeza polar de los flavolípidos se había descrito previamente en el sideróforo artrobactina y también están relacionados con la aerobactina.

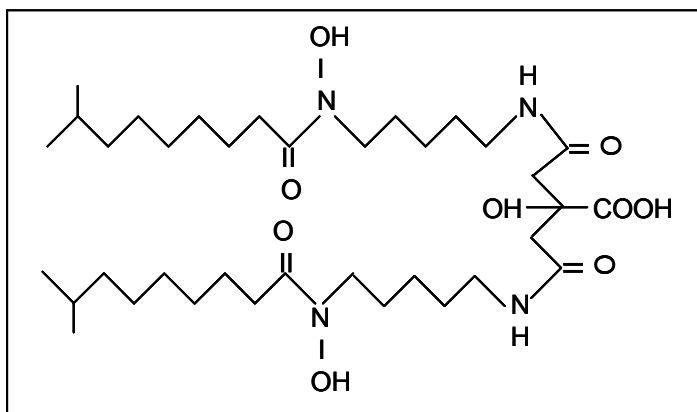


Figura 10: Estructura de un flavolípidio producido por las bacterias del género *Flavobacterium* sp. (Badour *et al.*, 2004)

1.2.1.5 Biotensioactivos poliméricos

Por último, los BT poliméricos son biopolímeros de alto peso molecular que se caracterizan por presentar viscosidades altas y elasticidad. Estas características hacen que estos productos puedan ser aplicados en diversas industrias. Algunos ejemplos son: Emulsan[®], Liposan[®], Alasan y otros complejos polisacáridos-proteínas. *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 produce un potente biotensioactivo aniónico llamado emulsan. El emulsan es muy efectivo como agente emulsionante de hidrocarburos en agua, siendo uno de los emulsionantes más poderosos conocidos hoy en día. El biodispersan, heteropolisacarido aniónico, es un agente dispersante producido por *Acinetobacter calcoaceticus* A2. Por último, el liposan es

un producto extracelular emulsionante soluble en agua, que es sintetizado por *Candida lipolytica* y este compuesto de 83% de carbohidrato y 17% de proteína (Desai y Banat, 1997).

1.2.2. Función de los biotensioactivos en los microorganismos

Existen varias hipótesis sobre los roles naturales que cumplen los biotensioactivos en el crecimiento de los microorganismos. Cuando se consideran los roles naturales de los BT, es importante destacar que estos son producidos por una gran variedad de microorganismos, presentando diferentes estructuras químicas y propiedades superficiales. Esta diversidad hace difícil generalizar sobre el rol natural de los biotensioactivos (Ron y Rosenberg, 2001). Las principales hipótesis propuestas sobre el papel que cumplen los biotensioactivos en el crecimiento de los microorganismos son las siguientes:

- Capacidad para solubilizar compuestos insolubles en fases acuosas, como son los hidrocarburos, facilitando la disponibilidad de estos sustratos para el crecimiento y mantenimiento de los microorganismos (Morikawa *et al.*, 1993, Zeng *et al.*, 2005, Francy *et al.*, 1991).
- Adherencia y liberación de células en superficies. Esta es una de las más importantes estrategias de supervivencia de los microorganismos debido a la presencia de biotensioactivos en la parte externa de la membrana o pared celular. Estos biotensioactivos son responsables de regular las propiedades de la superficie celular, promoviendo la adherencia o liberación de las células de sitios específicos de acuerdo a sus necesidades nutricionales o para evadir ambientes desfavorables (Rosenberg *et al.*, 1989).
- Movilidad bacteriana, algunas bacterias presentan desplazamiento sobre los medios de cultivos sólidos, lo que se pone en evidencia por la presencia de velos de crecimiento en el entorno de las colonias. Uno de los desplazamientos más conocidos es el fenómeno que se denomina "swarming bacteriano". Muchas bacterias que realizan este tipo de desplazamientos sintetizan y secretan tensioactivos para reducir la tensión interfacial y de esta manera facilitar el movimiento. De esta forma los grupos o poblaciones de microorganismos migran como una unidad (Kearns y Losick, 2003).
- Interacción célula-célula y formación de biofilms. La gran mayoría de las comunidades de microorganismos crecen embebidos en una matriz de

exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo lo que se denomina biofilm bacteriano. La estructura de la matriz del biofilm no es sólida y presenta canales que permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno incluso hasta las zonas más profundas del biofilm. Algunos estudios atribuyen la existencia de estos canales a los biotensioactivos. Un ejemplo son los ramnolípidos que tienen la capacidad de mantener abiertos los canales en los biofilms y de esta manera permitir las interacciones célula-célula (Davey, 2003; Espinosa-Urgel, 2003).

- Actividad antibiótica. Dicha actividad ha sido demostrada por varios biotensioactivos, principalmente los lipopéptidos y glicolípidos. Ejemplos de éstos son los ramnolípidos de *P. aeruginosa* y la surfactina de *B. subtilis*, los cuales presentan actividad antimicrobiana, al solubilizar los principales componentes de las membranas celulares microbianas. Los biotensioactivos brindan una mayor oportunidad de supervivencia en nichos con una alta competitividad por nutrientes a los microorganismos productores (Lin, 1996).
- Los biotensioactivos tienen la capacidad de movilizar metales pesados. Algunos estudios han demostrado que los ramnolípidos eliminan algunos metales pesados, tales como cadmio, plomo y zinc del suelo. Un estudio con estos biotensioactivos determinó que la población microbiana se vio aumentada después de la eliminación los metales pesados como consecuencia una disminución de la toxicidad (Juwarkar *et al.*, 2007; Dahrazma y Mulligan, 2007).

1.2.3. Búsqueda y selección de nuevos microorganismos productores de biotensioactivos

El principal objetivo en la búsqueda de nuevos biotensioactivos es encontrar nuevas estructuras con alguna de las siguientes propiedades, una fuerte actividad superficial e interfacial, baja concentración micelar crítica (CMC), alta capacidad emulsionante, buena solubilidad y actividad en un amplio rango de pH. Además de estas propiedades fisicoquímicas, los biotensioactivos deben ser económicamente competitivos. Por lo tanto, el segundo objetivo en la selección es descubrir nuevas cepas bacterianas que sean buenas productoras de biotensioactivos y que estos se produzcan con un alto rendimiento (Walter *et al.*, 2000). Una eficiente estrategia de búsqueda y selección de microorganismos es la clave para el éxito en el aislamiento de nuevos e interesantes cepas o sus variantes, debido al gran número de cepas

que deben ser caracterizadas. Una estrategia completa para la búsqueda de nuevos biotensioactivos consiste en tres pasos: muestreo, aislamiento de cepas e investigación de las cepas de interés.

Como se comentó anteriormente los biotensioactivos pueden tener varios roles fisiológicos y conferir diferentes ventajas a los microorganismos que los producen, tales como incrementar la biodisponibilidad de los sustratos insolubles en agua por emulsificación, movilizar metales pesados, presentar actividad antimicrobiana, estar involucrados en la procesos de patogénesis, regular la unión y desunión de los microorganismos en las superficies, etc. (Ron y Rosenberg, 2004). De acuerdo a estos roles fisiológicos tan distintos, los microorganismos productores de biotensioactivos pueden ser encontrados en diferentes ambientes. Muchas bacterias productoras de biotensioactivos han sido aisladas desde muestras de suelos o aguas contaminadas con compuestos orgánicos hidrofóbicos como por ejemplo desechos de refinería, aceites etc. Por tanto, algunos autores indican que en los suelos contaminados se encuentra una mayor cantidad de microorganismos productores que en suelos no contaminados (Walter *et al.*, 2000). Sin embargo, en ambientes no contaminados, muestras de suelos naturales, ambientes marinos, también se han aislado interesantes microorganismos productores de biotensioactivos.

1.2.4. Producción de biotensioactivos

La viabilidad económica en la producción a gran escala de diversos metabolitos, mediante procesos biotecnológicos suele tener como cuello de botella las etapas de producción o purificación. En el caso particular de los BT, se ha determinado que la biosíntesis es el paso limitante para su producción a gran escala. Para tener un proceso de producción de BT económicamente competitivo, es recomendable que se den los siguientes factores (Mukherjee *et al.* 2006, Lin, 1996):

- i) El uso de sustratos económicos o de desecho que disminuyan los costos del proceso. Los biotensioactivos pueden sintetizarse a partir de diversos sustratos, sin embargo, se está dando una gran importancia a los provenientes de residuos agroindustriales (la fuente de carbono del medio de cultivo supone del 10-30% del coste).
- ii) Selección del microorganismo productor, optimización del medio de cultivo, incluyendo aspectos como la composición, condiciones del medio (pH,

temperatura y oxígeno), edad del inóculo, y por último, la minimización de residuos y subproductos.

- iii) Procesos de separación rentables para la máxima producción y optimización de la recuperación de biotensioactivos (60% del coste operacional).
- iv) Finalmente el desarrollo y uso de cepas sobreproductoras, mutantes o recombinantes, para aumentar los rendimientos.

1.2.4.1. Factores que afectan en la optimización de las condiciones de cultivo.

Una buena optimización de los componentes del medio de cultivo y de las condiciones de cultivo, se traduce generalmente en un aumento significativo de la producción de BT. Los principales factores que pueden afectar al tipo, calidad y cantidad de los biotensioactivos producidos dependen principalmente del microorganismo seleccionado, de la composición del medio de cultivo y de las condiciones de cultivo.

a) Efecto de la fuente de carbono

La fuente de carbono influye en las rutas de síntesis de los BT por inducción o represión. En la mayoría de los casos, la adición de sustratos inmiscibles en agua, como *n*-alcanos y otro tipo de hidrocarburos, promueve la inducción en la producción del biotensioactivo. Sin embargo, fuentes de carbono solubles en agua, tales como glucosa, glicerol, manitol y etanol, también han sido utilizadas para la producción de BT (Nitschke *et al.*, 2005; Robert *et al.*, 1989). Por otro lado, la fuente de carbono utilizada para la producción de BT también puede afectar en la estructura del compuesto producido (Haba *et al.*, 2000).

b) Fuentes de nitrógeno

La fuente de nitrógeno es esencial para el crecimiento de microorganismos, utilizándola principalmente para la síntesis de proteínas y enzimas. Se han utilizado diferentes fuentes de nitrógeno para la producción de biotensioactivos. Diversos estudios al respecto han descrito ejemplos en los que la naturaleza de la fuente de nitrógeno ejerce un papel definitivo sobre la producción de biotensioactivos en el medio (Robert *et al.*, 1991).

c) Efecto de las condiciones de cultivo

Las condiciones de cultivo tales como temperatura, pH, agitación y disponibilidad de oxígeno, también afectan a la producción y características del BT. En algunos casos la optimización de estos factores, puede producir un aumento en la producción de BT. Por ejemplo la temperatura de incubación ha mostrado un efecto importante en sobre la producción de biotensioactivos con *P. aeruginosa* 44T1 (Robert *et al.*, 1989). Por otro lado, Pruthi y Cameotra (2003), utilizando *Pseudomonas putida*, observaron una mejora en la producción de BT al variar el pH.

1.2.5. Aplicaciones industriales de los biotensioactivos

Las propiedades de los biotensioactivos permiten su uso en una gran variedad de procesos industriales, tales como en la industria alimentaria, cosmética, farmacéutica y en la agricultura (Bernat *et al.*, 2000). Generalmente los tensioactivos son utilizados a nivel industrial como agentes humectantes (adsorción en la interfase líquido-sólido), como espumantes (interfase líquido-gas), estabilizadores de emulsiones o microemulsiones (interfase líquido-líquido), dispersantes, como impermeabilizantes, en detergencia, como germicidas, insecticidas, como engrasantes o desengrasantes, en el teñido, como suavizantes o lubricantes, entre otros (Singh *et al.*, 2007). En la actualidad es posible encontrar muchos usos y aplicaciones a los BT, sin embargo, su aplicación práctica está limitada principalmente por sus costos de producción (Georgiou *et al.*, 1992).

En los últimos años el número de patentes relacionadas con las aplicaciones de los biotensioactivos han ido en aumento. Por ejemplo entre las aplicaciones patentadas se encuentra la eliminación de biofilms en superficies que requieran evitar el crecimiento de bacterias y hongos, como las destinadas a procedimientos médicos, ensayos químicos o preparación de productos alimenticios. En relación a los procedimientos médicos, se ha confirmado la idoneidad de los ramnolípidos como estrategia para prevenir la colonización microbiana en prótesis de silicona en pacientes con laringectomía (Rodrigues *et al.*, 2006 a y b). También se han patentado algunos BT como ingredientes en formulaciones de alimentos. Los ramnolípidos por ejemplo, son utilizados para mejorar la estabilidad, textura, volumen y conservación en productos de panadería y pastelería (Van Haesendonck y Vanzeveren, 2004) y como fuente de *L*-ramnosa (Linhardt *et al.*, 1989) un precursor del sabor en productos alimenticios de alta calidad.

Los biotensioactivos también han sido utilizados en aplicaciones terapéuticas y biomedicina. Varios biotensioactivos han mostrado acción antimicrobiana contra bacterias, hongos y levaduras. Los lipopéptidos, iturina y surfactina, producidos por *Bacillus subtilis* presentan una potente actividad antibacteriana y antifúngica. Por ejemplo la surfactina tiene la capacidad de inactivar el desarrollo de algunos virus, tales como el herpes y rotavirus a una concentración de 80 mM del BT. Por otro lado, recientes estudios han determinado que algunos biotensioactivos pueden presentar actividad antitumoral, inhibiendo la proliferación celular de células cancerígenas por la inducción de la muerte celular programada o apoptosis. Esta propiedad ha sido demostrada en diversos biotensioactivos con naturaleza anfipática, tales como soforolípidos (Chen *et al.*, 2006), esfingolípidos (Minamino *et al.*, 2003), surfactina (Seydlová y Svobodová, 2008), etc. En la tabla 3 se presentan algunos ejemplos de las diferentes áreas industriales y las potenciales aplicaciones de los biotensioactivos.

Aplicaciones de los biotensioactivos.		
Industria	Aplicación	Función del biotensioactivo
Petróleo	Mejora de la recuperación Emulsiones generadas	Recuperación terciaria de petróleo. Liberación de crudo atrapado en los capilares de las rocas. De-emulsificación y solubilización de crudo, reducción viscosidad y γ_{TS} .
Medio Ambiente	Biorremediación de suelos contaminados por metales e hidrocarburos	Movilización de tóxicos adsorbidos a las partículas del suelo, aumento de su biodegradación.
	Tratamiento de aguas residuales oleosas y derrames de crudo	De-emulsificación y aumento del crecimiento microbiano.
Agricultura	Control biológico	Acción directa o facilitando la acción de otros microorganismos. Adyuvante en pesticidas y herbicidas.
Industria Alimentaria	Ingrediente en formulaciones	Emulsificación y consistencia de los preparados alimenticios. Inhibición de la formación de biofilms en superficies.
	Agente antiadhesivo	
Industria Cosmética	Productos de salud y Belleza	Emulsionantes, espumantes, formación de vesículas, agentes humectantes

Industria Farmacéutica	Agentes terapéuticos	Antimicrobianos, antivirales, antifúngicos, inmunomoduladores, Terapia génica.
Otras Industrias	Pintura, papel, textil, cerámica, detergentes, minería...	Agente humectante, penetrante, espesante

Tabla 3: ejemplos de las potenciales aplicaciones de los biotensioactivos. (Muthusamy *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2007)

1.2.6. Biotensioactivos frente a los tensioactivos sintéticos.

Las tres propiedades básicas biodegradabilidad, baja toxicidad y biocompatibilidad, son las que en primer momento hicieron poner la atención sobre los biotensioactivos. La mayoría de los tensioactivos químicos presentan una alta resistencia a la degradación por microorganismos y alta toxicidad cuando se acumulan en el medio ambiente, en comparación con los biotensioactivos. La biocompatibilidad es esencial para su aplicación en medio ambiente, cosmética, industria farmacéutica y como aditivos en la industria alimentaria.

Los biotensioactivos ofrecen un amplio rango de nuevas estructuras y propiedades fisicoquímicas. Son moléculas complejas producidas por una gran variedad de microorganismos de acorde a sus necesidades fisiológicas. Esto se traduce en una alta especificidad en aplicaciones muy concretas. Además poseen uno o más grupos funcionales y centros quirales que podrían ser utilizados como bloques de construcción en la síntesis de moléculas de interés (Sánchez-Martínez, 2010).

La mayoría biotensioactivos presentan bajos valores de CMC y gran actividad superficial, con adsorción gradual y actividad continuada. Esto hace que su eficacia se equipare y en algunos casos sobrepase a los tensioactivos químicos. Además, mantienen su efectividad en condiciones extremas, de temperatura, pH, fuerza iónica y presión, y ante disolventes orgánicos. Esto es importante teniendo en cuenta sus potenciales aplicaciones en diferentes campos industriales, donde frecuentemente implican procesos que requieren exposiciones a condiciones extremas (Sánchez-Martínez, 2010).

Su actividad biológica les aporta importantes aplicaciones con el descubrimiento de nuevos usos terapéuticos formación de distintos tipos de autoensamblajes y empaquetamiento (micelas, vesículas, cristales líquidos). A pesar de estas ventajas, por el momento la mayoría de los biotensioactivos aún no son capaces de competir

con los derivados del petróleo siendo tres aspectos principales los que deben mejorar en su producción: el coste, funcionalidad y la capacidad de producción.

1.2.7. Descripción de género *Sphingobacterium* sp.

La familia *Sphingobacteriaceae* pertenece al phylum de *Bacteroidetes* y esta compuesta de 8 géneros bacterianos (*Sphingobacterium*, *Pedobacter*, *Mucilaginibacter*, *Nubsella*, *Olivibacter*, *Parapedobacter*, *Pseudosphingobacterium* y *Solitalea*) todos aislados comúnmente de muestras ambientales. El género *Sphingobacterium* fue establecido por Yabuuchi *et al.* (1983), ya que dos especies del género *Flavobacterium* fueron reclasificadas como especies de este nuevo género (*Sphingobacterium multivorum* y *Sphingobacterium spiritivorum*) y una nueva especie (*Sphingobacterium mizutae*). Las bacterias pertenecientes al género *Sphingobacterium* son bacilos Gram negativos, catalasa y oxidasa positivos, no formadores de esporas, no poseen flagelos pero pueden presentar movilidad por desplazamiento, son quimiorganotrofos, no producen indol ni acetilmetilcarbinol, son heparinasa negativos, producen ácidos de los carbohidratos por forma oxidativa y no fermentativa, como lípidos celulares presentan esfingolípidos (Krieg *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008). Estos microorganismos son aislados frecuentemente a partir de suelos, composta o lodo, y ocasionalmente de muestras clínicas (Yabuuchi *et al.*, 1983, Freney *et al.*, 1987).

El género de *Sphingobacterium* comprende 15 especies reorganizadas como sigue: en *S. anhuiense* (Wei *et al.*, 2008), *S. antarcticum* (Shivaji *et al.*, 1992), *S. bambusae* (Duan *et al.*, 2009), *S. canadense* (Mehnaz *et al.*, 2007), *S. composti* (Ten *et al.*, 2006), *S. daejeonense* (Kim *et al.*, 2006), *S. faecium* (Takeuchi y Yokota, 1992), *S. kitahiroshimense* (Matsuyama *et al.*, 2008), *S. mizutaii* (Yabuuchi *et al.*, 1983), *S. multivorum* (Yabuuchi *et al.*, 1983), *S. shayense* (He *et al.*, 2010), *S. siyangense* (Liu *et al.*, 2008), *S. thalpophilum* (Takeuchi y Yokota, 1992), *S. wexiniae* (Zhang *et al.*, 2011) y *S. spiritivorum* (Yabuuchi *et al.*, 1983). Nueve de estas especies han sido descritas en los últimos seis años. Dos especies que han sido descritas como *Sphingobacterium* han sido reclasificadas en el género de *Pedobacter* como *Pedobacter heparinus* y *Pedobacter piscium* (Steyn *et al.*, 1998).

Capítulo 2

Objetivos

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de la presente tesis doctoral es la búsqueda y caracterización de nuevos biotensioactivos. Para ello se realizaron los siguientes objetivos específicos:

1. Aislamiento, selección e identificación de bacterias capaces de bajar la tensión superficial del medio.
2. Mejorar la producción: el estudio del efecto de los nutrientes del medio de cultivo, estrategia de alimentación y optimización de la extracción.
3. Purificación y caracterización química del producto.
4. Estudio de las propiedades fisicoquímicas y propiedades biológicas del nuevo producto.

Capítulo 3

Resultados (Publicaciones)

Publicaciones, factor de impacto y contribución en cada una de ellas:

Ana M. Marqués Villavecchia en calidad de directora de tesis, confirma que las presentes publicaciones son los resultados de la tesis doctoral de César Burgos Díaz. Su contribución a los resultados es específica para cada publicación, así como el correspondiente factor de impacto.

C. Burgos-Díaz, R. Pons, M.J. Espuny, F.J. Aranda, J.A. Teruel, A. Manresa, A. Ortiz y A.M. Marqués (2011). Isolation and partial characterization of a biosurfactant mixture produced by *Sphingobacterium* sp. isolated from soil. *Journal of Colloid and Interface Science* 361; 195-204. (doi:10.1016/j.jcis.2011.05.054).

C. Burgos Díaz realizó toda la parte experimental para lograr los resultados de esta publicación. El factor de impacto 2010 de la revista *Journal of Colloid and Interface Science* fue de 3,066; correspondiente a la categoría de química y física.

Ana M. Marqués[†], César Burgos-Díaz[†], Francisco José Aranda, José Antonio Teruel, Àngels Manresa, Antonio Ortiz y Maribel Farfán (2012). *Sphingobacterium detergens* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Papers in Press. (doi:10.1099/ijms.0.036707-0). [†]Contributed equally to this work.

C. Burgos Díaz realizó toda la parte experimental para lograr los resultados de esta publicación. El factor de impacto 2011 de la revista *International Journal of Systematic evolutionary and Microbiology* fue de 2,268; correspondiente a la categoría de microbiología.

C. Burgos-Díaz, R. Pons, M.J. Aranda, J.A. Teruel, A. Manresa, A. Ortiz y A.M. Marqués (2012). The Production and Physicochemical Properties of a Biosurfactant Mixture Obtained from *Sphingobacterium detergens*. *Journal of Colloid and Interface Science*. (Artículo enviado).

C. Burgos Díaz realizó toda la parte experimental para lograr los resultados de esta publicación. El factor de impacto 2011 de la revista *Journal of Colloid and Interface Science* fue de 3,070; correspondiente a la categoría de química y física.

Publicación en capítulos de libros:

César Burgos-Díaz, Núria Piqué, Ángeles Manresa, Ana M. Marqués (2012). Advances in the Research of New Biosurfactants and their Potential use in the Biomedical and Pharmaceutical Industry. Recent Advances in Pharmaceutical Sciences II, 2012: 151-167 ISBN: 978-81-7895-569-8. Transworld Research Network 37/661 (2).

Los resultados de estas publicaciones también han permitido la presentación en 5 comunicaciones científicas:

1. Formato Póster: Production of biosurfactants by *Sphingobacterium detergens*. César Burgos-Díaz., Ramón Pons., Ana M. Marqués. Congreso Internacional "ENCUENTROS 2012". París, Francia (4-6 de Julio 2012)
2. Comunicación Oral: Búsqueda de bacterias productoras de biotensioactivos: *Sphingobacterium detergens* sp. nov. César Burgos-Díaz, Maribel Farfán, Ruth Ferrer, Raquel Martín-Venegas, Ana M. Marqués. XIV Reunión de Taxonomía, Filogenia y Diversidad Microbiana. Granada-España (10-12 de mayo 2012).
3. Comunicación Oral: Tensioactivos Bacterianos. César Burgos-Díaz. "Seminari de Recerca" (Seminarios de Investigación). Organizado por la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona (Octubre 2011)
4. Formato Póster: A New Surfactant-Producing Bacterium Isolated from Volcanic Soil Samples. Burgos-Díaz C., Aranda F.J., Teruel J.A., Ortiz A., Espuny M.J., Marqués A.M; 14th European Congress on Biotechnology. Barcelona, España. (Septiembre de 2009)
5. Comunicación Oral: Búsqueda e identificación de nuevos biotensioactivos de origen bacteriano. "II Jornada de Recerca a la Facultat de Farmàcia". Organizada por la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona (Febrero 2009)

Dra. Ana M. Marqués Villavecchia

Barcelona, 1 de Octubre de 2012

ARTÍCULO 1

Aislamiento y caracterización parcial de una mezcla de biotensioactivos producidos por *Sphingobacterium detergens* sp. aislada desde suelo.

Isolation and partial characterization of a biosurfactant mixture produced by *Sphingobacterium* sp. isolated from soil.

**C. Burgos-Díaz^a, R. Pons^b, M.J. Espuny^a, F.J. Aranda^c, J.A. Teruel^c, A. Manresa^a,
A. Ortiz^c and A.M. Marqués^a.**

a Lab. Microbiology, Fac. Pharmacy, Univ. Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

b Departament de Tecnologia Química i de Tensioactius, Institut de Química Avançada de Catalunya, IQAC-CSIC, Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain

c Dept. of Biochemistry and Molecular Biology-A, Fac. of Veterinary, Univ. Murcia, 30100 Murcia, Spain

Journal of Colloid and Interface Science 361; 195-204 (2011).

(doi:10.1016/j.jcis.2011.05.054)

3.1. Isolation and partial characterization of a biosurfactant mixture produced by *Sphingobacterium* sp. isolated from soil.

Revista: Journal of Colloid and Interface Science

Factor de impacto: 3,066 (año de publicación: 2011)

Resumen

A partir de 10 muestras de suelos volcánicos se aislaron 54 cepas, escogiendo el aislado 6.2S por su capacidad de bajar la tensión superficial e interfacial del medio de cultivo. La cepa 6.2S fue identificada como un *Sphingobacterium* sp; siendo la primera cepa de este género que se ha descrito como productora de biotensioactivos.

Cuando *Sphingobacterium* sp. creció en el medio G-MSM suplementado con n-alcanos, se redujo la tensión superficial del sobrenadante del cultivo de 55mN/m a 32mN/m. Después de 48 horas de cultivo en el medio mineral (G-MSM), se obtuvo un crecimiento de 3,8 mg de proteína/mL y 190 mg/L de extracto orgánico. Tras el estudio de la composición del extracto orgánico se determinó que este estaba formado mayoritariamente por lípidos (71,6%) y en menor proporción por carbohidratos (5,6%) y proteínas (4,4%). El extracto crudo (mezcla de BT) reduce marcadamente la tensión superficial (22mN/m), siendo uno de los tensioactivos bacterianos que produce valores de tensión superficial más bajos, es decir, más eficaces.

El extracto crudo fue purificado mediante una modificación del método descrito por Van Echten-Deckert (2000) y se obtuvieron dos fracciones, fracción A y fracción B, ambas con actividad superficial. La fracción A (30% del extracto total) bajó la tensión superficial del agua a 33mN/m, y presentó una CMC de 0,18 mg/mL. Por TLC (cromatografía capa fina) se observaron tres compuestos mayoritarios con ninhidrina (determinación de grupos amino) y azul de molibdeno (determinación de fosfolípidos). De acuerdo con estos resultados se puede decir que los compuestos analizados pertenecen a la familia de fosfolípidos y que todos presentan grupos aminos en su estructura. Una posterior purificación por TLC-preparativa de cada uno de los compuestos de esta fracción y un posterior análisis por TLC-bidimensional usando diferentes patrones de los fosfolípidos mostró que la fracción A era una mezcla de fosfolípidos y que el compuesto mayoritario de esta mezcla era

fosfatidiletanolamina. Finalmente un análisis de FT-IR confirmó la presencia de los grupos funcionales característicos de los fosfolípidos

La fracción B (61,3% del extracto total), de acuerdo con los resultados obtenidos por TLC, está formada por una mezcla de lipopéptidos y al menos un glicolípido. La curva de tensión superficial v/s concentración de BT mostró dos mesetas. La primera de ellas que corresponde a la concentración de agregación crítica (CAC) del BT con una proteína (2,7 g/L) y la segunda inflexión que corresponde a la CMC en agua (6,3g/L).

El porcentaje de emulsión (%E₂₄) del sobrenadante del medio de cultivo de *Sphingobacterium* sp. se mantuvo entre 70-65% durante 5 días, y solo se observó un pequeño descenso (65-60% emulsión) después de un mes. El BT mantuvo sus propiedades con el incremento de la temperatura (0°C - 100°C) y solo se observó un pequeño descenso en los valores de tensión superficial e interfacial y del porcentaje de emulsión después del tratamiento térmico de 121°C. A pH ácido (1-5), se obtuvieron valores más bajos de tensión superficial e interfacial (37 mN/m y 10 mN/m, respectivamente), mientras que a pHs superiores a 7 se observó una disminución de la actividad superficial.



Isolation and partial characterization of a biosurfactant mixture produced by *Sphingobacterium* sp. isolated from soil

C. Burgos-Díaz^a, R. Pons^b, M.J. Espuny^a, F.J. Aranda^c, J.A. Teruel^c, A. Manresa^a, A. Ortiz^c, A.M. Marqués^{a,*}

^a Lab. Microbiology, Fac. Pharmacy, Univ. Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

^b Departament de Tecnologia Química i de Tensioactius, Institut de Química Avançada de Catalunya, IQAC-CSIC, Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain

^c Dept. of Biochemistry and Molecular Biology-A, Fac. of Veterinary, Univ. Murcia, 30100 Murcia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 March 2011

Accepted 14 May 2011

Available online 30 May 2011

Keywords:

Biosurfactant

Sphingobacterium sp.

Surface tension

Interfacial tension

cmc

Phosphatidyletanolamine

ABSTRACT

Strain 6.2S, isolated from soil and identified as a *Sphingobacterium* sp., is the first strain in this genus to be reported as a biosurfactant producer, being able to reduce the surface tension of its culture supernatant to 32 mN/m. In this work, biosurfactants from the culture supernatant were purified and partially characterized. The crude extract (10 g/L) was very effective in reducing surface tension (22 mN/m). Thin layer chromatography (TLC) indicated that a mixture of various biosurfactants was present in the 6.2S crude extract. After purification, Fraction A, a phospholipid mixture, reduced surface tension to 33 mN/m. Fraction B was a mixture of lipopeptides and at least one glycolipid. The surface tension–concentration curve showed two plateaux, the first of which can be attributed to a critical aggregation concentration of the biosurfactant with a protein (2.7 g/L) and the second to the true cmc in water (6.3 g/L).

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The small size of prokaryotes affects a number of their biological properties. Prokaryote cells communicate with the environment through their envelopes. Smaller cells have a higher surface/volume ratio, and thus can have a more efficient exchange of nutrients with their surroundings than larger cells. To have an effective relationship with the environment, microorganisms need surfactants to change the surface or interfacial properties of the cell or surroundings. In fact, all microbial life is impacted by interfacial phenomena, and biosurfactants (BS) are common substances with which microorganisms deal with interfacial challenges.

An interface is any boundary between two different phases and microbial life may be more common at interfaces, as is evidenced by microbial biofilms, surface films and aggregates. Surface or interfacial tension changes are needed for the erection of fruiting bodies, swarming of cells, gliding motility, and biofilm formation and development. Additional biological roles of surfactants include increasing the surface area and bioavailability of hydrophobic water-insoluble substrates, heavy metal binding, bacterial pathogenesis and quorum sensing response. BS are involved in the complex social responses that control cell development and they also have a number of biological functions including anti-microbial and anti-tumour activities [1].

Surfactants are amphiphilic compounds with a dual affinity for differentiating solvent polarity. The simplest structure consists of two moieties: one with a strong affinity for polar (aqueous) solvents and the other with low polarity that has stronger affinity for apolar solvents than for water. Both moieties can have a wide range of chemical structural features. In general, the affinity for water is due to the presence of ionisable groups or a number of strongly polar groups such as alcohol or amine groups. The low polarity moieties are generally constituted by hydrocarbon tails, often in the form of fatty acids linked to the polar head [2]. Due to their origin, one important feature of BS is that they generally have very low critical micelle concentration, lower than many synthetic surfactants, which makes them effective at low concentrations. These compounds have several other advantages, such as low toxicity, high biodegradability and effectiveness at extreme temperatures or pH values and salinity [3].

Broadly speaking, biosurfactants can be classified into two groups, those of low or high molecular weight. The low molecular weight BS are generally glycolipids or lipopeptides and are more effective at lowering the interfacial and surface tension. The high molecular weight group of BS, which are mostly amphiphilic polysaccharides, proteins, lipopolysaccharides and lipoproteins, are effective stabilizers of oil-in-water emulsions [4].

In our developed, waste-generating society, there is growing interest in reducing consumption and the ensuing production of waste to cut the costs of its treatment and disposal. Synthetic surfactants are commonly produced using a variety of chemical

* Corresponding author. Fax: +34 934024498.

E-mail address: ammarques@ub.edu (A.M. Marqués).

synthetic strategies, depending on the type and structure of the desired molecule [5]. In recent years, natural products such as BS, produced by living cells, have been receiving far more attention than their synthetic counterparts. Stricter legal control of environmental pollution from industrial activities and health regulations favour the replacement of chemical BS by their biodegradable alternatives [3].

From a biotechnological perspective, the production of BS is important owing to their potential applications in food, cosmetics, pharmaceutical, agricultural and petrochemical industries. To expand the applications of BS, more productive strains, better fermentation conditions and alternative substrates are needed. Many of the envisaged applications depend considerably on whether they can be produced economically.

In the present work, the properties of a BS mixture produced during bacterial growth were studied. *Sphingobacterium* sp., strain 6.2S, isolated from soil, was selected, studied and described for the first time as a BS producer. Strain 6.2S reduced the surface tension of the supernatant culture broth by producing a thermostable BS, whose activity increased at an acidic pH. The surface tension achieved with the crude extract was as low as 22 mN/m, which to the best of our knowledge matches the best biosurfactant performances. A crude extract study showed that the selected strain produced a mixture of at least three families of BS (phospholipids, lyopeptides and glycolipids). The complexity of the mixture is exemplified by the synergistic and antagonistic effects on surface tension observed at different purification levels. The aim of this work was to initiate the characterization of these BS, study the behaviour of this system as a natural mixture and carry out a preliminary surface tension characterization of the different extracts.

2. Material and methods

2.1. Microorganism screening

Soil samples were collected randomly from the volcanic soil in the Azores islands. For bacterial isolation 1 g of soil was cultivated in a screening mineral salt medium (S-MSM: KH_2PO_4 , 0.5 g L⁻¹; K_2HPO_4 , 1 g L⁻¹; NaNO_3 , 1.2 g L⁻¹; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 1.1 g L⁻¹; CaCl_2 , 0.01 g L⁻¹; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g L⁻¹; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g L⁻¹; KCl , 1 g L⁻¹; trace elements 0.05 mL L⁻¹ [6] with a carbon source pool (0.05 g/L sodium citrate, 0.05 g/L C_{11–13} and 0.05 g/L yeast extract). To avoid complex formation, the mineral media and the carbon sources were autoclaved separately. The media was incubated for 7 days at 30 °C and 150 rpm, followed by two 10 mL subcultures in the same medium and conditions. The culture, after serial dilutions (10⁻⁵), was spread onto TSA. Plates were incubated at 30 °C for 1–2 weeks. Colonies on the plates were purified by transferring them onto new TSA plates. Isolated bacteria were studied for BS production and selected when surface tension was <40 mN/m and interfacial tension was <10 mN/m.

2.2. Bacterial identification

For bacterial identification, conventional tests were carried out as described by Barrow and Faltham [7] and Murray et al. [8]. Positive and negative controls were included in all tests. Cytochrome-C oxidase was determined by adding a few drops of N,N,N',N'-tetramethyl-3-p-phenylene-diamine solution to a 2-day old Trypticase Soy agar plate growth (TSA, Pronadisa, Spain). Citrate utilization was determined on Simmons citrate agar (Oxoid, England). Gelatinase activity was studied in gelatine medium as described by Pochon and Tardieux [9]. Growth at different temperatures in TSA and at various NaCl concentrations in Nutrient agar

(Panreac, Spain, supplemented with different NaCl concentrations) was assessed after 5 days incubation. Growth on MacConkey agar was also evaluated at 30 °C. Other physiological characteristics were determined with an API 20 NE gallery according to the instructions of the manufacturer (Biomérieux, France). The measurement of G + C content of chromosomal DNA was determined using the HPLC technique described by Mesbah et al. [10] at BBBM/LMG laboratory (Gent, Belgium).

2.3. Growth conditions

One litre baffled Erlenmeyer flasks were filled with 200 mL of growing mineral salts medium (G-MSM) (KH_2PO_4 , 0.5 g L⁻¹; K_2HPO_4 , 1.0 g L⁻¹; NaNO_3 , 2.5 g L⁻¹; CaCl_2 , 0.01 g L⁻¹; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g L⁻¹; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g L⁻¹; KCl , 1.0 g L⁻¹; yeast extract, 0.1 g L⁻¹; trace elements solution 0.05 mL L⁻¹ [6], 2% C_{11–13} (C₁₀ 9.3%, C₁₁ 32.4%, C₁₂ 31.3%, C₁₃ 26.7%) plus 2% (v/v) of inoculum suspension in Ringer solution. The inoculum consisted of a strain 6.2S suspension of a preculture in TSA, with turbidity equal to MacFarland scale no. 6. The media was incubated for 2 days at 30 °C and 150 rpm. Broth samples were collected and checked for bacterial growth, surface and interface tension and BS concentration measurements.

2.4. BS recovery

BS was recovered from the culture supernatant after cell removal by centrifugation at 8000g for 15 min in an Avanti™ J-20 xp centrifuge (Bekman Coulter™, USA) for 15 min at 4 °C. The supernatant was extracted three times with an equal volume of a mixture ethylacetate-methanol (8:1, vol/vol). Organic phases were combined, dried over anhydrous sodium sulphate and concentrated to dryness in a rotary vacuum evaporator (Büchi, Switzerland). The resultant crude extract was weighted.

2.5. BS characterization

2.5.1. Preliminary characterization

The total sugar content of the complete extract (5–10 mg) was evaluated by the phenol-sulphuric method [11] using glucose as the standard. Protein content was determined by Lowry (Bio-Rad D_c Protein assay) using bovine serum albumin as the calibration standard. Crude total lipids were evaluated by chloroform extraction according to Daniels et al. [12].

TLC was performed with crude extract and chloroform/methanol/5 M ammonium hydroxide (65:35:5) as the mobile phase. Controls (carbon source and extracted G-MSM without cells) were also added. The resulting spots on the TLC were visualized by spraying with Ninhydrin (Sigma) for amine groups, Molish solution for sugar observation, molybdenum blue 1.3% (Sigma) for phospholipids and iodine vapours for lipid observation.

To purify the crude extract a modification of the method described by van Echten-Deckert [13] was used. A reverse-phase chromatography with a 0.4 × 10 cm column of silica gel (Kieselgel Merck type 9385 230–400 mesh, 60 Å, Sigma-Aldrich) was performed. The crude extract dissolved in 1 mL methanol and 1 mL ammonium acetate (300 mM in H₂O) was applied to the column and the flow-through fraction was withdrawn (Fraction B). Afterwards, 6 mL water was applied to wash impurities and salts. To the phospholipid elution (Fraction A) 1 mL of methanol and 8 mL chloroform-methanol (1:1, v/v) were added. Fraction A and B were dried under a stream of nitrogen and were observed by TLC. With Fraction B, chloroform/methanol/acetic acid (65:35:5) was used as the mobile phase. As stated before, four reactants were used for colour development.

Further purification of Fraction A was achieved by preparative thin-layer chromatography (TLC). Whole fractions were spotted onto preparative silica gel TLC plates with a solvent system of chloroform/methanol/5 M ammonium hydroxide (65:35:5). Each fraction was scraped off the plate, extracted with chloroform/methanol (1:1), dried under vacuum and stored under nitrogen. Each extract was dissolved in ultrapure water and tested for surface activity by pendant drop.

2.5.2. Two dimensional TLC (TD-TLC)

To further characterize Fraction A, fractions obtained after preparative TLC purification (5–10 mg) were separated by two dimensional thin layer chromatography (DC-Fertigplatten SIL G-50UV₂₅₄, Macherey–Nagel, Germany; 20 × 20 cm) as reported previously [14]. For the first dimension chloroform/methanol/water (65:25:4, v/v) was used, followed by chloroform/methanol/acetic acid/water (80:12:15:4, v/v). Phosphatidyletanolamine, phosphatidylglycerol and diphosphatidylglycerol were used as standards. The sample and standard were detected using a combination of Ninhydrin and molybdenum blue spray (1.3%).

2.5.3. Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was used to determine the functional groups and chemical bonds present in purified Fraction A (A-1, A-2 and A-3) of the BS. The FTIR analysis was performed using a FT-IR/Bomem M-120 spectrometer equipped with a Glowbar source and DTGS detector. The samples (1–5 mg) were milled with 80 mg of KBr to form a very fine powder. This powder was then compressed into a thin pellet which could be analyzed by FT-IR. The spectral measurements were carried out in the absorbance mode. The spectra were normally acquired at 25 °C with the use of 2 cm⁻¹ resolution yielding IR traces over the range of 350–4000 cm⁻¹. The IR spectra of each sample were the average of 100 data scanning over the entire range of wave numbers. All data were corrected for background spectrum. The manipulation and evaluation of the spectra were carried out with GRAM 32 software. The spectra were compared with the database to confirm the chemical nature of the active BS fraction.

2.5.4. Fatty acid determination

To identify fatty acids, Fraction A (A-1, A-2 and A-3) was dried and methanolized as described by Huijberts et al. [15]. Approximately 15 mg of purified extract was dissolved in 2 mL of 15% sulphuric acid in methanol. Two millilitres of chloroform were added, and the mixture was heated for 150 min at 100 °C in a closed screw-cap tube in a thermoblock (Boeckel Scientific, Feasterville, PA). The sample was cooled on ice, and 1 mL of bidistilled water was added. After vortexing for 1 min, phases were separated with an extraction funnel. The organic phase was collected over anhydrous Na₂SO₄ and dried in a rotary evaporator (Büchi, Switzerland).

The fatty acid methyl esters (FAMES) were separated and quantified by means of gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). The GC–MS analysis for FAMES was performed on a TRACE DSQ (ThermoFinnigan) gas chromatography instrument. The column TRB-1 with dimensions of 15 m × 0.32 mm i.d × 0.25 μm film thickness (TEKNOKROMA) was used for the separation of fatty acid methyl esters. The initial temperature of 190 °C was maintained for 1 min then raised to 204 °C at the rate of 1 °C/min, and kept at 230 °C for 5 min. The split ratio was 1:40, and helium was used as a carrier gas with a flow rate of 40 mL/min. The injector and detector temperatures were 240 and 290 °C, respectively. The mass spectrometer was operated in the electron impact (EI) mode at 70 eV in the scan range of 50–550 m/z.

2.6. Physical properties

2.6.1. Surface tension measurements

Equilibrium surface tension (γ_{ST}) of the culture supernatant (crude biosurfactant) was measured at 25 °C with a K9 Krüss tensiometer (Germany), according to the De Nöuy ring method. Calibration was carried out with pure water and ethanol. The interfacial tension (γ_{IT}) was measured against kerosene. To reach the equilibrium, sample solutions were firstly aged in appropriate cells at room temperature. All measurements were conducted at least three times, and the average values were calculated. Prior to use, the platinum ring and all glassware were sequentially washed with chromic acid, deionised water and acetone, and finally flamed with a Bunsen burner.

The surface tension of small volumes of the different extracts was measured using a home-made pendant drop tensiometer [16]. In this technique, a surfactant solution drop was created at the end of a straight cut Teflon tube, which had an internal diameter of 0.8 mm and an external diameter of 1.58 mm. The image of the drop was recorded using a web cam (640 × 480 pixel) and corrected for spherical aberration. The drop profile was then extracted from the corrected drop image. The droplet contour was taken at the point of maximum slope of the light intensity. This contour was fitted to the Laplace–Young equation using a home-made Golden Section Search Algorithm. The input parameters of this Algorithm were reference framework, an angular correction for the vertical alignment, the radius of the droplet, and the interfacial tension. Care was taken to ensure a saturated humidity atmosphere to prevent evaporation. Temperature was maintained at 25.0 ± 0.1 °C. Pure water surface tension measurements were found in a range of 70 ± 2.0 mN m⁻¹. Further checking of the setup with ethanol found values of 21.2 ± 1.0 mN m⁻¹, both standards agreeing with published values.

2.6.2. Emulsification index (E_{24})

The emulsification index (E_{24}) of supernatant samples was determined by adding 2 mL of kerosene to 2 mL of culture supernatant, mixing with a vortex for 2 min, and leaving to stand for 24 h and 30 days. The emulsifying activity (E_{24} , E_{30d}) was calculated using the following equation:

$$E_{24h,30d} (\%) = H_{EL}/H_T \times 100 \quad (1)$$

where H_{EL} is the height of the emulsion layer and H_T is the height of the total solution.

2.6.3. Study of BS stability

Cell-free broth obtained after centrifuging the culture supernatant at 8000g for 15 min was used for stability studies. Five millilitres of cell-free culture supernatant were exposed to 0, 4, 25, 70, 100, and 121 °C for 30 min, cooled to room temperature, and the surface tension, interfacial tension and emulsification index were determined. To study the pH stability of BS, cell-free supernatant was adjusted to different pH values (1–12) with 0.1 M NaOH and 0.1 M HCl, and the same aforementioned measurements were done [17].

3. Results and discussion

3.1. Microorganism screening

The isolation of a new BS-producing bacterium was carried out in soil samples of the Azores islands, an isolated archipelago formed through volcanic activity. From 10 volcanic earth samples 54 isolate colonies (31 Gram-negative bacilli, 19 Gram positive bacilli, two Gram-positive cocci and two yeasts) were selected for

study. Among the isolated bacteria, strain 6.2S was eventually chosen for further research on the basis of its ability to grow in a mineral medium and its capacity to decrease surface and interfacial tension (<40 mN/m and <10 mN/m respectively). The enrichment culture for the screening of BS-producing microorganisms consisted of a mineral medium with a carbon source pool (sodium citrate, C_{11–13} and yeast extract) as a strategy to obtain a wide range of bacteria and yeasts. A difficulty with screening for BS producers is that BS production depends both on the type of carbon source present as well as the types and amounts of other nutrients in the screening medium. The screening medium composition will influence whether or not BS are produced [18]. A later study of strain 6.2S with separate carbon sources (glucose, olive oil, glycerol and C_{11–13}) indicated that *n*-alkane was the most suitable substrate for BS production since it resulted in the lowest values of surface/interface tension (data not shown). Although terrestrial or marine environments have been reported as a source of novel microorganisms, the success rate of isolation of new and effective BS producers is low. Bodour et al. [18] isolated a group of BS producers (16) after a wide screening (1305 colonies) but only described *Flavobacterium* sp. MTN11 as a new BS-producing microbe, while Ruggeri et al. [19] described only *Cupriavidus* sp. BSNC28C and *Pseudomonas* sp. SG2A as new producers able to reduce surface tension.

Efficient screening is the key to success in isolating new and interesting microbes. A complete strategy consists of three steps: sampling, isolation of strains and strain investigation. Many BS-producing microorganisms have been isolated from environment samples contaminated with hydrophobic organic compounds. To isolate new BS-producing bacteria, uncontaminated soil samples of a remote archipelago have been studied. Screening results have shown that BS-producing bacteria are distributed in undisturbed soils and that samples taken from the natural environment, particularly soil, contain a mixed population of a multitude of different strains and species. This great diversity among BS-producing bacteria has been shown by phylogenetic analysis, indicating that BS are important for survival and appear to have evolved independently since biosynthesis genes for different surfactant types are not related [18].

As BS are structurally a very diverse group of biomolecules, most general screening methods are based on the physical effects of these compounds. Of the many methods reported in the literature, for this work we chose the direct measurement of the surface activity of the culture supernatant since this is the most straightforward screening method to discriminate BS-producing microorganisms [20]. Equilibrium surface tension was measured by the ring and pendant droplet methods [6,16]. In principle both techniques determine the same phenomena, but their different approaches may produce varying results. The ring method has certain difficulties in measuring aged surfaces (if the surfactant adsorbs slowly, the form of the meniscus changes in such a way that it is very difficult to have the maximum force with a stable surface). Although measurements by the pendant droplet method are somewhat less precise, this is compensated by the possibility of keeping the same surface for extended measurement times. Less equilibrium surface tension can be expected for droplets measured after aging. This is particularly problematic for slow-diffusing surfactants (for example, high molecular weight polymers and proteins) and/or small concentrations. Compared to other methods for detecting the presence of surface-active compounds, surface tension measurement is more stringent. Yilmaz et al. [21], using the drop-collapse method, isolated surface-active compound-producing bacteria that would have been disregarded by surface tension measurements using the criteria of Ruggeri et al. [19]. Nevertheless, surface tension determination in an S-MSM cell-free supernatant resulted in an erroneous detection of BS producers, which was explained by the presence of residual *n*-alkane in the

supernatant. Cooper et al. [22] also found that a residual carbon source (kerosene) can influence the surface tension measurements. This error was eliminated when determining the interfacial tension as the addition of kerosene dissolved the residual *n*-alkane. In this work, when hydrophobic compounds were used as the carbon source, interfacial tension measurements correlated better with BS production. According to Ruggeri et al. [19], a microorganism is considered promising for BS production if it is able to reduce the surface tension to values lower than 40 mN/m or 10 mN/m for interfacial tension.

3.2. Bacterial identification

The family *Sphingobacteriaceae* of the phylum *Bacteroidetes* currently comprises eight genera including the genus *Sphingobacterium*. The genus *Sphingobacterium* was created by Yabuuchi et al. [23], who reclassified two former *Flavobacterium* species as *Sphingobacterium multivorum* and *Sphingobacterium spiritivorum* and proposed a novel species. At the time of writing, the genus comprised fourteen recognized species: *Sphingobacterium anhuaiense*, *Sphingobacterium bambusae*, *Sphingobacterium canadense*, *Sphingobacterium composti*, *Sphingobacterium daejeonense*, *Sphingobacterium faecium*, *Sphingobacterium kitahiroshimense*, *Sphingobacterium mizutaii*, *Sphingobacterium multivorum*, *Sphingobacterium shayense*, *Sphingobacterium siyangense*, *Sphingobacterium spiritivorum*, and *Sphingobacterium thalophilum*. *Sphingobacterium antarticum* is also included in this genus but according to the phylogenetic tree of Liu et al. [24], based on 16S rRNA gene sequences and constructed by the neighbour-joining method, this species has a strong relationship with the related *Pedobacter* species and a reassignment could be possible.

Traditional methods have been used for 6.2S strain identification. Biochemical characters of 6.2S and *S. multivorum* DSM

Table 1
Differential characteristics of strain 6.2S and *Sphingobacterium multivorum* DSM 11691.

Characteristic	Isolated 6.2S	<i>S. multivorum</i> DSM 11691
Methyl red	–	–
Citrate	–	–
Nitrate reduction	–	–
Nitrite reduction	–	–
Dnase	+	+
Lipase	+	+
Urease	+	+
Gelatin hydrolysis	+	–
Aesculin hydrolysis	+	+
Starch hydrolysis	+	+
MacConkey growth	+	–
<i>Growth at</i>		
5 °C	–	–
37 °C	+	+
42 °C	–	–
<i>Growth with NaCl</i>		
6.5%	–	–
3%	+	+
DNA G+C content (mol%)	40.0	39.9–40.5 ^a
<i>Assimilation of:</i>		
L-arabinose	+	+
D-mannitol	–	–
L-glutamate	–	–
<i>Acid production from:</i>		
L-rhamnose	–	–
L-arabinose	+	+
Saccharose	+	+

^a Liu et al. [24].

11691 are shown in Table 1. Strain 6.2S after 2 days incubation at 30 °C produced round colonies on TSA, slightly yellowish and with 1.5–2 mm in diameter. This strain has the *Sphingobacterium* genus characteristics, being positive for aerobic growth, catalase and oxidase, and negative for Gram staining, sporulation, indole production and motility. When biochemical characters of 6.2S are compared with recently published data [24,25] a strong similarity is found with *S. spiritivorum*. Nevertheless, the phenotypic differences observed are enough to suggest a wider study is needed to conclude if a new species has been isolated. For the moment 6.2S is considered a *Sphingobacterium* sp.

3.3. Physicochemical properties of the culture supernatant

After 24–48 h culture, the culture supernatant surface tension decreased from 55 mN/m to 42–32 mN/m and interfacial tension decreased from 25 to 9–10 mN/m. These results indicate that surfactants were produced and a different BS culture yield would be related with differences observed in surface activity measurements.

To explore the possibilities of the surfactant applications, a thermal stability analysis of the culture supernatant was carried out between 0 °C and 100 °C and at pH 5 (pH of culture supernatant), revealing that surfactant properties were maintained with the temperature increase and only a small decrease in interfacial and surface tension was observed after a thermal treatment of 121 °C (Fig. 1a). Lotfabad et al. [17] also described a thermostable BS after not observing any effect on BS performance and its emulsion capacity over a wide range of temperatures. Nevertheless, it was found that after thermal treatment at 121 °C, the emulsification capacity of 6.2S BS decreased markedly from 65% to 25%. Additionally, emulsion stability was studied at 25 °C and pH 5. In these conditions 70–65% of emulsion was measured and it was constant during 5 days. After 1 month a small decrease was observed (60–

65% emulsion). A 1% emulsion with SDS was used as a standard. In the same conditions, 76% emulsion was measured after 1 month. A criterion cited to identify bioemulsifiers is their ability to maintain at least 50% of the original emulsion volume after 24 h formation [26], therefore 6.2S-BS can be included in this family of compounds. This performance compares well with examples of BS that can be found in the literature for other bacteria. Lotfabad et al. [17] described a BS produced by *Pseudomonas aeruginosa* MR01 showing a maximum emulsifying activity (70%) with *n*-hexadecane, which remained stable for more than 5 months, while crude oil and olive oil were less effectively emulsified. Haba et al. [27] studied the emulsifying activity of a rhamnolipid (RL) mixture, obtaining an 50–80% emulsion with kerosene, which collapsed within a week, or 90% and 78% emulsion with linseed and crude oils, respectively, which remained stable after 1 week. The formation and properties of emulsions depend on their components, proportion and the physical conditions applied in their preparation. A phase diagram permits emulsion conditions to be established with many component proportions. Areas of total emulsion have been described for trehalose lipid (TL) and isopropyl myristate or paraffin. In O–Thl–W (11.3–7.5–81.8) a thick and stable emulsion was obtained after 3 months at 25 °C [6].

As can be seen in Fig. 1b, the emulsion capacity (E_{24h} , %) of the culture supernatant was not affected over a wide pH range (1–12). However, the surface activity was affected by pH modification. When the pH was acidic (1–5), surface and interfacial tension were lower (37 and 10 mN/m, respectively). At pH 7 an increase in surface tension and interface tension was observed. This change can be related to the pKa of the complete extract (5.21 ± 0.05 as obtained from the half titration point with NaOH, data not shown) with a value close to the pKa of carboxylic acids. According to this data, the ionic form of the surfactants from the culture supernatant present at pH 7 or higher had lower surface activity. Data obtained indicated the presence of a stable BS, active in a wide temperature range and more effective at acidic pH. The emulsion capacity is especially useful in soil and water bioremediation and also for the cosmetic and food industries [21].

3.4. Crude extract characterization

After 48 h culture of *Sphingobacterium* sp. 6.2S in G-MSM, a growth of 3.8 mg/mL of protein and 190 mg/L crude extract was obtained. Compositional analysis revealed that the crude extract obtained after growth consisted primarily of lipids with a relative carbohydrate content of 71.6% (w/w) and 5.6% (w/w). A minor fraction of protein (4.4%) was found in extracted samples, possibly arising from the existence of residual cell debris in broth co-extracted with BS during the extraction process.

With the crude extract, surface tension decreased markedly to 22 mN/m. The surface tension–concentration curve was measured to obtain the critical micelle concentration (cmc) of the complete extract. The results show an anomalous behaviour; instead of obtaining a progressive decrease of surface tension with increasing concentrations to reach a plateau at the high concentrations, three break points delimiting two plateaux were observed. The first two breaks were found at 0.8 and 3.8 g/L, corresponding to a surface tension of 33 mN/m, and a third at a concentration of 9.6 g/L with a surface tension of 22 mN/m (Fig. 2a). These results suggest the presence of more than one species with surface-active properties. In fact, a microorganism may simultaneously synthesize a mixture of BS by distinct molecular configurations [28]. BS can be distinguished as to whether they are effective or efficient surface-active agents. Effectiveness is measured by the minimum value to which a BS can lower the surface tension, and depends upon the cohesiveness of the hydrophobic groups in the surfactant [29]. We should emphasize the low surface tension achieved with the crude extract

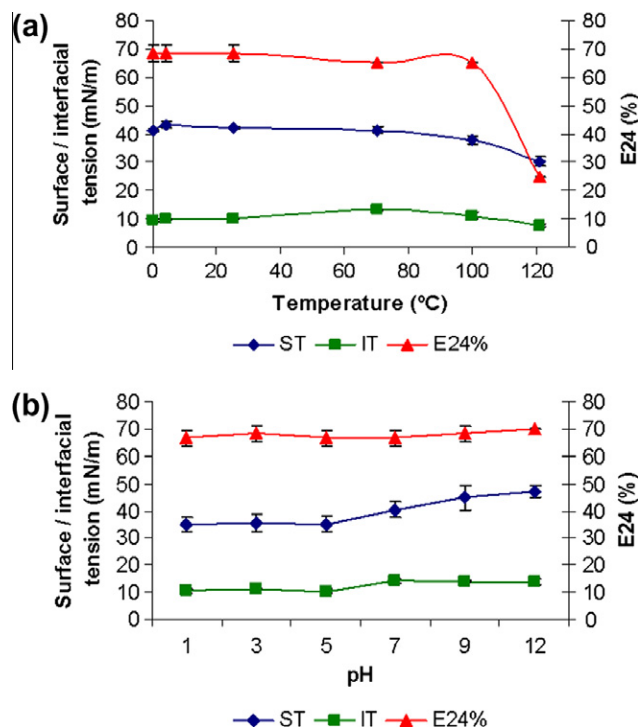


Fig. 1. (a) Effect of temperature treatment on the stability of BS produced by *Sphingobacterium* sp., 6.2S grown on G-MSM. (b) Effect of pH on the stability of BS. Measurements were conducted on crude supernatant with unknown concentrations of BS at 25 °C.

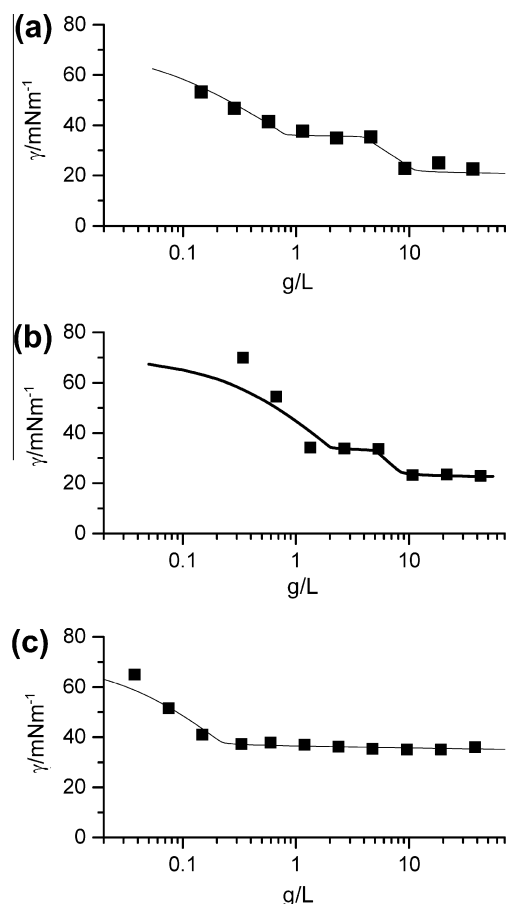


Fig. 2. Surface tension-concentration plots of (a) crude extract, (b) Fraction B, (c) Fraction A at 25 °C. The curves correspond to the best fit of the surfactant-polymer surface adsorption model; see text for the parameter values. The points enclose the error bars of the measurements.

(and also with some of the components of Fraction A), since 22–23 mN/m is not very usual in BS and, to the best of our knowledge, constitutes one of the lowest surface tensions so far exhibited by a BS. The obtained BS mixture presented a synergism, indicating high activity. With RL, the best studied BS, values of surface tension between 25–30 mN/m are frequently described [27]. Low values of surface tension are also described with *Rhodococcus erythropolis* BS (27.9 mN/m) [6]. Despite achieving a low surface tension, the 6.2S crude extract displayed the drawback of a high cmc (3.8 g/L), which reflects low efficiency. Efficiency is measured by the surfactant concentration required to produce a significant reduction in surface tension and is related to the length of the hydrophobic part of the BS [29]. At the moment, as for many environmental isolates, BS production of 6.2S remains low (0.19 g/L), indicating the necessity for optimization. To put our results in perspective, we can cite *P. aeruginosa* as a good BS producer, whose strain 47T2 can yield an 8.1 g/L extract with a cmc of 0.108 g/L. *R. erythropolis* 51T7 produces less extract (0.40–1.12 g/L) but the BS has a low cmc (0.037 g/L) [6]. Different approaches have been taken by researchers to improve BS production via optimization of culture conditions and genetic engineering. If production costs become competitive and the commercial availability of BS increases, their industrial use can be expected to grow in the coming decade [26].

To study the number and type of products present in the crude extract, a TLC was done and four different reagents were used to develop it. According to the TLC result, four main products were observed: an apolar glycolipid (rf: 0.77), three phospholipids (rf:

0.70, 0.64, 0.56), one lipopeptide (rf: 0.47) and one glycolipid (rf: 0.35) (Fig. 3). Kretschmer et al. [30] described thirteen major lipids from the organic crude extract of *R. erythropolis* DSM 43215. The analysis of the purified components revealed non-polar and polar lipids, among which non-ionic triglycerides and α,α -trehalose corynomycolates were the most abundant. Crude BS obtained from *Streptococcus thermophilus* A was characterized as a multicomponent BS, consisting of protein and polysaccharides which possibly contained bound phosphate [31].

The crude extract produced by *Shingobacterium* sp. 6.2S was purified in a multistage purification procedure [13], and two fractions, Fraction A and Fraction B, were obtained (Fig. 3). Fraction B represents 61.3% (w/w) of the total extract. This extract reduced the surface tension to 23 mN/m at a concentration of 15 g/L but when surface tension-concentration curves were determined three break points were also observed (Fig. 2b), two at 1.2 and 5.2 g/L, corresponding to a plateau with surface tension of 34 mN/m, and one at 9.7 g/L, which corresponds to a surface tension of 23 mN/m. These results are very close to those obtained with the crude extract. When this fraction was further submitted to TLC with chloroform/methanol/acetic acid (65:35:5), a mixture of species was observed (Fig. 3). It is surprising that the surface tension achieved by approximately 10 g/L solutions of both components only reduced surface tension to around 30 mN/m. Unfortunately, the small amount of separated species did not allow further examination of the samples and the elucidation of the structure and properties of this fraction is still in progress.

Possible phospholipids, developed with ninhydrin and molybdenum blue, were separated as Fraction A, which represented around 28.7% (w/w) of the total extract. Fraction A decreased surface tension to 33.0 mN/m and had a cmc of 0.18 g/L (Fig. 2c). In this case, the surface tension concentration did not present the two plateaux found for the polar fraction and crude extract. The appearance of the curve corresponds to normal surfactant behaviour. The single point surface tension obtained for an approximately 10 g/L concentration of the three components of Fraction B showed a lower surface tension than the mixture. The small amount of product available prevented further study of the characteristics of these compounds. The performance of this fraction can be compared to the lipophilic compounds with surfactant properties of *R. erythropolis*, whose phospholipids act as powerful surfactants by lowering the surface and interfacial tension to 29 and 1 mN/m, respectively, and with a cmc of 0.030 g/L [30].

TLC showed that the crude extract was a mixture of compounds that could be classified as glycolipids, lipopeptides and phospholipids. This mixture effectively reduced surface tension, displaying anomalous behaviour when measured as a function of concentration to obtain the cmc (Fig. 2a and b). The intermediate plateau cannot be attributed to the presence of lower hydrophilicity impurities like those frequently observed in SDS (sodium dodecyl sulphate) [32]. In this case, at low concentration, the impurities (mainly dodecanol in the case of SDS) adsorb first to the surface; at these concentrations the proportion of dodecanol at the surface is higher than in bulk. Further addition of surfactant allows for the formation of SDS micelles, which progressively solubilize the dodecanol. This results in a minimum in the surface tension-concentration curves, which is indicative of a mixture with a higher surface active compound as a significant impurity. The presence of a lower surface-active molecule does not, as might appear at first glance, imply a reverse effect (the appearance of a maximum or plateau as observed here). In this case, the competition for the surface will always favour the more active compound, which will also have the higher concentration, both at the surface and in bulk. The kind of behaviour encountered here could be indicative, however, of the presence of an impurity, which could act similarly to a polymer mixed with a surfactant [33,34]. In our case, this impurity

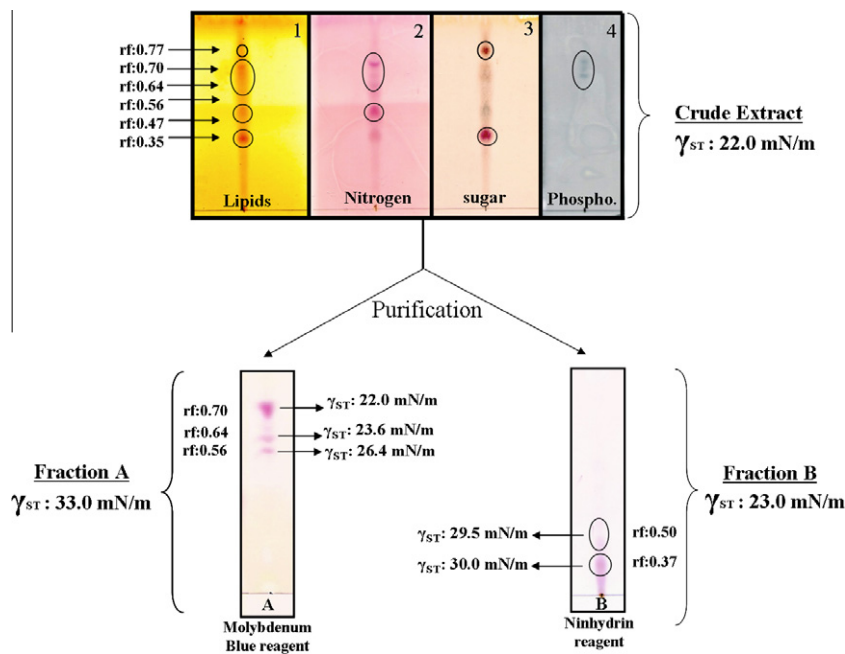


Fig. 3. Analysis of the extract produced by *Sphingobacterium* sp., 6.2S. (a) Crude extract developed by iodine vapours (lipids), Ninhydrin (Nitrogen), Molish (Sugar) and molybdenum blue (Phospholipids). (b) TLC of Fraction A obtained after purification and developed with Ninhydrin. (c) TLC of Fraction B obtained after purification and developed with Molish and Ninhydrin.

could be a hydrophilic protein that will act physically like a polymer due to its macromolecular features. Hence, the surfactant can adsorb at the surface or form adsorbed micelles attached to the polymer. A plateau can be observed in the surface tension–concentration curve if the critical aggregation concentration of the surfactant on the macromolecular is smaller than the cmc in the bulk. In the original article [33,34], the process evaluated was that of surfactant addition to a polymer solution. By restricting the original equations to a constant macromolecule-to-surfactant ratio, we can calculate the process that would correspond to the presence of an impurity of this kind in a surface tension–concentration experiment. In Fig. 2a and b the curve has been calculated using the parameters $CAC = 2.05$ g/L (critical aggregation concentration of the surfactant on the polymer), $cmc = 4.9$ g/L (critical micellar concentration of the surfactant in the bulk solution), $\Gamma_{\infty} = 7.58 \times 10^{-6}$ mol m $^{-2}$ (surface excess of the surfactant at the surface), $k_s = 2.27$ m 3 mol $^{-1}$ (association constant of the surfactant to the polymer), $N = 50$ (aggregation number in bulk solution), $n \times M = 100$ (number of micelles per polymer chain times aggregation number per micelle on the polymer) and fixing a molar ratio of impurity to surfactant molecules of 1/180 (we have to stress that this figure is relative to the numbers used for the number of micelles per polymer and their aggregation number).

Seeing the effect of these parameters on the curves will help evaluate the significance of these values since this evaluation was not carried out by Bell et al. [33,34] in the case of a constant surfactant-to-polymer ratio. The parameters N and $n \times M$ do not have significant effects unless they become rather small (below 10 and 20, respectively). The main effects are due to the CAC and cmc, the former corresponding to the starting point of the intermediate plateau and the second to its end. With all the other parameters fixed, the former has an effect on the surface tension level of the plateau and the second on the final surface tension (Fig. 4a and b). Both levels are modulated by the surface excess concentration of the surfactant, as can be observed in Fig. 4c, which expresses the affinity of the surfactant for the surface, and its reciprocal is proportional to the area per molecule at the surface. The surface

excess of the surfactant has an influence on the surface tension level at the plateau as well as on the slope close to the cmc (Fig. 4c), as might be reasonably expected taking into account the expression of the Gibbs adsorption isotherm [35]. Also in Fig. 4c it can be appreciated how the surface excess can be compensated by a change of the binding constant. This makes it difficult to determine both parameters from this experiment. The effect of the binding constant can be observed in Fig. 4d and is analogous to that of the surface excess. In Fig. 4e the effect of polymer concentration can be observed as the progressive enlargement of the plateau region. From those observations it can be seen that the effect of this impurity can be significant. The presence of small amounts of protein (4.4%) was determined *a posteriori* in agreement with this interpretation. As the plateau region is present in the whole extract and also in the polar part corresponding to the major components, we have to conclude that the impurity (protein) is rather hydrophilic. The absence of an intermediate plateau in the apolar part of the extract would imply the absence of this impurity. In this case the form of the surface tension–concentration curve appears as a normal curve, that is, in Fig. 2c the model curve corresponds to the absence of macromolecules. Thus, the relevant parameters are: $cmc = 0.18$ g/L, $K_s = 23$ g/L and $\Gamma_{\infty} = 8.1 \times 10^{-6}$ mol m $^{-2}$, which corresponds to an area per molecule at the surface of 0.21 nm 2 for uncharged surfactant or 0.42 nm 2 for singly charged species. The smaller value allows only for the section of a hydrocarbon chain, which may indicate that the species are singly charged.

3.5. Preliminary characterization of Fraction A

By preparative thin-layer chromatography of Fraction A, three BS congeners were purified: spot A-1 (rf: 0.70) which makes a milky dispersion in water and reduces surface tension to 22.0 mN/m; spot A-2 (rf: 0.64) which reduces surface tension to 23.6 mN/m and spot A-3 (rf: 0.56) which reduces surface tension to 26.4 mN/m (Fig. 3). Fraction A showed a powerful surfactant activity, reducing surface tension to 33 mN/m but some antagonism in the effectiveness of surface tension reduction was observed since the purified

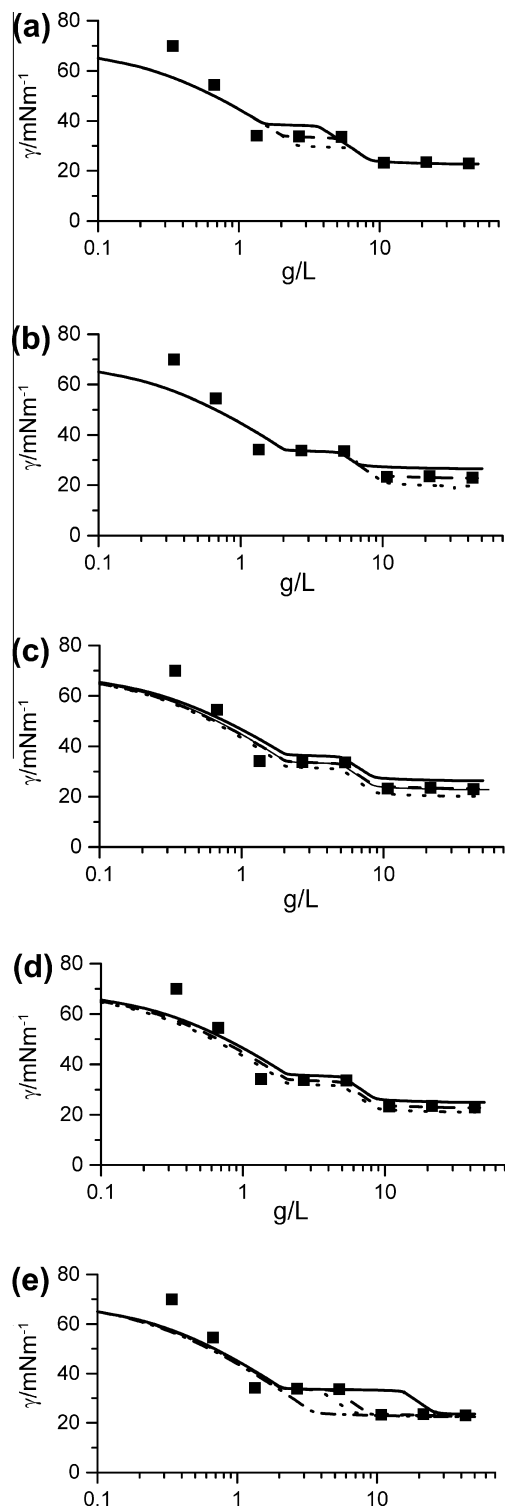


Fig. 4. Surface tension-concentration plots of Fraction B compared with model calculations showing the effect of different parameters. The full lines correspond to the parameters described in the text. (a) CAC: dash 2.05 g/L, dot 2.55 g/L. (b) CMC: 3.9 g/L, dash 4.9 g/L, dot 5.9 g/L. (c) Surface concentration: dash 7.6 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$, dot 8.0 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$. The thin line shows the partial compensation of the reduction of surface concentration (7.25 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$) with an increased binding constant (2.5 m^3/mol). (d) Binding constant: dash 2.25 m^3/mol , dot 2.5 m^3/mol . (e) Polymer to surfactant molar ratio: dash 1/180, dot 1/220 and dot-dash absence of polymer.

compounds resulted in lower surface tension than their mixture (22–26 mN/m). BS activity was related to its apolar character, as can be seen in the behaviour of different purified fractions (Fig. 3).

3.5.1. TD-TLC

When spot A-1 (rf: 0.7) was studied by TD-TLC, two compounds were resolved. Both compounds reacted with Ninhydrin and molybdenum blue in the same way as the phospholipids, and spot A-1.1 had the same rf as the PE standard used for comparison (Fig. 5). Spot A-1.2 was an unidentified phospholipid with an amine group in its structure. When spot A-2 and A-3 were studied, three species were observed in each sample, having the same rf but different concentrations, although only spots A-2.1 and A-3.1 were additionally observed with Ninhydrin (Fig. 5).

Judging by mobility values and staining behaviour, as well as by comparison with standards, it was possible to show that spot A-1.1 was a compound with a strong relationship with phosphatidyletanolamine (PE). Cooper et al. [22] described *Corynebacterium lepus* as a producer of a lipopeptide containing corynomycolic acids plus small amounts of phospholipids and neutral lipids. Six phospholipids (phosphatidyl glycerol, phosphatidyl inositol, phosphatidyl inositol mannoside and, at a lower concentration, phosphatidylglycerol phosphate, cardiolipin and phosphatidylserine) were identified by TLC. Some of the lipids isolated have taxonomic significance. The phospholipid composition, in particular the complete absence of PE, is characteristic of the low G + C content group of *Corynebacterium*, while PE is the dominant membrane phospholipid in *Escherichia coli* and Gram-negative bacteria in general. In order to confirm this hypothesis an IR of purified spots (A-1, A-2 and A-3) was done.

3.5.2. Fourier transform infrared spectroscopy

The molecular composition of purified Fractions A-1, A-2 and A-3 (2 and 3 data not shown) was evaluated by Fourier transform infrared spectroscopy. As all spectra showed essentially the same absorption bands, we can centre our attention on the most abundant fraction A-1, whose spectra are depicted in Fig. 6.

The infrared spectrum of the A-1 fraction disclosed a broad stretching peak at 3300 cm^{-1} characteristic of hydroxyl and amine groups. Absorption around 2924 cm^{-1} is assigned to the symmetric ($\nu\text{ C-H}$) of $-\text{CH}_2$ and CH_3 groups of aliphatic chains. The corresponding symmetric stretch is seen at 2854 cm^{-1} . Also an intense absorption band at 1735 cm^{-1} and a weak symmetric stretching peak around 1463 cm^{-1} indicate the presence of ester carbonyl groups (C=O in COOH) in the BS. Absorption around 1647 cm^{-1} suggests the presence of an amine group (N-H in $-\text{NH}_3^+$). When the experimental spectra were compared with standard spectra, strong correlation with the phospholipid structure was observed. As a result, from the TD-TLC and FTIR analysis, we assume that the Fraction A is a mixture of almost five species with a phospholipid structure. LC-MS analysis recently revealed that the surfactant produced by *R. erythropolis* 51T7 is a mixture of at least six components, the most abundant being Th-Suc-C₉-C₉-C₁₀ or Th-Suc-C₁₁-C₁₀-C₇ [6]. *P. aeruginosa* 47T2 was initially reported to produce two main RL homologs, but new analytical methods have allowed the identification of up to 11 RL homologs containing one or two rhamnose molecules [27]. The development of more sensitive analytical techniques has led to the further discovery of a wide diversity of congeners and homologs produced at different concentrations by bacteria [36].

3.5.3. Fatty acid determination

Phospholipids are composed of a glycerol backbone with two fatty acids esterified on the *sn*-1 and *sn*-2 positions and a phosphate ester on the *sn*-3 position, referred to as the polar head group. Common bacterial phospholipids are phosphatidic acid, phosphatidylserine, PE, phosphatidylglycerol and phosphatidylinositol. To assure a more accurate determination of phospholipids, fatty acid methyl esters were analyzed by GC/MS. Three major fatty acids were identified, the most abundant in spot A-1 and A-2 being

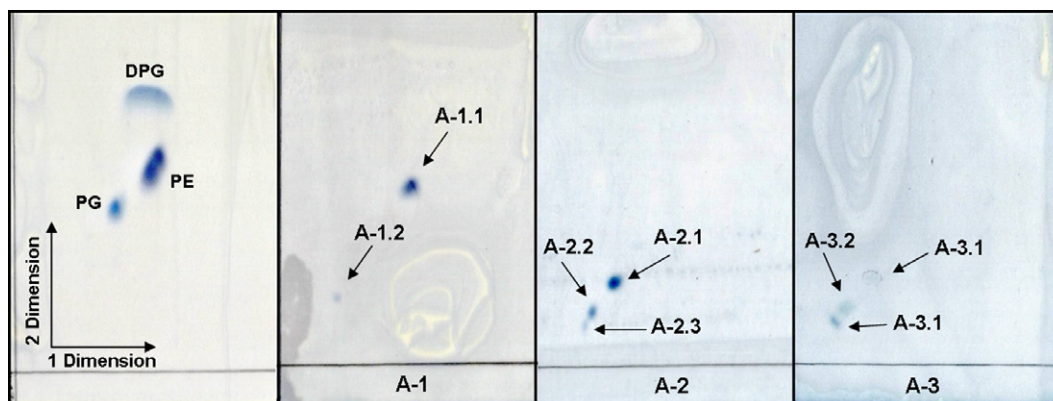


Fig. 5. BD-TLS: (a) Phosphatidyletanolamine (PE), phosphatidylglycerol (PG) and diphosphatidylglycerol (DPG) used as standards. (b) Fraction A 1 (A-1). (c) Fraction A 2 (A-2). (d) Fraction A 3 (A-3) developed with molybdenum blue.

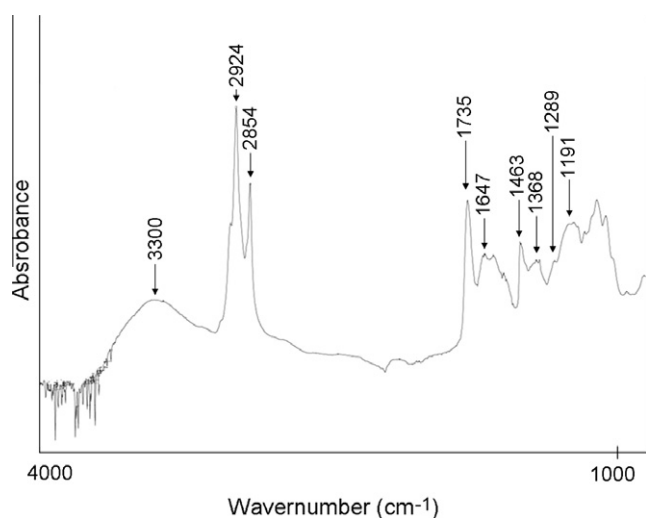


Fig. 6. IR spectrum profile of Fraction A-1 fraction produced by *Sphingobacterium* sp. 6.2S.

palmitoleic acid ($C_{16:1}$) (54.5% and 76.0%, respectively). In spot A-3 only 6.7% of $C_{16:1}$ was observed, pentadecanoic acid ($C_{15:0}$) being the most abundant (59.1%). Palmitic acid ($C_{16:0}$) was observed in all extracts with an intermediate proportion (A-1, 25.8%; A-2, 13.4%, A-3, 31.1%). Biosurfactant properties of phospholipids have been described in the literature by Beebe and Umbreit [37], who reported the enhanced sulphur wetting capacity of the extracellular lipid of *Thiobacillus thiooxidans*, and especially PE. Cooper et al. [22] demonstrated that surface activity at the end of the fermentation was partly due to a small amount of several phospholipids produced by *Corynebacterium lepus*. Kretschmer et al. [30] described that *R. erythropolis* produced thirteen major lipids from the organic crude extract and PE, as an ionic compound, acted as the most powerful surfactant by lowering the interfacial tension in a water–hexane system below 1 mN/m.

The crude extract obtained from *Sphingobacterium* sp. has thus been characterized as a multicomponent BS, consisting of a minor quantity of protein, phospholipids such as PE and still uncharacterized lipopeptide congeners and glycolipids. There are no previous reports on the isolation and BS production from species of the genus *Sphingobacterium*. Naturally produced ramnolipid biosurfactants are very often described as mixtures of different congeners in *P. aeruginosa* [27], *Pseudomonas chlororaphis* [38] and *Burkholderia* [36]. These congener mixtures display physicochemical properties

that together are probably very different from the individual congeners but at a chemical level their purification can prove difficult and is probably unnecessary for most applications.

4. Conclusions

Sphingobacterium sp. (6.2S) effectively reduced the surface tension of the culture supernatant, whose surfactant properties were thermostable and improved at a low pH. The crude extract strongly reduced surface tension (22 mN/m at 10 g/L), producing one of the lowest values recorded for a microorganism-produced surfactant [39–41]. The concentration/surface tension plot of the crude extract showed a triple break, attributable to the presence of hydrophilic protein traces. Chromatographic fractionation of the crude BS produced two distinct fractions. Fraction B, corresponding to a mixture of lipopeptides and glycolipids, presented similar surface properties to the complete extract, reducing surface tension to 23 mN/m and showing a triple break in cmc curves, with a cac of 2.7 g/L and a cmc of 6.3 g/L. Fraction A was identified as a phospholipid congener mixture, with PE being the most abundant, and reduced surface tension to 33 mN/m with a cmc of 0.18 g/L. However, some of its components may also reduce surface tension to as low as 22 mN/m. The complexity of mixtures and interactions found in these systems make it difficult to univocally determine their surface properties, as exemplified by the finding of synergism and antisnergism in surface tension reduction, depending on the degree of purification. If developed to higher yields, the promising BS-producing characteristics of *Sphingobacterium* sp. (6.2S) will certainly lead to interesting BS.

Acknowledgments

We thank Imma Carrera for assistance with the pendant drop surface tension measurements. The authors would like to thank the Ministerio de Ciencia y Tecnología Spain for funding this research with Grant CTQ2007-66244 and CTQ-2010-14897 and the Generalitat de Catalunya for Grant 2009SGR1331.

References

- [1] J.D. Van Hamme, A. Sing, O.P. Ward, *Biotechnol. Adv.* 24 (2006) 604.
- [2] M.J. Rosen, *Surfactants and Interfacial Phenomena*, Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, New Jersey, 2004.
- [3] L.R. Rodrigues, J.A. Teixeira, in: R. Sen (Ed.), *Land Bioscience*. Springer Science+Business Media, LLC, 2010, p. 75.
- [4] S. Lang, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 7 (2002) 12.
- [5] G.S. Kiran, T.A. Thomas, J. Selvin, B. Sabarathnam, A.P. Lipton, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 2389.
- [6] A.M. Marqués, A. Pinazo, M. Farfan, F.J. Aranda, J.A. Teruel, A. Ortiz, A. Manresa, M.J. Espuny, *Chem. Phys. Lipids* 158 (2009) 110.

- [7] G.I. Barrow, R.K.A. Faltham, Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria, third ed., Cambridge University Press, UK, 1993.
- [8] P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, R.H. Tenenbaum, Manual of Clinical Microbiology, A.S.M. Press, Washington, DC, 2003.
- [9] J. Pochon, P. Tardieux, Techniques d'Analyse en Microbiologie du Sol, La Tourelle, St Mandé, La Tourelle, France, 1962.
- [10] M. Mesbah, U. Premachandran, W.B. Whitman, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39 (1989) 159.
- [11] M. Dubois, K.A. Gilles, J.R. Hamilton, P.A. Roberts, F. Smith, *Anal. Chem.* 28 (1956) 350.
- [12] L. Daniels, R.S. Hanson, J.A. Phillips, in: P. Gerhardt, R.G.E. Murray, W.A. Wood, N.R. Krieg (Eds.), *Methods for General and Molecular Bacteriology*, A.S.M., Washington, DC, 1994, p. 512.
- [13] G. van Echten-Deckert, *Method Enzymol.* 312 (2000) 64.
- [14] B.J. Tindall, *FEMS Microbiol. Lett.* 66 (1990) 199.
- [15] G.N.M. Huijberts, G. Eggink, P. de Waard, G.W. Huisman, B. Witholt, *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (1992) 536.
- [16] A. Pinazo, M. Angelet, R. Pons, M. Lozano, M.R. Infante, L. Pérez, *Langmuir* 25 (2009) 7803.
- [17] T.B. Lotfabad, M. Shourian, R. Roostaazad, A.R. Najafabadi, M.R. Adelzadeh, K.A. Noghabi, *Colloids Surf., B* 69 (2009) 183.
- [18] A.A. Bodour, K.P. Drees, R.M. Maier, *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2003) 3280.
- [19] C. Ruggeri, A. Fransetti, G. Bestetti, P. Caredda, P. La Colla, M. Pintus, S. Sergi, E. Tamburini, *Int. Biodeter. Biodegr.* 63 (2009) 936.
- [20] V. Walter, C. Syltatk, R. Hausmann, in: R. Sen, *Biosurfactants. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 672, Springer Science+Business Media, LLC, USA, 2010, p. 1.
- [21] F. Yilmaz, A. Ergene, E. Yalçın, S. Tan, *Environ. Technol.* 30 (2009) 1397.
- [22] D.G. Cooper, J.E. Zajic, D.F. Gerson, *Appl. Environ. Microbiol.* 37 (1979) 4.
- [23] E. Yabuuchi, T. Kaneko, I. Yano, C.W. Moss, N. Miyoshu, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33 (1983) 580.
- [24] R. Liu, H. Liu, C.-X. Zhang, S.-Y. Yang, X.-H. Liu, K.-Y. Zhang, R. Lai, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58 (2008) 1458.
- [25] S. Mehnaz, B. Weselowski, G. Lazarovits, *Syst. Appl. Microbiol.* 30 (2007) 519.
- [26] O. Portilla-Rivera, A. Tirrado, J.M. Domínguez, A.B. Moldes, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 8074.
- [27] E. Haba, A. Pinazo, O. Jauregui, M.J. Espuny, M.R. Infante, A. Manresa, *Biotechnol. Bioeng.* 81 (2003) 316.
- [28] D. Biria, E. Maghsoudi, R. Roostaazad, H. Dadafarin, A. Sahebghadam Lotfi, M.A. Amoozegar, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26 (2010) 871.
- [29] J.E. Zajic, W. Seffens, *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* 1 (1984) 87.
- [30] A. Kretschmer, H. Bock, F. Wagner, *Appl. Environ. Microbiol.* 44 (1982) 864.
- [31] L.R. Rodrigues, J.A. Teixeira, H.C. van der Mei, R. Oliveira, *Colloids Surf., B* 53 (2006) 105.
- [32] P.E. Elworthy, K.J. Mysels, *J. Colloid Interface Sci.* 21 (1966) 331.
- [33] C.B. Bell, C.J.W. Breward, P.D. Howell, J. Penfold, R.K. Thomas, *Langmuir* 23 (2007) 6042.
- [34] C.G. Bell, C.J.W. Breward, P.D. Howell, J. Penfold, R.K. Thomas, *J. Colloid Interface. Sci.* 350 (2010) 486.
- [35] M.J. Rosen, Z.H. Zhu, *J. Colloid Interface Sci.* 133 (1989) 473.
- [36] A.M. Abdel-Mawgoud, F. Lépine, E. Déziel, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86 (2010) 1323.
- [37] J.L. Beebe, W.W. Umbreit, *J. Bacteriol.* 108 (1971) 612.
- [38] N.W. Gunther, A. Nuñez, L. Fortis, D.K.Y. Solaiman, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33 (2006) 914.
- [39] M. Morikawa, H. Daido, T. Takao, S. Murata, Y. Shimonishi, T. Imanaka, *J. Bacteriol.* 175 (1993) 6459.
- [40] Y. Li, N.I.A. Haddad, S. Yang, B. Mu, *Int. J. Pept. Res. Ther.* 14 (2008) 229.
- [41] S.K. Satpute, A.G. Banpurkar, P.K. Dhakephalkar, I.M. Banat, B.A. Chopade, *Crit. Rev. Biotechnol.* 30 (2010) 127.

ARTÍCULO 2

***Sphingobacterium detergens* sp. nov., una bacteria productora de tensioactivos aislada del suelo**

***Sphingobacterium detergens* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from soil.**

Ana M. Marqués^{†a}, César Burgos-Díaz^{† a}, Francisco José Aranda^b, José Antonio Teruel^b, Àngels Manresa^a, Antonio Ortiz^b and Maribel Farfán^a.

a Lab. Microbiology, Fac. Pharmacy, Univ. Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

b Dept. of Biochemistry and Molecular Biology-A, Fac. of Veterinary, Univ. Murcia, 30100 Murcia, Spain

†contributed equally to this work.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2012)

Papers in Press. doi:10.1099/ijs.0.036707-0.

2.2. *Sphingobacterium detergens* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from soil.

Revista: International Journal of Systematic evolutionary and Microbiology

Factor de impacto: 2,68 (año de publicación: 2012)

Resumen

La cepa 6.2S, aislada de una muestra de suelo no contaminado, fue seleccionada para el presente estudio por presentar actividad superficial. Su posición taxonómica fue investigada utilizando un estudio polifásico. Las células se caracterizaron por ser Gram negativas, no móviles y no formadoras de esporas. El microorganismo presentó un crecimiento óptimo entre 30-37°C, 0-3% de NaCl y a pH 7,0. Los resultados obtenidos del análisis de la secuencia del gen 16S rRNA, confirmaron que la cepa 6.2S pertenece al género *Sphingobacterium* sp. y que está estrechamente relacionada filogenéticamente con cuatro especies del género (*S. multivorum*, *S. siyangense*, *S. canadense* y *S. thalpophilum*) ya que se observó un porcentaje de similitud entre las secuencias obtenidas del 96,8 a 98,9%. Con estos valores no fue posible concluir si el aislado pertenecía o no a alguna de estas especies o bien es una nueva especie del género *Sphingobacterium*.

La secuenciación parcial del gen la chaperona 60 (*cpn60*) fue usada para resolver las relaciones filogenéticas entre la cepa 6.2S y las cuatro cepas más cercanas. Los rangos de similitud fueron del 85% (con *S. thalpophilum* DSM 11723T) al 90.3% (con *S. canadense* CR11T y *S. multivorum* JCM 21156T) indicando que la cepa 6.2S^T es una especie distinta del género *Sphingobacterium*. Los resultados del análisis de hibridación DNA-DNA de la cepa 6.2S con las cepas tipo más relacionadas mostraron claramente valores más bajos que el 70% de similaridad DNA-DNA, y consecuentemente confirmaron que esta nueva cepa no pertenecía a ninguna de las especies del género *Sphingobacterium* previamente descritas. Los ácidos grasos predominantes fueron (iso-C15:0 2 OH y/o C16:1 *w7c*) (43,71%); Iso-C15:0 (20,91%); Iso-C17:0, 3-OH (7,40%) y C16:0 (7,33%) y el contenido G+C del DNA genómico fue 40,0 mol%. De acuerdo con estas características genotípicas y fenotípicas y datos filogenéticos, la cepa 6.2S^T representa una nueva especie del género *Sphingobacterium*, por lo cual se propuso el nombre de *Sphingobacterium detergens* sp. nov. la cepa tipo es 6.2S^T (= CECT 7938^T = LMG 26465^T).

1 ***Sphingobacterium detergens*** sp. nov., a surfactant-producing bacterium
2 isolated from soil.

3

4 Ana M. Marqués*^{1a}, César Burgos-Díaz^{1a}, Francisco José Aranda², José Antonio Teruel²,
5 Àngels Manresa¹, Antonio Ortiz² and Maribel Farfán¹

6 ¹ Laboratory of Microbiology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

7 ² Department of Biochemistry and Molecular Biology-A. Faculty of Veterinary. University of Murcia.
8 30100 Murcia. Spain

9

10

11 *Corresponding author:

12 Ana M. Marqués

13 E-mail: ammarques@ub.edu

14 Tel: +34 93 402 44 97

15 Fax: +34 93 402 44 98

16

17

18

19

20 Running title:

21 *Sphingobacterium detergens* sp. nov.

22

23 Subject category:

24 New Taxa (Phylum *Bacteroidetes*)

25

26

27 ^a Contributed equally to this work

28

29

30

31 The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the 16S rRNA and *cpn60* gene sequences of
32 strain 6.2S^T are JN015213 and JN015214, respectively.

33

34

35

36

37 **Abstract**

38 A novel Gram-negative strain, designated as 6.2S^T, was isolated from a soil sample and identified
39 as a biosurfactant producer. Its taxonomic position was investigated using a polyphasic approach.
40 The cells were non-motile, non-spore-forming rods. The organism grew optimally at 30-37°C, with 0-
41 3% NaCl, and at pH 7.0. Based on 16S rRNA gene sequence analysis, strain 6.2S^T was found to be
42 a member of the genus *Sphingobacterium* and is most closely related to four type species of the
43 genus, showing sequence similarities of 96.8–98.9%. Partial chaperonin 60 (*cpn60*) gene sequence
44 analysis was useful in resolving phylogenetic relationships between strain 6.2S^T and closely related
45 taxa, with similarities ranging from 85.5% (with *S. thalpoophilum* DSM 11723^T) to 90.3% (with *S.*
46 *canadense* CR11^T and *S. multivorum* JCM 21156^T). Furthermore, the results of DNA-DNA
47 hybridization experiments were clearly lower than 70% DNA-DNA similarity, and consequently
48 confirmed that this new strain does not belong to a previously described species of the genus
49 *Sphingobacterium*. The major fatty acids were summed feature 3 (iso- C_{15:0} 2 OH and/or C_{16:1} w7c)
50 (43.71%); iso-C_{15:0} (20.91%); iso-C_{17:0} 3-OH (7.40%) and C_{16:0} (7.33%). The G+C content of the
51 genomic DNA was 40.0 mol%. According to its phenotypic and genotypic characteristics and
52 phylogenetic data, strain 6.2S^T represents a novel species of the genus *Sphingobacterium*, for
53 which the name *Sphingobacterium detergens* sp. nov. is proposed. The type strain is 6.2S^T (=
54 CECT 7938^T = LMG 26465^T).

55

56

57

58 During screening for new biosurfactants (BS), several soil samples from the Azores Islands were
59 analyzed. Strain 6.2S was selected for its ability to reduce the surface tension of the medium to 32
60 mN/m, due to the production of a mixture of compounds with surface activity (Burgos-Díaz *et al.*,
61 2011). This strain was initially identified as *Shingobacterium multivorum*, based on cell and colony
62 morphology, as well as the results of the API 20 NE bacterial identification kit. The results of 16S
63 rRNA gene sequence analysis showed that strain 6.2S belonged to the genus *Sphingobacterium*,
64 and that its nearest relative was *Sphingobacterium siyangense*. The aim of the present study was to
65 clarify the taxonomic position of this new strain by using a polyphasic approach, including
66 phenotypic, chemotaxonomic, genotypic and phylogenetic analyses.

67

68 The family *Sphingobacteriaceae* belongs to the phylum *Bacteroidetes* and is composed of eight
69 genera (*Sphingobacterium*, *Pedobacter*, *Mucilaginibacter*, *Nubsella*, *Olivibacter*, *Parapedobacter*,
70 *Pseudosphingobacterium* and *Solitalea*) of bacteria commonly isolated from the environment
71 (<http://www.bacterio.cict.fr>). The genus *Sphingobacterium* was established by Yabuuchi *et al.* (1983),
72 based on the presence of high concentrations of sphingophospholipids in cellular lipid components.
73 Two *Flavobacterium* species were reclassified as species of this new genus (*Sphingobacterium*

74 *multivorum* and *Sphingobacterium spiritivorum*) and a new species (*Sphingobacterium mizutae*) was
75 recognized. Members of the genus *Sphingobacterium* are Gram-negative rods, positive for catalase
76 and oxidase, negative for heparinase, gelatinase and indole production and have iso-C_{15:0}, iso-C_{15:0}
77 2-OH, C_{16:1} ω7c and C_{17:0} 3-OH as the main fatty acids (Kim *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008). These
78 organisms are frequently isolated from soil, compost or activated sludge and occasionally from
79 clinical specimens (Yabuuchi *et al.*, 1983; Freney *et al.*, 1987). At present the genus
80 *Sphingobacterium* comprises seventeen recognized species: *S. alimentarium* (Schmidt *et al.*, 2011),
81 *S. anhuiense* (Wei *et al.*, 2008), *S. antarcticum* (Shivaji *et al.*, 1992), *S. bambusae* (Duan *et al.*,
82 2009), *S. canadense* (Mehnaz *et al.*, 2007), *S. composti* (Ten *et al.*, 2006), *S. daejeonense* (Kim *et*
83 *al.*, 2006), *S. faecium* (Takeuchi & Yokota, 1992), *S. kitahiroshimense* (Matsuyama *et al.*, 2008), *S.*
84 *lactis* (Schmidt *et al.*, 2011), *S. mizutaii* (Yabuuchi *et al.*, 1983), *S. multivorum* (Yabuuchi *et*
85 *al.*, 1983), *S. shayense* (He *et al.*, 2010), *S. siyangense* (Liu *et al.*, 2008), *S. thalpophilum* (Takeuchi
86 & Yokota, 1992), *S. wenxiniae* (Zhang *et al.*, 2011) and the type species *S. spiritivorum* (Yabuuchi
87 *et al.*, 1983). Eleven of these species have been described in the last seven years. Two other
88 previously described *Sphingobacterium* species have been reclassified in the genus *Pedobacter* as
89 *Pedobacter heparinus* and *Pedobacter piscium* (Steyn *et al.*, 1998).

90

91 Strain 6.2S^T, a Gram-negative, aerobic, non-spore-forming bacillus, was isolated from a soil sample
92 after cultivation in a mineral salt medium with a carbon source pool (0.5% sodium citrate, 0.5% C₁₁-
93 ₁₃ and 0.5% yeast extract) during 7 days at 30°C and 150 rpm. After two subcultures, a dilution (10⁻
94 ⁵) was spread onto TSA. Isolated colonies were studied for surfactant production (Burgos-Díaz *et al.*,
95 2011) and routinely cultured on TSA plates. Stock cultures were maintained in Cryo-Beads at -80°C.

96

97 Genomic DNA was extracted using the REALPURE[®] genomic DNA extraction kit (Durviz, Spain).
98 PCR amplification and sequencing of 16S rRNA and chaperonin 60 (*cpn60*) genes were performed
99 using universal primers and previously described conditions (Martínez-Murcia *et al.*, 1999; Mehnaz
100 *et al.*, 2007). For *cpn60* amplification, a second pair of primers was designed using the Primer3
101 program (Rozen & Skaletsky, 2000) to improve PCR specificity for strain 6.2S^T. The forward and
102 reverse primers designed were cpn60-F (5'-GCAATCGTTGCTCCAGGTAT-3') and cpn60-R (5'-
103 GTTGCNANTGCCTCACCATC-3') to amplify a ~ 500 bp region of the *cpn60* gene. The nucleotide
104 sequences obtained were compared with available gene sequences retrieved from
105 GenBank/EMBL/DDBJ databases using the BLAST program (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).
106 Multiple sequence alignments were performed using the Clustal X program version 2.0 (Larkin *et al.*,
107 2007). Phylogenetic trees were constructed from a distance matrix corrected with Kimura's two-
108 parameter model (Kimura, 1980) using the neighbor-joining method (Saito & Nei, 1987) and MEGA4
109 software (Tamura *et al.*, 2007). The robustness of the tree topology was evaluated by bootstrap
110 analysis based on 1000 replications.

111
112 An almost complete 16S rRNA gene sequence (1483 bp) of strain 6.2S^T was obtained (GenBank
113 accession number JN015213). Phylogenetic analysis based on the 16S rRNA gene sequence
114 revealed that the strain 6.2S is a member of the genus *Sphingobacterium*, which forms a robust
115 cluster with four type strains of this genus (Fig. 1). Strain 6.2S^T is most closely related to *S.*
116 *siyangense* SY1^T (98.9% similarity), *S. canadense* CR11^T (98.8%), *S. multivorum* JCM 21156^T
117 (98.6%) and *S. thalpophilum* DSM 11723^T (96.8%). Partial chaperonin 60 (*cpn60*) gene sequence
118 analysis was useful in resolving phylogenetic relationships between strain 6.2S^T and the most
119 closely related taxa of the genus *Sphingobacterium* (Fig. 2). The *cpn60* sequences for isolate 6.2S^T
120 (503 bp) and *S. siyangense* SY1^T (558 bp) were determined and have been deposited in the
121 GenBank database under accession numbers JN015214 and JN015215, respectively. Sequence
122 similarities of the novel strain ranged from 85.5% with *S. thalpophilum*^T to 90.3% with *S.*
123 *canadense*^T and *S. multivorum*^T. When determining the evolutionary relationships of strain 6.2S^T by
124 sequence analysis, the interrelationships inferred from the *cpn60* gene-based phylogeny had better
125 resolution than those based on 16S rRNA gene sequences. These results also confirmed that strain
126 6.2S^T is a distinct species of the genus *Sphingobacterium*.

127
128 For DNA-DNA hybridization experiments and determination of DNA G+C content, genomic DNA
129 was prepared according to a modification of the procedure of Wilson (1987). DNA-DNA
130 hybridizations were performed in the presence of 50% formamide at 37°C according to a
131 modification of the method by Ezaki *et al.* (1989). The DNA base composition was determined using
132 HPLC (Mesbah *et al.*, 1989). The measurement of G+C content of chromosomal DNA is the means
133 of three independent analyses. These analyses were performed by the BCCMTM/LMG Identification
134 Service (Gent, Belgium). Results obtained are summarized in Table 1. The DNA-DNA hybridization
135 values of the strain 6.2S with closely related type strains of *Sphingobacterium* were clearly lower
136 than 70% (19-39% DNA-DNA relatedness), the generally accepted limit for species delineation
137 (Wayne *et al.*, 1987). These results confirmed that this new strain does not belong to a previously
138 described species of the genus *Sphingobacterium*. The DNA G+C content of strain 6.2S^T was 40
139 mol%. This value is within the range of G+C content of known species of *Sphingobacterium* (from
140 39 to 42 mol%) reported in the second edition of *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Krieg
141 *et al.*, 2010).

142
143 Morphological features were examined after incubation for 24h at 30°C on TSA by negative staining
144 using transmission electron microscopy JEOL (model J1010). Gram staining and endospore-forming
145 features were investigated using a light microscope (model CH-2, Olympus) according to the
146 method described by Chapin & Lauderdale (2003). Growth at different temperatures (4-42°C) was
147 investigated using TSA (Pronadisa, Spain) as the basal medium, NaCl tolerance was tested using

148 Nutrient agar (Panreac, Spain) supplemented with 0-6.5% NaCl concentrations, after 5 days of
149 incubation. Growth was assessed at pH 3-11. Growth on MacConkey agar (Oxoid, England) and
150 cetrimide agar (Oxoid, England) was evaluated at 30°C during 24h incubation. Unless otherwise
151 indicated, the phenotypic characteristics were studied using standard procedures (MacFaddin,
152 1980; Barrow & Faltham, 1993; Chapin & Lauderdale, 2003) and all experiments were conducted in
153 triplicate. The following analytical procedures were performed as described. Gelatinase was studied
154 as reported by Pochon & Tardieux (1962). Citrate utilization was determined on Simmons citrate
155 agar (Oxoid, England). Oxidase activity was tested by determining the oxidation of (1%) N,N,N',N'-
156 tetramethyl-3-p-phenylene-diamine solution (Merck) and catalase activity was evaluated by
157 determining the production of oxygen bubbles in a 5% (v/v) aqueous hydrogen peroxide solution.
158 Single carbon-source utilization was determined as described by Kim *et al.* (2006). To this medium
159 a trace element solution (Marqués *et al.*, 2009) and a selenite/tungstate solution (Tschech &
160 Pfenning, 1984) were added and the pH was adjusted to 6.8. This medium was aliquotted in small
161 tubes and filter-sterilized carbon sources were added to each tube (0.1% w/v). Tubes were
162 incubated at 30°C for 7 days and growth was examined visually. Positive and negative controls
163 were added. Other physiological characteristics were determined with an API 20 NE gallery
164 according to the instructions of the manufacturer (bioMérieux, France). Antibiotic sensitivity tests were
165 performed using the diffusion method described by Jorgensen & Turnidge (2003) with discs
166 (bioMérieux, France) containing the following antibiotics (µg): ampicillin-clavulanic acid (30),
167 ampicillin (10), aztreonam (30), amikacin (30), cephalotin (30), cefoxitin (30), ceftriaxone (30),
168 ciprofloxacin (5), colistin (50), chloramphenicol (30), erythromycin (15), streptomycin (10), fosfomycin
169 (50), gentamycin (10), imipenem (10), tetracycline (30), ticarcillin (75), tobramycin (10), and
170 trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25-23.75). After 20h incubation, diameters of inhibition zones
171 were measured.

172

173 Strain 6.2S^T formed round, wet, beige colonies of 3-5 mm diameter when grown for 48-72 h on TSA
174 at 30°C. Cells of 6.2S^T were non-motile rods of 2.5-1.8 µm length and 1.0-0.8 µm width
175 (Supplementary Fig. S1). The physiological and biochemical properties that differentiate strain 6.2S^T
176 from related species of the genus *Sphingobacterium* are shown in Table 2.

177

178 For fatty acid analysis, strain 6.2S^T was grown in TSA at 30°C for 24h. The cellular fatty acid profile
179 of isolate 6.2S^T was determined by using a Microbial ID system equipped with a GC (Hewlett
180 Packard 5890 Series II) and Sherlock version 4.0 of the aerobic library (Microbial ID, 1993). The
181 cellular fatty acids mainly comprised summed feature 3 (iso- C_{15:0} 2 OH and/or C_{16:1} w7c) (43.71%);
182 iso-C_{15:0} (20.91%); iso-C_{17:0} 3 OH (7.40%) and C_{16:0} (7.33%). The cellular fatty acids of strain 6.2S^T
183 are listed in Table 3 and are compared with four type strains that form a closely related cluster in the
184 genus *Sphingobacterium*. The fatty acid profile of strain 6.2S resembled those of closely related

185 strains of *Sphingobacterium* species. Sphingolipid assay was resolved by two-dimensional TLC as
186 previously described (Mehnaz *et al.*, 2007). The major lipid was phosphatidylethanolamine and
187 several unknown lipids were also detected. Sphingolipid, which is a distinct feature of the members
188 of the genus *Sphingobacterium*, was also present (Supplementary Fig. S2).

189

190 On the basis of phenotypic and chemotaxonomic properties and phylogenetic data, it is proposed
191 that strain 6.2S^T should be classified in the genus *Sphingobacterium* as a novel species, for which
192 the name *Sphingobacterium detergens* sp. nov. is proposed.

193

194 **Description of *Sphingobacterium detergens* sp. nov.**

195 *Sphingobacterium detergens* (de.ter'gens, L.V. *detergere* to wipe off, L. part. adj. *detergens* wiping
196 off, modern meaning surfactant, named thus for being a good surfactant producer).

197

198 Cells are Gram-negative, non-motile, non-spore-forming, strictly aerobic rods, 2.5–1.8 µm long and
199 1.0–0.8 µm wide. After 48h incubation in TSA, colonies are 3–5 mm in diameter, beige, convex,
200 circular and smooth with entire margins. Temperature range for growth is 15–37 °C (optimum, 30–
201 37°C), no growth occurs at temperatures of 42 °C. The pH range for growth is 6.0–7.5 (optimum, pH
202 7) and the NaCl concentration range for growth is 0–3%. Growth occurs on nutrient agar, TSA,
203 Cetrimide agar, MacConkey agar and Simmons' citrate agar. Results are positive for catalase,
204 oxidase, lipase and β-galactosidase. Gelatin, DNA, starch, aesculin and urea are hydrolyzed, but
205 tween 80 is not. Acid is produced from D-glucose and sucrose but not from L-rhamnose, L-arabinose,
206 D-mannitol, D-melibiose, sorbitol, inositol, amygdalina and lactose. Utilizes D-glucose, L-rhamnose, L-
207 arabinose, D-melibiose, glycerol, D-mannose, N-acetyl-glucosamine, D-maltose but not D-mannitol,
208 L-glutamate, L-sorbitol, D-ribose, pyruvate, capric acid, adipic acid, malic acid, phenylacetic acid and
209 gluconate. Resistant to ampicillin, aztreonam, amikacin, cephalotin, cefoxitin, colistin,
210 chloramphenicol, erythromycin, streptomycin, fosfomicin, gentamycin, tetracycline and tobramycin.
211 Intermediate levels of susceptibility with ciprofloxacin and ticarcillin and susceptible to amoxicillin-
212 clavulanic acid, ceftriaxone, imipenem and trimetoprim-sulfamethoxazole. The predominant fatty
213 acids are summed feature 3 (iso- C_{15:0} 2 OH and/or C_{16:1} w7c) (43.71%); Iso-C_{15:0} (20.91%); Iso-C_{17:0}
214 3-OH (7.40%) and C_{16:0} (7.33%). The G+C content of DNA of the type strain is 40.0 mol%.

215

216 The type strain 6.2S^T (= CECT 7938^T = LMG 26465^T) was isolated in 2007 from a soil sample taken
217 near the Lagoa de Fogo, a crater lake in the centre of the island of São Miguel in the Azores
218 archipelago, Portugal.

219

220

221 **Acknowledgements**

222 We are grateful for the support of H.G. Trüper and J. P. Euzéby with the bacteria nomenclature. We
223 thank Francesc García (Laboratori de Sanitat Vegetal, Departament d'Agricultura, Alimentació i
224 Acció Rural, Generalitat de Catalunya, Barcelona) for assistance with the determination of fatty acid
225 content. The authors also thank the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Spain) for funding this
226 research with project CTQ2010-21183-C02/01/ppq and the Generalitat de Catalunya with project
227 2009SGR819.

228

229

230 **References**

231

232 **Barrow, G.I. & Feltham, R.K.A. (editors) (1993).** *Cowan and Steel's Manual for Identification of*
233 *Medical Bacteria*. 3rd ed. Cambridge University Press, UK.

234

235 **Burgos-Díaz, C., Pons, R., Espuny, M.J., Aranda, F.J., Teruel, J.A., Manresa, A., Ortiz, A., &**
236 **Marqués, A.M. (2011).** Isolation and partial characterization of a biosurfactant mixture produced by
237 *Sphingobacterium* sp. isolated from soil. *J Colloid Interface Sci*, 361, 195-204.

238

239 **Chapin, K.C. & Lauderdale, T. (2003).** Reagents, Stains and Media: Bacteriology. In *Manual of*
240 *Clinical Microbiology*, pp. 354-383. Edited by P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller
241 & R.H. Tenover. 8th ed. Washington DC, ASM Press.

242

243 **Duan, S., Lui, Z., Feng, X., Zheng, K. & Cheng, L. (2009).** *Sphingobacterium bambusae* sp. nov.,
244 isolated from soil of bamboo plantation. *J Microbiol* **47**, 693-698.

245

246 **Ezaky, T., Hashimoto, Y. & Yabuuchi, E. (1989).** Fluorometric deoxyribonucleic acid-
247 deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter
248 hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial
249 strains. *Int J Syst Bacteriol* **39**, 224-229.

250

251 **Frenay, J., Hansen, W., Ploton, C., Meugnier, H., Madier, S., Bornstein, N. & Fleurette, J.**
252 **(1987).** Septicemia caused by *Sphingobacterium multivorum*. *J Clin Microbiol* **25**, 1126-1128.

253

254 **He, X., Xiao, T., Kuang, H., Lan, X., Tudahong, M., Osman, G., Fang, C. & Rahman, E. (2010).**
255 *Sphingobacterium shayense* sp. nov., isolated from forest soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 2377-
256 2381.

257
258 **Jorgensen, J.H. & Turnidge, J.D. (2003).** Susceptibility Test Methods: Dilution and Disk Diffusion
259 Methods. In *Manual of Clinical Microbiology*, pp. 1108-1127. Edited by P.R. Murray, E.J. Baron, J.H.
260 Jorgensen, M.A. Pfaller & R.H. Tenover. 8th ed. Washington DC, ASM Press.
261
262 **Kim, K., Ten, L., Liu, Q., Im, W. & Lee, S. (2006).** *Sphingobacterium daejeonense* sp. nov.,
263 isolated from a compost sample. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 2031-2036.
264
265 **Kimura, M. (1980).** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through
266 comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **16**, 111-120.
267
268 **Krieg, N.R., Staley, J.T., Brown, D., Hedlund, B.P., Paster, B.J., Ward, N.L., Ludwig, W. &**
269 **Whitman, W.B. (2010).** Genus I. *Sphingobacterium* Yabuuchi, Kaneko, Yano, Moss and Miyoshi
270 1983, 592^{VP}. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., volume 4, pp. 331-339. Edited
271 by N.R. Krieg, J.T. Staley, D. Brown, B.P. Hedlund, B.J. Paster, N.L. Ward, W. Ludwig & W.B.
272 Whitman. New York. Springer-Verlag.
273
274 **Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H.,**
275 **Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. & Higgins, D.G.**
276 **(2007).** Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947-2948.
277
278 **Liu, R., Liu, H., Zhang, C., Yang, S., Liu, X., Zhang, K. & Lai, R. (2008).** *Sphingobacterium*
279 *siyangense* sp. nov., isolated from farm soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 1458-1462.
280
281 **MacFaddin, J.F. (1980).** *Biochemical test for identification of medical bacteria*. 2nd ed. Baltimore.
282 Williams & Wilkins.
283
284 **Marqués, A.M., Pinazo, A., Farfán, M., Aranda, F.J., Teruel, J.A., Ortiz, A., Manresa, A. &**
285 **Espuny, M.J. (2009).** The physicochemical properties and chemical composition of trehalose lipids
286 produced by *Rhodococcus erythropolis* 51T7. *Chem Phys Lipids* **158**, 110-117.
287
288 **Martínez-Murcia, A.J., Antón A.I. & Rodríguez-Varela, F. (1999).** Patterns of sequence variation
289 in two regions of the 16S rRNA multigene family of *Escherichia coli*. *Int J Syst Bacteriol* **49**, 601-610.
290
291 **Matsuyama, H., Katoh, H., Ohkushi, T., Satoh, A., Kawahara, K. & Yumoto, I. (2008).**
292 *Sphingobacterium kitahiroshimense* sp. nov. isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 1576-
293 1579.

294
295 **Mehnaz, S., Weselowski, B. & Lazarovits, G. (2007).** *Sphingobacterium canadense* sp. nov., an
296 isolate from corn roots. *Syst Appl Microbiol* **30**, 519-524.
297
298 **Mesbah, M., Premachandran, U. & Whitman, W.B. (1989).** Precise Measurement of the G+C
299 content of deoxyribonucleic acid by high performance liquid chromatography. *Int J Syst Bacteriol* **39**,
300 159-167.
301
302 **Pochon, J. & Tardieux, P. (1962).** *Techniques d'Analyse en Microbiologie du sol*. St. Mandé. La
303 Tourelle, France.
304
305 **Rozen, S. & Skaletsky, H. (2000).** Primer 3 on the WWW for general users and for biologist
306 programmers. In *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*, pp. 365-386.
307 Edited by S. Krawetz & S. Misener. Totowa, NJ. Humana Press.
308
309 **Saito, N. & Nei, M. (1987).** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing
310 phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406-425.
311
312 **Schmidt, V.S.J., Wenning, M. & Scherer, S. (2011).** *Sphingobacterium lactis* sp. nov. and
313 *Sphingobacterium alimentarium* sp. nov. isolated from raw milk and the dairy environment. *Int J Syst*
314 *Evol Microbiol* doi: 10.1099/ijs.0.036327-0.
315
316 **Shivaji, S., Ray, M.K., Rao, N.S., Saisree, L., Jagannadham, M.V., Kumar, G.S., Reddy, G.S.N.**
317 **& Bhargava, P.M. (1992).** *Sphingobacterium antarcticus* sp. nov., a psychrotrophic bacterium from
318 the soils of Schirmarcher Oasis, Antarctica. *Int J Syst Bacteriol* **42**, 102-106.
319
320 **Steyn, P.L., Segers, P., Vancanneyt, M., Sandra, P., Kersters, K. & Joubert, J.J. (1998).**
321 Classification of heparinolytic bacteria into a new genus, *Pedobacter*, comprising four species:
322 *Pedobacter heparinus* comb. nov., *Pedobacter piscium* comb. nov., *Pedobacter africanus* sp. nov.
323 and *Pedobacter saltans* sp. nov. Proposal of the family *Sphingobacteriaceae* fam nov. *Int J Syst*
324 *Bacteriol* **48**, 165-177.
325
326 **Takeuchi, M. & Yokota, A. (1992).** Proposals of *Sphingobacterium faecium* sp. nov.,
327 *Sphingobacterium piscium* sp. nov., *Sphingobacterium heparinum* comb. nov., *Sphingobacterium*
328 *thalpophilum* comb. nov. and two genospecies of the genus *Sphingobacterium*, and synonymy of
329 *Flavobacterium yabuuchiae* and *Sphingobacterium spiritivorum*. *J Gen Appl Microbiol* **38**, 465-482.
330

331 **Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007).** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics
332 Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**, 1596-1599.
333

334 **Ten, L.N., Liu, Q.M., Im, W.T., Aslam, Z. & Lee, S.T. (2006).** *Sphingobacterium composti* sp. nov.,
335 a novel DNase-producing bacterium isolated from compost. *J Microbiol Biotechnol* **16**, 1728-1733.
336

337 **Tschech, A. & Pfenning, N. (1984).** Growth yield increase linked to caffeate reduction in
338 *Acetobacterium woodii*. *Arch Microbiol* **137**, 163-167.
339

340 **Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, M.I.,**
341 **Moore, L.H., Moore, W.E.C., Murray, R.G.E., Stackebrandt, E., Starr, M.P. & Trüper, H.G. (1987).**
342 Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *Int J*
343 *Syst Bacteriol* **37**, 463-464.
344

345 **Wei, W., Zhou, Y., Wang, X., Huang, X. & Lai, R. (2008).** *Sphingobacterium anhuiense* sp. nov.,
346 isolated from forest soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 2098-2101.
347

348 **Wilson, K. (1987).** Preparation of genomic DNA from bacteria pp 241-245. In: F.M. Ausbel, R. Brent,
349 R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith & K. Struhl (ed). *Current Protocols in*
350 *Molecular Biology*. New York. Greene Publishing and Wiley-Interscience.
351

352 **Yabuuchi, E., Kaneko, T., Yano, I., Moss, C.W. & Miyoshi, N. (1983).** *Sphingobacterium* gen.
353 nov., *Sphingobacterium spiritivorum* comb. nov., *Sphingobacterium mizutae* sp. nov.: Glucose-
354 Nonfermentating Gram-negative Rods in CDC Groups IIK-2 and IIb. *Int J Syst Bacteriol* **33**, 580-598.
355

356 **Zhang, J., Zheng J.W. Cho, B.C., Hwang, C.Y., Fang, C., He, J. & Li, S.P. (2011).**
357 *Sphingobacterium wenxiniae* sp. nov., a cypermethrin-degrading species from activated sludge. *Int*
358 *J Syst Evol Microbiol* doi: 10.1099/ijs.0.033118-0.
359
360

361 **Table 1.** DNA G+C content and DNA-DNA hybridization between strain 6.2S^T and closely related
 362 type strains of the genus *Sphingobacterium*.

363

	G+C content (mol%)	DNA–DNA relatedness (%)			
		1	2	3	4
6.2S ^T	40.0	100			
<i>S. siyangense</i> KCTC 22131 ^T	40.5*	20 (3)	100		
<i>S. multivorum</i> DSM 11691 ^T	38.5*	39 (2)	20 (1)	100	
<i>S. canadense</i> LMG 23727 ^T	39.9–40.5*	19 (1)	66 (8)	21 (4)	100

364

365 Strains: 1, *Sphingobacterium detergens* sp. nov. 6.2S^T; 2, *S. siyangense* KCTC 22131^T; 3, *S.*
 366 *multivorum* DSM 11691^T; 4, *S. canadense* LMG 23727^T;

367

368 Results of DNA-DNA hybridization experiments are expressed as the mean of four determinations.

369 The value given between brackets is the difference between the reciprocal values.

370 * Data from Krieg *et al.*, 2010.

371

372

373

374 **Table 2.** Differential characteristics of strain 6.2S^T and related members of the genus
 375 *Sphingobacterium*.
 376

Characteristics	1	2	3	4	5
Growth at:					
42°C	-	-	-	-	+
Red. of nitrates to nitrites	-	+	-	-	+
Hydrolysis of:					
Gelatin	+	+	-	-	+ (-)
Assimilation of:					
L-Rhamnose	+	+ (-)	+	+	- (+)
Glycerol	+	- (+)	+	+	- (+)
Acid production from:					
L-Arabinose	-	+	-	+	+
D-Melibiose	-	+	-	-	-

377
 378 Strains: 1, *Sphingobacterium detergens* sp. nov. 6.2S^T; 2, *S. canadense* LMG 23727^T; 3, *S.*
 379 *siyangense* KCTC 22131^T; 4, *S. multivorum* DSM 11691^T; 5, *S. thalpophilum* LMG 11520^T.
 380

381 All analyses have been performed in this study. All strains are positive for aerobic growth at 30°C,
 382 catalase, oxidase and β-galactosidase activities; hydrolysis of DNA, starch, aesculin and urea;
 383 assimilation of D-glucose, L-arabinose, D-melibiose, D-mannose, N-acetyl-glucosamine, D-maltose
 384 and acid production from D-glucose and sucrose. All strains are negative for Gram staining,
 385 sporulation, motility, indole production, Voges-Proskauer test, methyl red test, tween 80 hydrolysis,
 386 glucose fermentation and arginine dihydrolase; assimilation of D-mannitol, L-glutamate, L-sorbitol,
 387 D-ribose, piruvate, capric acid, adipic acid, malic acid, phenylacetic acid and acid production from L-
 388 ramnose, D-manitol, D-melibiose, sorbitol and lactose.

389 +, positive; -, negative; (), data from other study (Krieg *et al.*, 2010) differing from our results.
 390
 391

392 **Table 3.** Fatty acid composition of strain 6.2S^T and related members of the genus
 393 *Sphingobacterium*.

394

Fatty acid	1	2	3	4	5
C _{14:0}	2.23	1.51	3.36	3.60	3.07
C _{14:0} 2-OH	tr	tr	tr	1.32	–
C _{16:0}	7.33	7.92	10.87	8.52	10.93
C _{16:0} 2-OH	tr	tr	tr	tr	2.48
C _{16:0} 3-OH	5.42	4.02	6.48	7.54	3.63
Iso-C _{15:0}	20.91	20.48	16.67	17.56	20.62
Iso-C _{15:0} 3-OH	3.40	6.35	6.81	3.44	5.58
Iso-C _{17:0} 3-OH	7.40	8.98	5.37	5.26	8.67
Summed feature 3	43.71	46.06	43.24	46.70	44.06
Iso-C _{17:1} ω _{9c}	1.32	tr	tr	tr	tr

395

396

397

398 Strains: 1, *Sphingobacterium detergens* sp. nov. 6.2S^T; 2, *S. canadense* LMG 23727^T; 3, *S.*
 399 *siyangense* KCTC 22131^T; 4, *S. multivorum* DSM 11691^T; 5, *S. thalophilum* LMG 11520^T.

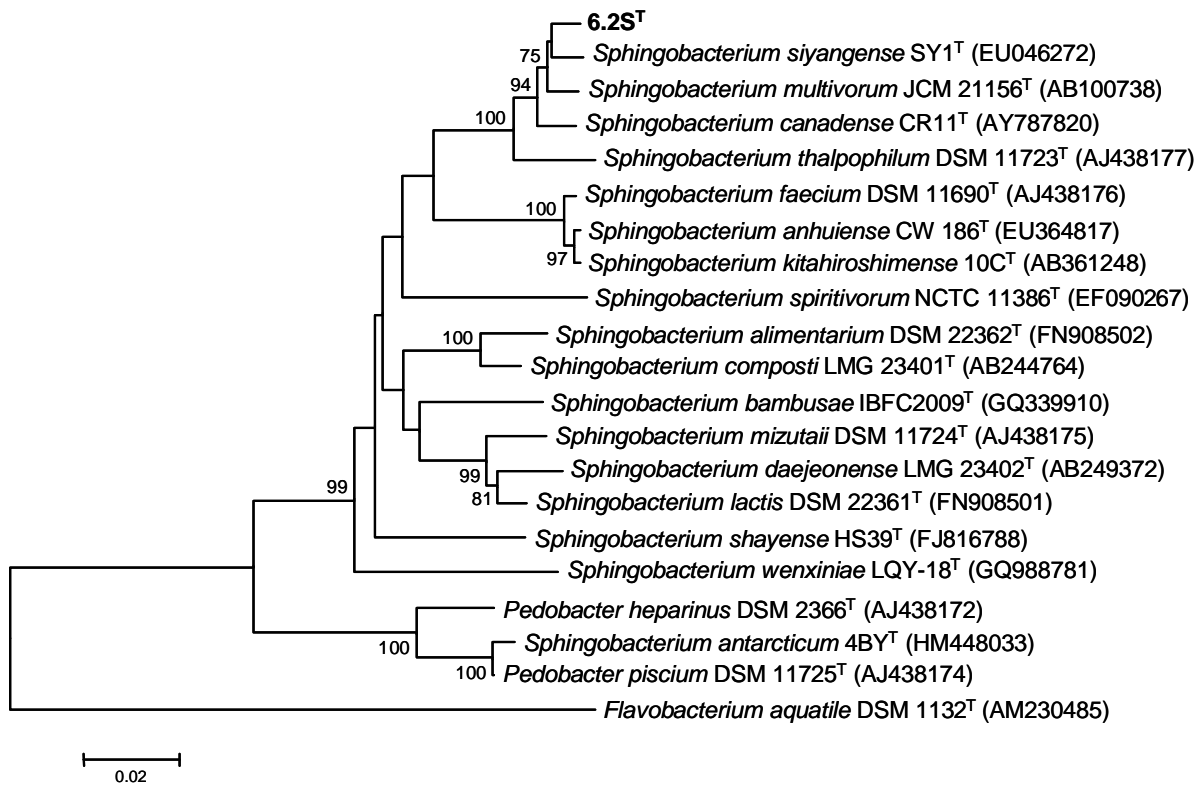
400

401 Values are percentages of total fatty acids; components amounting to less than 1.0% in all strains
 402 tested are not listed. tr, Trace (<1.0 %); –, not detected. * Summed features represent groups of two
 403 fatty acids that cannot be separated by GLC. Summed feature 3 contains iso- C_{15:0} 2OH and/or C_{16:1}
 404 ω_{7c}. All data have been performed in this study.

405

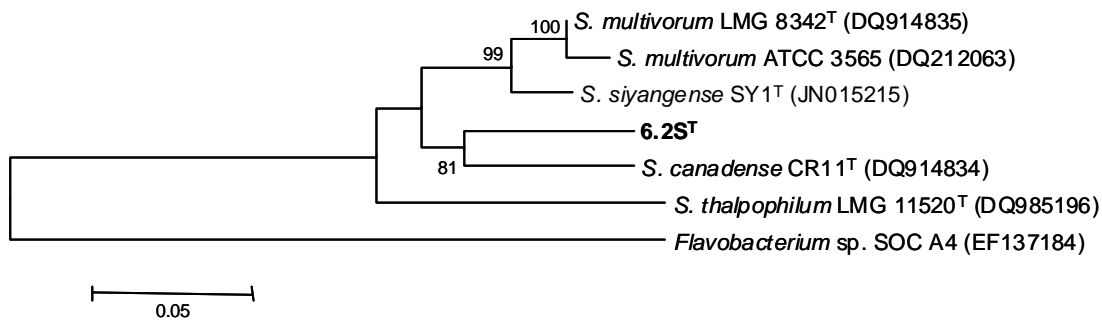
406 **Fig. 1.** Neighbor-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the
 407 relationships between *Shingobacterium detergens* sp. nov. 6.2S^T and members of the genus
 408 *Sphingobacterium*, including two species later reclassified in the genus *Pedobacter* (*P. heparinus*
 409 and *P. piscium*). *Flavobacterium aquatile* DSM 1132^T was used as an outgroup. GenBank accession
 410 numbers are shown in brackets. Bootstrap values (expressed as percentages of 1000 replications)
 411 greater than 70% are given at branch points. Scale bar represents 0.02 substitutions per nucleotide
 412 position.

413
 414
 415



416 **Fig. 2.** Neighbor-joining phylogenetic tree based on *cpn60* gene sequences showing the position of
 417 *Shingobacterium detergens* sp. nov. 6.2S^T and its closest relatives within the genus
 418 *Sphingobacterium*. *Flavobacterium* sp. SOC A4 was used as an outgroup. GenBank accession
 419 numbers are shown in brackets. Bootstrap values (expressed as percentages of 1000 replications)
 420 greater than 70% are given at branch points. Scale bar represents 0.05 substitutions per nucleotide
 421 position.

422
 423
 424
 425
 426
 427
 428
 429
 430
 431
 432
 433
 434
 435



436 **Supplementary Fig. S1.** Cell morphology of strain 6.2S^T under the electron microscope.

437

438

439

440

441

442

443

444

445

446

447

448

449

450

451

452

453

454

455 **Supplementary Fig. S2.** Two-dimensional TLC showing lipid profile of strain 6.2S^T.

456

457

458

459

460

461

462

463

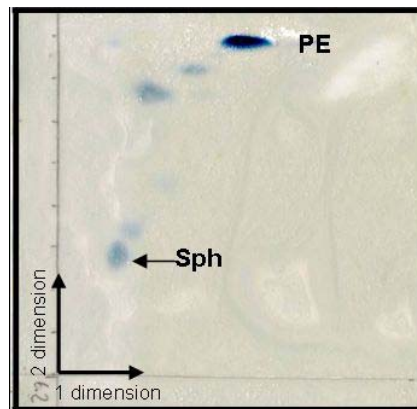
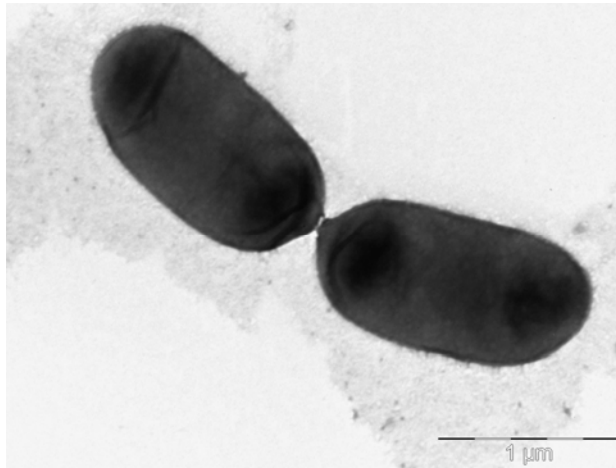
464

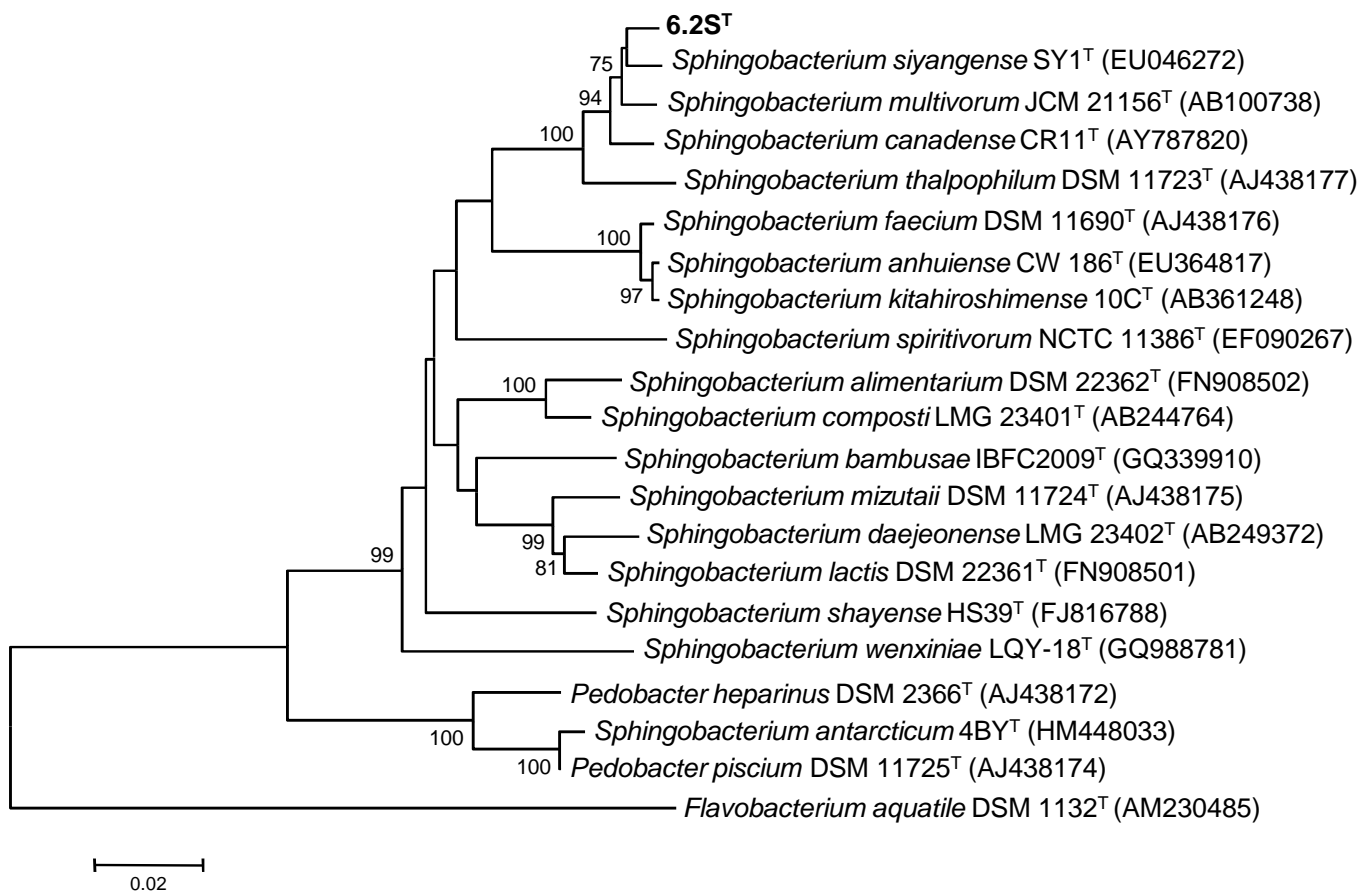
465

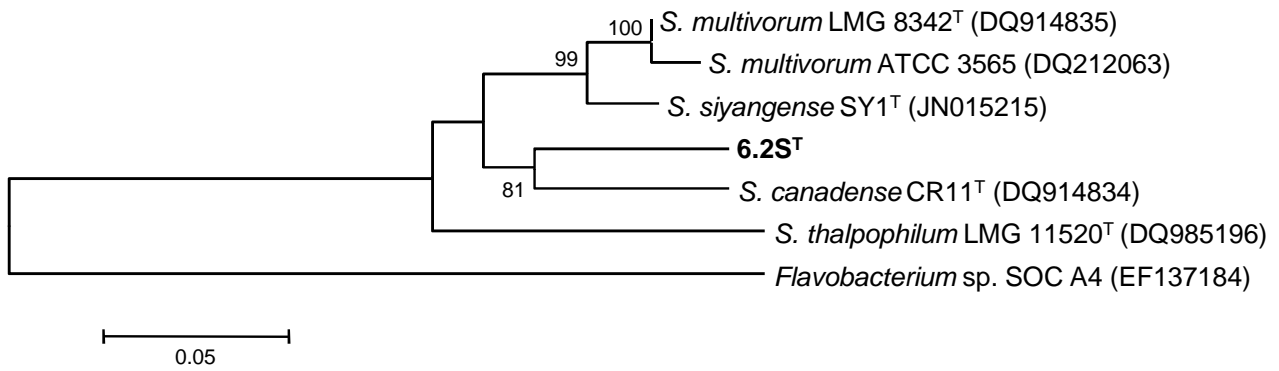
466

467

468







ARTÍCULO 3

Producción y propiedades fisicoquímicas de una mezcla de biotensioactivos obtenidos a partir de *Sphingobacterium detergens*.

The Production and Physicochemical Properties of a Biosurfactants Mixture Obtained from *Sphingobacterium detergens*.

C. Burgos-Díaz^a, R. Pons^b, F.J. Aranda^c, J.A. Teruel^c, A. Manresa^a, A. Ortiz^c and A.M. Marqués^a.

a Lab. Microbiology, Fac. Pharmacy, Univ. Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

b Departament de Tecnologia Química i de Tensioactius, Institut de Química Avançada de Catalunya, IQAC-CSIC, Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain

c Dept. of Biochemistry and Molecular Biology-A, Fac. of Veterinary, Univ. Murcia, 30100 Murcia, Spain

Journal of Colloid and Interface Science (2012).

(Artículo enviado)

3.3. The Production and Physicochemical Properties of a Biosurfactants Mixture Obtained from *Sphingobacterium detergens*.

Revista: Journal of Colloid and Interface Science

Factor de impacto: 3,070 (Artículo enviado)

Resumen

En el presente estudio se optimizaron las condiciones de cultivo para el crecimiento y producción de biotensioactivos por la bacteria *Sphingobacterium detergens*. Se comenzó el estudio con el medio de sales minerales empleado durante la selección del microorganismo, S-MSM, con el cual se obtenía 68 g/L de extracto orgánico y un crecimiento de 0,57 mg proteína/ml, lo que representaba un bajo rendimiento de la producción de BT y del crecimiento. Para intentar mejorar estos resultados se estudiaron las concentraciones óptimas de cada uno de los componentes del medio de cultivo. Primero se optimizó la fuente de nitrógeno, donde se observó que se producía un mayor crecimiento y mayor producción de extracto cuando se empleaba 0,88 g/L de urea. Al eliminar el extracto de levadura del medio *S. detergens* no creció, viéndose la necesidad de utilizar dos fuentes de carbono (glucosa y C₁₁₋₁₃) para la producción de biotensioactivo. Se determinó que un aumento de la concentración de fosfatos K₂HPO₄/KH₂PO₄ de 1/0,5 a 2/1 g/L, producía una mejora en la producción de biotensioactivo y crecimiento y que las diferentes concentraciones ensayadas de FeSO₄·7H₂O, MgSO₄, KCl y CaCl no afectaban significativamente la producción de BT.

Se observó que la producción de biotensioactivo también era posible gracias al co-metabolismo glucosa (20g/L) y diferentes *n*-alcanos, con una buena reducción de tensión superficial y producción de extracto orgánico. El medio optimizado (MCA) se formuló con la siguiente composición (g/L): KH₂PO₄, 1; K₂PO₄, 2; CO(NH₂)₂ 0,88; CaCl₂ 0.01; FeSO₄·7H₂O, 0,01; MgSO₄·7H₂O 0,5; KCl, 1.0; elementos traza 0,05 mL; 1,5% (V/V) C₁₁₋₁₃. Como consecuencia de estos cambios se obtuvo un aumento de la producción de extracto orgánico de 68 mg/L con el medio S-MSM a 250 (g/L) con el medio MCA. Este resultado también se mejoró modificando la estrategia de cultivo. Por lo tanto, por una parte con la alimentación de medio de cultivo y control del pH y con la posterior concentración de sobrenadante mediante liofilización antes de su extracción con acetato de etilo metanol (8:1), se obtuvieron 466 mg/L de extracto orgánico. Esto representó un incremento de la producción de casi 7 veces desde el valor inicial.

Además, se han estudiado las propiedades fisicoquímicas de la mezcla de biotensioactivos. El estudio del efecto de la fuerza iónica y pH sobre la CMC del compuesto indicó que las diferentes concentraciones de NaCl (0-400 mM) solo afectaban a pH:7, mientras que pH: 3 no tenían ningún efecto sobre el valor de la CMC del BT. Además se vio que a pH 3 se obtenían mejores resultados que a pH 7, observándose una disminución del valor de la CMC del compuesto y bajos valores de tensión superficial.

Por otro lado, se ha realizado un estudio para determinar la estabilidad electrostática de las partículas, potencial ζ , del extracto completo y las dos fracciones del biotensioactivo, determinándose que este parámetro era independiente de la concentración de biotensioactivo, observándose un valor promedio de potencial ζ de -57 ± 9 mV. Sin embargo, cuando se adicionó ácido a las muestras (extracto completo y fracción A y B) el valor de potencial ζ se modificó hasta llegar a valores cercanos a cero.

El diámetro de partícula (Z-promedio) fue dependiente de la concentración de biotensioactivo con la fracción A, ya que a concentraciones mayores de biotensioactivo se obtuvieron mayores tamaños de partícula. Por otro lado, con la fracción B y el extracto completo, no se observaron grandes cambios de diámetro con respecto a la concentración, pudiendo deberse a la formación de vesículas estables.

Finalmente en el estudio mediante la observación por microscopio con luz polarizada y difracción de rayos X (SAXS) del extracto completo y sus respectivas fracciones A y B, se determinó que tanto el extracto completo como la fracción A, forman a altas concentraciones cristales líquidos en fase laminar, lo que correspondería a la formación de bicapas en fase acuosa. Por otro lado, la fracción polar del extracto (B) presentó una baja intensidad tras el análisis de rayos X y posterior modelaje, pudiendo indicar la formación de micelas.

The Production and Physicochemical Properties of a Biosurfactant Mixture Obtained from *Sphingobacterium detergens*

Burgos-Díaz C¹., Pons R²., Teruel J.A³., Aranda F.J.³., Ortiz A³., Manresa A¹., Marqués A.M^{1*}.

¹ Laboratory of Microbiology, Fac. of Pharmacy, Univ. Barcelona, Av. Joan XXIII, 08028 Barcelona, Spain.

² Dept. de Tecnologia Química i de Tensioactius, Institut de Química Avançada de Catalunya, IQAC-CSIC, Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain

³ Dept. of Biochemistry and Molecular Biology-A, Veterinary Fac., Univ Murcia, 30100 Murcia, Spain.

* Corresponding author. Fax: +34934024498. E-mail address: ammarques@ub.edu (A.M. Marqués)

Abstract

The commercial application of a new biosurfactant such as the one produced by *Sphingobacterium detergens* needs a cost-effective process and knowledge of its properties. In the present study, a specific medium and a downstream process have been developed to enhance biosurfactant production. Optimal concentrations of nutrients in MCA medium were (g/L): KH₂PO₄, 1; K₂HPO₄, 2; CO(NH₂)₂ 0.88; CaCl₂ 0.01; FeSO₄·7H₂O, 0.01; MgSO₄·7H₂O 0.5; KCl, 1.0; trace elements 0.05 mL. Biosurfactant production in the MCA medium required a bacterial co-metabolism of glucose and an *n*-alkane. A feed-batch culture with supernatant lyophilization prior to organic extraction produced 466 mg/L of organic extract, which represents a 6.9-fold increase in production. The newly obtained biosurfactant was a complex mixture of molecules. The three characterized fractions consisted of the complete fraction and two second-level purification fractions with apolar and polar characteristics. The complete and apolar fractions have been shown to self-aggregate in the form of lamellar liquid crystals at a high concentration and bilayers at lower concentrations. Negatively charged particles were identified, which were neutralized at a low pH with a concomitant increase in size. The pH affected the surface tension of the solutions congruently with phosphate headgroups.

Keywords: Biosurfactant, *Sphingobacterium detergens*, co-metabolism, CMC, X-ray Scattering, ζ-potential, lamellar phases.

1.-Introduction

It is becoming increasingly apparent that understanding microbial behavior necessarily involves a better understanding of BS activity at interfaces, since microbial activity takes place on boundaries. BS dramatically influences microbial physiological behavior in areas such as cell mobility, cell communication, nutrient accession, cell-cell competition and plant and animal pathogenesis [1]. Bushnell and Hass [2] were among the first to demonstrate bacterial production of biosurfactants (BS) by isolating *Corynebacterium simplex* and a strain of *Pseudomonas* in mineral media containing either kerosene, mineral oil or paraffin. Since then, many microorganisms have been isolated and found to produce a variety of BS molecules [3]. Microbial surfactants constitute a diverse group of molecules and are known to occur in chemical structures, such as glycolipids, lipopeptides and lipoproteins, fatty acids, neutral lipids, phospholipids and polymeric and particulate structures [4].

Surfactants are one of the most representative chemical products and are consumed in large quantities every day on a worldwide scale. Many traditional surfactants exhibit an insufficient rate of biodegradation and high aquatic toxicity [5]. In comparison, in recent years, BS have attracted considerable scientific attention due to their high surface activity, reduced toxicity, easy biodegradability, better environmental compatibility, higher foaming and higher selectivity. These interesting properties, and BS effectiveness at extreme temperature, salinity and pH, and their ability to be synthesized from renewable feed stocks, have led to a growing interest in BS as an alternative to compounds obtained by chemical synthesis [6-9].

Research in BS has expanded in recent years due to their potential use in different industrial areas (food, agriculture, paper, and metal or hydrocarbon remediation) or in the biomedical field (antimicrobial, antifungal, antioxidant, antiviral or cytotoxic activity), leading to high added value products. Nonetheless, in order to gain a significant share of the market, BS must be produced at a lower cost [10].

The growing demand for green products has also been the driving force for new BS development in the last few years. Despite the advantages and diverse potential applications of BS, attempts at commercial production have been unsuccessful due to the low yields obtained [11-12]. Under certain growth conditions, some microorganisms can increase BS production, which is influenced by the effect of various chemical and physical factors and media composition [13]. A new BS producer, *Sphingobacterium detergens* strain 6.2S, has been recently described [14]. This bacteria produces a mixture of compounds initially classified as phospholipids, glycolipids and lipopeptides. The crude extract and purified polar fraction produced by *S. detergens* are able to reduce the surface tension of water to very low values (22 and 23 mN m⁻¹, respectively) due to synergism [14]. The presence of nitrogen in the polar fraction in the absence of amino acids suggests the presence of a new BS, whose high effectiveness and possible new structure make it a very interesting target of study. However, complete and precise characterisation of this kind of compounds is difficult due to the low availability of samples. Large-scale production of these molecules is hampered by the low yields of production processes and to the intrinsic complexity of separation due to the similarity of products present in the crude extracts.

The present work reports the first steps to improve *S. detergens* production of BS and their preliminary physicochemical characterization. With this aim, the concentration of the different components of the culture medium were optimized. As a second strategy, the pH and limiting nutrients were controlled during bacterial growth in order to extend the production period. The raw BS were separated in two different polarity fractions, corresponding to chemical mixtures. Both fractions, as well as the complete extract, were characterized in terms of particle size and charge as a function of pH. Further, the particles were studied using small angle x-ray scattering (SAXS). The surface tension as a function of salinity and pH was highly dependent on the studied fraction. The results are discussed in terms of the composition of the different fractions and charged headgroups.

2. Materials and methods

2.1. Microorganism and culture conditions for BS production

Strain 6.2S was isolated from non-contaminated soil and characterized as *Sphingobacterium detergens* [15]. This strain was maintained by fortnightly subculture on Trypticase Soy Agar (Pronadisa, Spain) and preserved in cryovials at -20° C (Combourg, France).

For BS production, the mineral salt medium (S-MSM) of the following composition was used (g/L): KH_2PO_4 , 0.5; K_2HPO_4 , 1; NaNO_3 , 1.2; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 1.1; CaCl_2 0.01; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5; KCl, 1.0; yeast extract, 0.05; trace element solution, 0.05 mL. Carbon source 0.05 C₁₁₋₁₃ (C₁₀ 9.3%, C₁₁ 32.4%, C₁₂ 31.3%, C₁₃ 26.7%) and 0.05 sodium citrate plus 2% (V/V) of inoculum suspension in Ringer solution was added. To avoid complex formation, the mineral media and the carbon sources were autoclaved separately [14]. Cultures were incubated at 30°C in a 1000 mL baffled Erlenmeyer flask with 200 mL basal medium for 48 h with agitation at 150 rpm.

2.2 BS recovery

Broth samples were collected and checked for bacterial growth (measured as protein by the Lowry method, Bio-Rad D_c Protein assay), pH, and surface and interface tension. The organic extract was recovered from the culture supernatant after cell removal by centrifugation at 8000xg for 15 min in an Avanti™ j-20 xp centrifuge (Bekman Coulter™, USA) for 15 min at 4°C. The supernatant was extracted three times with an equal volume of an ethylacetate-methanol mixture (8:1, V/V). Organic phases were combined, dried over anhydrous sodium sulphate and concentrated to dryness in a rotary vacuum evaporator (Büchi, Switzerland). The resulting organic extract was weighed.

2.3. Effect of nutrients on Biosurfactant Production

S. detergens was grown aerobically in 250 mL S-MSM medium in 1000 mL baffled Erlenmeyer flasks, supplemented with 2% C₁₁₋₁₃. The entire content of three sets of flasks was sacrificed periodically for surface and interfacial tension, biomass and BS quantification. The following nitrogen sources were evaluated for BS production: NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ (0.44-1.32 g/L). The most appropriate concentrations of $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, MgSO_4 , KCl and CaCl_2 were studied in a range of 2.5-15 mg/L; 1/0.5-4/2 g/L; 0.1-0.2 g/L; 0.5-1.5 g/L and 5-15 mg/L, respectively. Glycerol, olive oil, kerosene, C₁₁₋₁₃, C₁₃, C₁₂₋₁₄, C₁₅ were employed as the carbon source as indicated.

2.4. Time course of growth

A modified MCA medium with the following composition was used (g/L): KH_2PO_4 , 1; K_2PO_4 , 2; $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 0.88; CaCl_2 0.01; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5; KCl, 1.0; trace element solution, 0.05 mL. Carbon source 1.5% (V/V) C₁₁₋₁₃ (C₁₀ 9.3%, C₁₁ 32.4%, C₁₂ 31.3% , C₁₃ 26.7%) and glucose (20g/L) plus 2% (V/V) of inoculum suspension in Ringer solution were added. To avoid complex formation, the mineral media and the carbon sources were autoclaved separately. Cultures were incubated at

30°C for 24-48 h at 150 rpm. During culture growth, broth samples were collected at regular time intervals. Growth was monitored by measuring protein. Biosurfactant production was monitored by measuring the surface and interfacial tension against the kerosene (mN/m) of the supernatant samples. Results represent the mean of triplicate experiments. Measurements of pH were taken using Crison micro pH 2000 (Spain). Consumption of glucose and urea were determined by the Glucose-Test (Microquant[®], Merck) and Urea Test (Microquant[®], Merck), respectively. C₁₁₋₁₃ consumption was measured in the supernatant by weight at t=0 and after 24h culture through three extractions with an equal volume of hexane. Organic phases were combined, dried over anhydrous sodium sulphate and concentrated in a rotary vacuum evaporator (Büchi, Switzerland). Both resulting extracts were weighed and compared. Total viable counts were determined by plate counts on TSA using suitable saline dilutions of the culture in MCA medium. Extract purification was performed according to Burgos-Díaz *et al.* [14].

2.5 Study of BS recovery with different organic solvents

After 48 h of culture, cells were removed from the medium by centrifugation at 8000xg for 15 min. BS were recovered from the cell-free concentrate by three extractions with an equal volume of methanol, ether-butyl-ether, ethyl acetate/methanol (8:1), ethyl acetate, chloroform or hexane, and concentrated to dryness. The dry organic extract was weighed. When indicated, the supernatant was first lyophilized (Cryodos-50, Telstar, Spain), concentrated 25 times and extracted as described above.

2.6 Electronic Microscopy

Samples were transferred to 1.5 mm diameter and 200 µm depth planchettes, immediately cryoimmobilized using a Leica EMPact high-pressure freezer (Leica, Vienna, Austria) and then stored in liquid nitrogen until further use. They were freeze-substituted over 3 days at -90°C in anhydrous acetone containing 2% osmium tetroxide and 0.1% uranyl acetate at -90 °C for 72 hours and warmed up to room temperature, 5° per hour (EM AFS, Leica, Vienna, Austria). After several acetone rinses, samples were infiltrated with Epon resin during 2 days and the resin was polymerized at 60°C during 48 hours. Ultrathin sections were obtained using a Leica Ultracut UCT ultramicrotome and mounting on Formvar-coated copper grids. They were stained with 2% uranyl acetate in water and lead citrate. Sections were then observed in a Jeol 1010 electron microscope (Jeol, Japan)

2.7 Study of organic extract solubility

Equal amounts of organic extract (20mg) were dissolved in 1 mL of different organic solvents with varying polarity (methanol, methyl tertiary-butyl ether, ethyl acetate/methanol (8:1), ethyl acetate, chloroform, hexane) at 25°C. After vortex mixing for 2 min, and sonication if necessary, the vials were observed against the light.

2.8 Surface tension measurements

Equilibrium surface tension (γ_{st}) was measured at 25°C with a Krüss K9 digital tensiometer (Krüss, GmbH, Hamburg, Germany) using the ring method. The instrument was calibrated against ultrapure water (γ_{st} 72 mN/m) and pure ethanol (γ_{st} 22.7 mN/m) to ensure accuracy over the entire range of surface tension. Prior to use, the platinum ring

and all glassware were sequentially washed with chromic acid, deionized water, acetone and finally flamed with a Bunsen burner. The effect of ionic strength on critical micelle concentration (CMC) was determined by surface tension measurements using the ring method at 25 °C. Two series of BS solutions were prepared: in 5 mM Hepes (pH 7.0) or in 100 mM sodium citrate (pH 4.0) buffer at 25 °C. Concentrated NaCl was added to produce five levels (0–300 mM) and the CMC of each BS series was determined.

2.9 ζ -potential and particle size

A Malvern Zetasizer Nano ZS series HT instrument was used to evaluate both zeta potential and particle size. The dispersions were placed into U-shaped cuvettes equipped with gold electrodes. The temperature was set to 25.0 ± 0.1 °C. The zeta potential (ζ) is related to the electrophoretic mobility by Henry's equation. Malvern software was used to analyze the electrophoretic mobility and calculate the corresponding ζ potential using the Smoluchowski approximation. This was justified due to the large size of the particles and because the screening length was much smaller than the particle radius. The instrument performed additional DLS experiments in back scattering mode at 173° and $\lambda = 632.8$ nm. The self-correlation curves were analyzed using the CONTIN routine included in the Malvern control and analysis software. The measurements were run in triplicate and their agreement was within $\pm 5\%$.

2.10 Small-Angle X-ray Scattering

Small-Angle X-ray Scattering (SAXS) measurements were carried out using an S3-MICRO (Hecus X-ray systems GMBH Graz, Austria) coupled to a GENIX-Fox 3D X-ray source (Xenocs, Grenoble), which provides a focused x-ray beam with a $\lambda=0.1542$ nm Cu $K\alpha$ -line with more than 97% purity and less than 0.3% $K\alpha$. Transmitted scattering was detected using a PSD 50 Hecus. Temperature was controlled by means of a Peltier TCCS-3 Hecus. Samples were inserted in a glass capillary of 1mm diameter and 20 μm wall thickness using a flow-through set-up. The SAXS scattering curves are shown as a function of the scattering vector modulus,

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2} \quad (1)$$

where θ is the scattering angle. The q values with our set-up ranged from 0.08 nm^{-1} to 6.0 nm^{-1} . The scattering vector was calibrated by measuring a standard silver behenate sample. Due to the use of a small focused beam ($300 \times 400 \mu\text{m}$ fwhm), the scattering curves were mainly smeared by the detector width. The scattering curves were background-subtracted and placed on an absolute scale by comparison with a water sample scattering [16, 17]. The instrumentally smeared experimental SAXS curves were fitted to numerically smeared models for beam size and detector width effects. A least squares routine based on the Levenberg-Marquardt scheme was used. The bilayer model was that of the MCG [18, 19].

2.11 Optical Polarizing Microscopy

An Olympus BX51 polarized light microscope was used. Images were acquired with an Olympus C-5060 Wide Zoom digital camera. Anisotropic liquid-crystalline phases give rise to typical birefringent textures under polarized light [20]. The magnification of the pictures was assessed against a calibrated scale.

3. Results and Discussion

3.1 Biosurfactant production

According to Mukherjee *et al.* [4], the production economy of every microbial metabolite is governed by three basic factors: initial raw material costs; availability of suitable and economic production and recovery procedures; and the product yield of the producer microorganisms. In this work, with the aim of improving the competitiveness of BS production, our strategy was to develop an efficient bioprocess (media and culture conditions) with an effective separation procedure. This improvement was achieved in several steps. BS production in a general medium such as S-MSM gave a low amount of biomass (0.57 mg protein/mL) and organic extract (68 mg/L). In the optimization study the carbon source (C_{11-13}) was increased to 20 g/L, sodium citrate was eliminated and the effect of each component on bacterial growth and BS production was examined.

3.1.1 Effect of Nitrogen sources on BS production

The effect of the nitrogen source was the first parameter to be studied. To obtain a defined and equivalent medium, the yeast extract was eliminated and equimolar amounts of other types inorganic nitrogen substrate were supplied. No growth was observed after 48 h of incubation, indicating that *S. detergens* strain 6.2S requires the vitamins or micronutrients in the yeast extract. Results obtained with different nitrogen sources plus 0.1% yeast extract are shown in Figure 1. A good result was obtained with sodium nitrate, with a substantial decrease in surface and interfacial tension (36.5 mN/m and 10.4 mN/m, respectively), but cellular growth was limited (1.6 mg protein/mL). This behavior can be related to the absence of nitrate reductase in *S. detergens* [15] and the use of the yeast extract as a nitrogen and carbon source. Figure 1 shows that urea (0.88 g/L) is more effective than ammonium phosphate and sulfate since a higher protein concentration and lower surface and interfacial tension were obtained. Hence, urea was selected as the nitrogen source for all other media combinations.

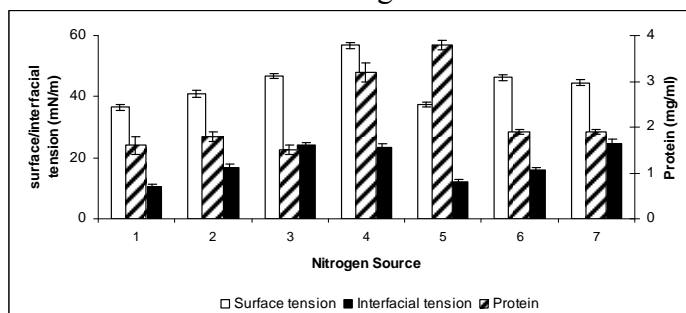


Figure 1: Surface activity in supernatant and biomass (protein) with different nitrogen sources and 0.1 g/L yeast extract. Nitrogen sources (g/L) 1: NaNO_3 , 2.5; 2: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 1.45; 3: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.92; 4: $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, 0.44; 5: $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, 0.88; 6: $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, 1.1; 7: $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, 1.32.

The effect of the nitrogen source on BS production depends on the microorganism used. Sodium nitrate proved more effective than ammonium sulfate and urea for obtaining high concentrations of rhamnolipids from *P. aeruginosa* PA1 [10]. Also, the addition of NaNO₃ as the sole nitrogen source (0.1%; w/v) in a glucose-containing MS medium resulted in the highest BS production in *P. aeruginosa* MR01 (0.98 g/L). Organic nitrogen sources in the MR01 medium, including yeast extract, urea and peptone, gave a lower BS production [13]. Morita *et al.* [21] studied the effect of five nitrogen sources on the production of a glycolipid by *Ustilago scitaminea*. Under optimum conditions, this fungus produced 25.1 g/L of MEL-B from sugar cane juice supplemented with urea. Good BS production by *Bacillus circulans* was achieved with ammonium sulfate or yeast extract, although the use of urea gave a significantly higher concentration (1.8 g/L). Urea is a cheaper chemical than other nitrogen sources and can thus be used as a component in the BS production medium without affecting the process economics [9].

3.1.2 Effect of the carbon source on BS production: co-metabolism

When C₁₁₋₁₃ was used as the single carbon source, along with urea as the nitrogen source, growth and BS production were only possible with yeast extract (0.1%). When another carbon source was used (glucose) with urea, in absence of yeast extract, an abundant growth was observed, indicating that yeast extract is necessary for the growth of strain 6.2S in the presence of carbon sources such as the *n*-alkanes C₁₁₋₁₃. Nevertheless, BS production did not occur in these conditions because surface and interfacial tension did not decrease after growth. According to our results (Table 1), BS were produced by strain 6.2S only when two carbon sources were present: glucose or yeast extract were used by cells to grow and the *n*-alkane (C₁₁₋₁₃) was used by cells as an inductor of BS production in a co-metabolism process. A decrease of 76.7% of C₁₁₋₁₃ during cellular growth was observed after 24 h, indicating its bacterial use as a carbon source or intracellular accumulation. In conclusion, a co-metabolism of glucose plus C₁₁₋₁₃ was necessary for BS production by *S. detergens*.

Table 1. Surface measurements and growth of *S. detergens* with different carbon sources after 48 h culture

Culture conditions	Surface tension (mN/m)	Interfacial tension (mN/m)	Organic extract (mg/L)	Protein (mg/mL)
G-MSM Time 0 h	55.1	32.0	-	-
G-MSM + 2% C ₁₁₋₁₃	45.2	24.3	-	-
G-MSM + 2% Glucose	57.2	20.1	22.0	5.8
G-MSM + 2% C ₁₁₋₁₃ 2% + Glucose	37.2	7.4	120	3.8

Other authors have described the advantages of using two types of substrates in the culture medium, one miscible and the other immiscible. Van Bogaert *et al.* [22] and Daverey and Pakshirajan [23] studied the production of sophorolipids by *Candida bombicola* using a simple medium with a waste carbon source such as sugarcane molasses. They observed that BS production increased several-fold when the production media contained a hydrophilic carbon source supplemented with a lipophilic carbon source. *Pseudomonas* species are able to use both water-soluble carbon sources and

water-immiscible substrates. Interestingly, when both hydrophilic and hydrophobic substrates were used simultaneously, BS production by *Pseudomonas* species was found to increase significantly [24]. Bento and Gaylarde [25], who studied *Pseudomonas* sp. and *Bacillus* sp. isolated from diesel fuel, observed that BS production in the presence of glucose was low, but it rapidly increased on the addition of diesel oil. This result indicates that diesel-oil induced either a higher production, or the production of a chemically different, more effective, emulsifying agent than is synthesized in the presence of glucose alone.

3.1.3 Effect of other nutrients and phosphate concentration on BS production

The effect of different concentrations of $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, MgSO_4 , KCl and CaCl_2 on BS production and growth was studied but no significant improvement in either was observed, and the initial culture medium concentration of these salts was not modified.

The effect of the phosphate mixture ($\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$) was studied in the range of 1/0.5 to 5/2.5. As shown in Figure 2, when the phosphate concentration was increased from 1/0.5 to 2/1, a slight reduction in surface tension was observed as well as a considerable improvement in the buffering properties of the medium, which was maintained at pH 7 during 18 h of culture. When $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ was lowered, the supernatant rapidly acidified and bacterial growth stopped earlier.

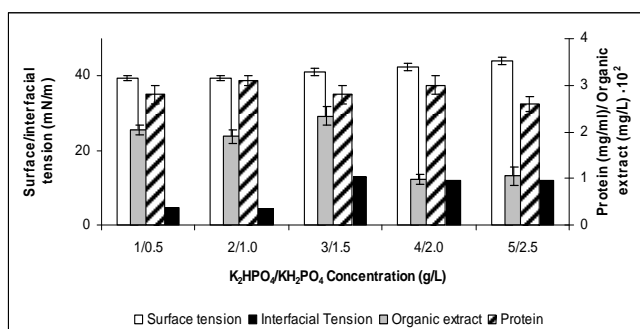


Figure 2: Effect of phosphate concentration on cellular growth and BS production after 48 h culture

In conclusion, the variables showing a positive effect on BS were carbon, nitrogen and phosphate sources. An MCA medium was developed based on these results.

3.1.4 BS Production with different carbon sources

The effect of different carbon sources on BS production was studied using MCA medium (2% glucose) and 24-48 h of incubation. When glycerol was employed, growth was observed (Figure 3.A) but the surface tension did not drop below 40 mN/m. When olive oil was used as an additional carbon source, abundant growth was observed (8.6 mg protein/mL) and surface tension was reduced to 40.0 mN/m. Nevertheless, the control medium without an inoculum had a similar appearance and physicochemical properties, due to the oil emulsion formed by agitation. Additionally, no products were detected in the organic extract by TLC, which was severely hampered by residual olive oil. When kerosene and different *n*-alkane mixtures were used as the carbon source, satisfactory results were obtained in each case, with good surface tension reduction and amount of organic extract. Additionally, similar BS were detected by TLC. In

conclusion, all the studied *n*-alkane mixtures could be used for BS production by *S. detergens*.

When the C₁₁₋₁₃ concentration was optimized in the MCA medium, good results (interfacial tension and organic extract) were obtained with initial concentrations of 1.5 and 2 %, but 1.5% was chosen for posterior studies since an excess of *n*-alkane hampers organic extract manipulation and purification (Figure 3.B). Morita *et al.* [21] also consider that the use of vegetable oils and *n*-alkanes often complicates the production and recovery process and a difficult separation process is inevitable due to co-existing residual oils and their breakdown products. Better growth results (but not BS production) were obtained with 0.5% C₁₁₋₁₃, indicating partial toxicity to cells, especially at high concentrations.

Finally, the effect of the concentration of glucose with 1.5% C₁₁₋₁₃ was also studied (Figure 3.C). Bacterial growth and organic extract production were directly correlated with the glucose concentration. Additionally, surface and interfacial tension decreased as the amount of organic extract increased (37.1 mN/m and 6 mN/m respectively). As a result, MCA was prepared with 20 g/L glucose.

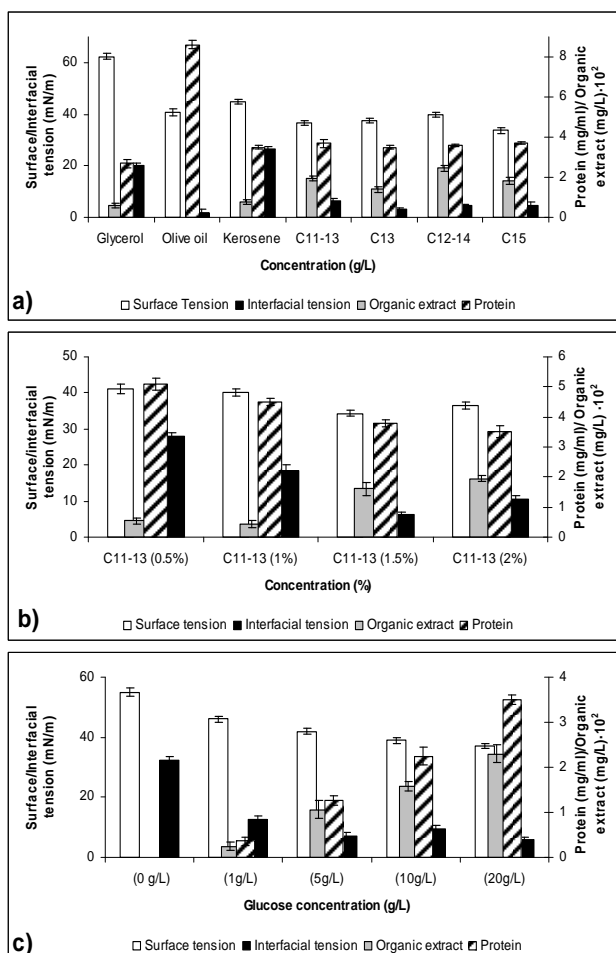


Figure 3: Effect of different carbon sources (a), C₁₁₋₁₃ concentration (b) and glucose concentration (c) on growth, BS production and surface and interfacial tension after 24-48 culture.

The preferred carbon source for BS production depends on the identity of the producer microorganism. The majority of known BS are synthesized from water-immiscible

hydrocarbons, although bacteria belonging to the *Bacillaceae* family, such as *Bacillus subtilis* strains, are able to produce surfactants from water-soluble substrates. Moreover, it has been reported that the addition of a hydrocarbon to the culture medium completely inhibits surfactin production by *B. subtilis*. Water-soluble substrates are cheaper than hydrocarbons and are preferred because single-phase cultivation is simpler than biphasic cultivation [11]. The known metabolic versatility of Pseudomonads is also reflected in BS production. Among eleven carbon sources tested with *P. aeruginosa* MR01, the most favorable for BS production were olive oil, glycerol, glucose and fructose. The highest BS production of up to 1.4 g/L and growth rate of 2.3 g/L were achieved using 1% (v/v) of olive oil as the sole carbon source [13]. Residual oils or by-products have also been described as very interesting, cheap carbon sources. *P. aeruginosa* 47T2 decreased the surface tension of the medium to 32-34 mN/m with a production yield of 0.34 g/g when oils previously used for frying were employed as a unique carbon source [26]. However, in the case of *S. detergens*, although olive oil allows an abundant growth, it is not a good substrate for BS production.

3.1.5 Time course of growth and BS production

One of the primary approaches to increasing yields in culture production is medium improvement. Cell growth and the accumulation of metabolic products are strongly influenced by medium composition. Environmental factors and growth conditions or the method of extraction can also affect BS production by their impact on cellular growth [27]. Based on the results obtained using the classical one-factor-at-a-time strategy, the MCA medium was formulated with all the elements in the proportion that positively affected the BS production. The microbial growth kinetics and BS production in the MCA medium is presented in Figure 4. After a lag period of 6 h, exponential growth (measured as protein concentration) began and was maintained until 30 h. The maximum amount of cells was found to be 3.8 mg protein/mL after 30 h of incubation and was maintained during 54 h of growth. As exponential growth began, surface and interfacial tension decreased. The surface tension of the medium was reduced from 55 mN/m to 35 mN/m after 24 h of growth, indicating BS production. Semi-quantitative TLC carried out with organic extracts obtained at different times revealed an increase in BS concentration until 30 h, indicating that BS production was growth-associated. The initial low surface tension ($T=0$) was due to the presence of an excess of C_{11-13} in the MCA medium. Santa Anna *et al.* [10] similarly associated a low initial surface tension in the medium with babassu oil, due to the surfactant properties of the fatty acids in this vegetable oil. Glucose was consumed during exponential growth, but a residual concentration remained in the medium. Urea was consumed rapidly during the exponential growth and fully consumed after 30 h, as shown in Figure 4. Growth cessation was correlated with nitrogen consumption and medium acidification (pH 5). C_{11-13} consumption was measured by weight after medium extraction with hexane, but its insolubility impedes a precise determination. However, almost all the carbon source had disappeared from the supernatant by the end of the culture (48h). As mentioned before, biotransformations using oils as the carbon source are a challenge for culture control and active product extraction. The MCA medium enhanced the amount of organic extract available from 68 mg/L up to 250 mg/L compared with S-MSM, representing a 3.7-fold increase (Table 2).

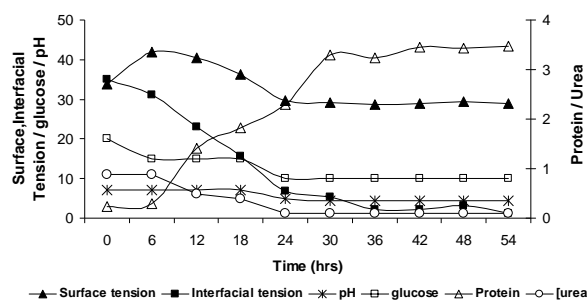


Figure 4: Time course profiles of protein (mg/ml), residual glucose (mg/L) and urea concentration (mg/L), surface and interfacial tension (mN/m) and pH during *S. detergens* growth in MCA medium.

Table 2: BS production, surfactant activity and growth in the different culture and extraction conditions studied.

Culture medium	Surface tension (mN/m)	Interfacial tension (mN/m)	Organic extract (mg/L)	Protein (mg/mL)	Relative organic extract increase
S-MSM	37±1	10	68	0.57	1
MCA	36±1	6	250	3.8	3.7
MCA + Lyophilization	36±1	5	400	3.8	5.9
MCA + feed + lyophilization	36.5±1	5	466	4.7	6.9

During the exponential growth phase, the pH dropped markedly from 7 to 4.5 after 24 hours of culture, and consequently cell growth stopped and BS production did not increase. pH control of the medium is therefore necessary for optimal BS production and cell survival.

Depending on the producing microorganisms, several patterns of biosurfactant production by fermentation are possible [27]. Surfactant biosynthesis on cassava waste started during the exponential growth phase and continued during the stationary phase, although it cannot be stated that BS production by *B. subtilis* is growth-associated, since 50% of it occurred when cell growth reached the stationary phase [11]. BS production by many microorganisms is associated with the stationary phase, including rhamnolipid production by *P. aeruginosa* PA1, which increased considerably in this phase [10]. Growth curves of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* on diesel-oil were obtained to establish the relation between cell growth and BS production. Growth peaked at day 8, while BS was detected at day 2, when growth was almost inexistent, with maximal production obtained during the stationary/death phase of growth, suggesting that BS were produced as secondary metabolites [8]. With *P. aeruginosa* MR01, maximum BS production occurred in the stationary growth phase (after 84h). The bacterial growth was fast at 37°C and a final dried cell mass of about 1.65 g/L was obtained after 84 h of cultivation resulting in a BS production of up to 0.8 g/L [13]. *Azotobacter chroococum* cultured on peanut oil cake in both flask and bioreactor conditions gave a higher BS production than on crude oil and waste motor lubricant oil, indicating that this cheaper substrate is suitable for large-scale BS production. In all culture conditions tested, BS concentration was highest in the early stationary phase [28]. Similarly to *S. detergens*, the marine *B. circulans* (MTCC 8281) displayed BS

production in a growth-associated manner [9] and the BS production by *L. lactis* 53 and *Streptococcus thermophilus* A was found to be growth-associated [27].

3.1.6 Optimization of BS extraction

The production process remains incomplete without an efficient and economical means of product recovery. For many biotechnological products, downstream processing accounts for ~60% of the total production costs [4, 21]. The organic solvent and the extraction technique can also modify the yield, cost and type of compounds extracted. Thus, different organic solvents were studied in the same conditions. Methyl tertiary butyl-ether is recommended for BS extractions by Kuyukina *et al.* [29] due to its low toxicity and cost, but this organic solvent resulted in an insufficient amount of organic extract (Figure 5). More organic extract was obtained with ethyl acetate, but verification of its components by TLC showed that product diversity was higher with ethyl acetate/methanol (8:1). Chloroform is a hydrophobic solvent frequently used in extractions, but it was not effective for organic extraction with *S. detergens* culture. Hexane, the most non-polar organic solvent, showed a good affinity for the carbon source (C₁₁₋₁₃) but only a small quantity of products was detected by TLC. In this case, the organic extract obtained was liquid due to the extraction of both the *n*-alkane and BS, and so was not quantified by weight (Figure 5). In fact, Daverey and Pakshirajan [23] used hexane to remove remaining oil and any hydrophobic substances such as fatty acids and alcohols that may be formed during fermentation in the sophorolipid production process. If not previously removed, a residual lipidic carbon source can be co-extracted and cause difficulties during further applications. For this reason, additional extraction with hexane is most frequently used.

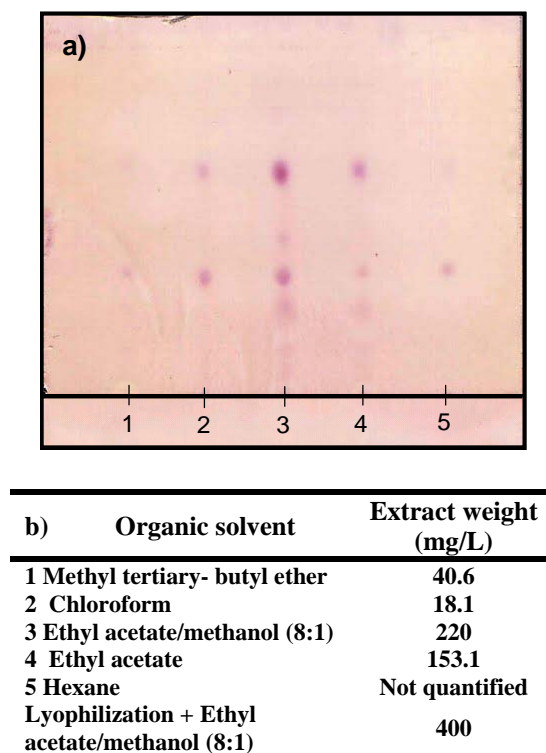


Figure 5: a) TLC of organic extract obtained with different organic solvents. Methyl tertiary-butyl ether, 1; Chloroform, 2; ethyl acetate/methanol (8:1), 3; ethyl acetate, 4; hexane, 5. b) Amount of organic extract obtained with different solvents.

Even after optimization of culture and organic extraction, procedural efficiency can be further increased if the product is concentrated prior to extraction. To improve recovery, the culture supernatant of *S. detergens* was lyophilized and extracted three times with ethyl acetate/methanol (8:1). 400 mg/L of organic extract was obtained, which was 5.9-fold higher than the initial extraction (Table 2).

The low concentration and the amphiphilic nature of microbial surfactants often limit their recovery. A wide variety of organic solvents have been used for BS extraction, either singly or in combination. Chloroform and methanol mixtures in various ratios are usually the most effective, facilitating the adjustment of polarity of the extraction agent to the target extractable material. However, the use of chloroform is not economically warranted and is a highly toxic chloro-organic compound regarded as harmful for the environment and human health [29]. With *S. detergens* the best results (amount and number of products) were obtained after extraction with ethyl acetate and methanol (8:1), which are also recommended for their lower toxicity.

3.1.7 Feed-batch culture

The cell viability evolution of *S. detergens* strain 6.2S was studied by the observation of ultrathin sections at 0, 24 and 48 h of growth. Strain 6.2S has a characteristic gram-negative envelope and structure (TSA) (Figure 6a). After 24 hours, an altered cytoplasm (Figure 6b) with clear zones was observed, indicating a possible C₁₁₋₁₃ intracellular accumulation and a high amount of extracellular material. After 48 h (Figure 6c), the cytoplasm was condensed and the bacterial wall was disrupted suggesting a high proportion of non viable cells (Figure 6C).

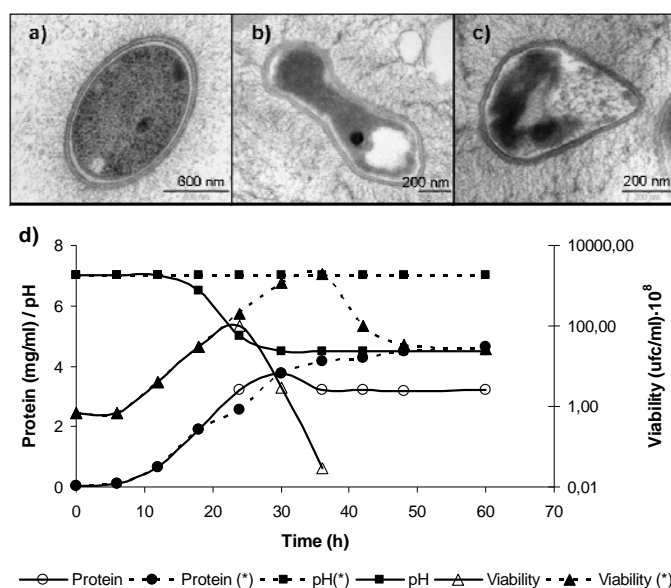


Figure 6: ME photomicrographs of *S. detergens* control in TSA (a) and after 24 (b) and 48 h (c) growth in MCA medium. Biomass and cell viability in batch (—) and feed-batch cultures (.....) (d)

To confirm this observation a cell viability study by colony plate count was carried out with feed-batch and batch cultures (Figure 6d). As described previously (Figure 4), exponential growth continued until 30 h, but a marked decrease in viability was observed after 24 h of growth, associated with a marked decrease in medium pH from 7

to 5. In the feed-batch culture, urea was added (0.88g/L) after 24 and 48 h, and the acidic pH was neutralized to 7 with 1N NaOH. As a result, exponential growth continued until 60 h and only a small decrease in viability was observed after 42 h of culture. Consequently, the time for exponential growth and BS production was longer, resulting in 4.7 mg/mL biomass and 466 mg/L of organic extract (obtained with prior supernatant lyophilization). When a feed-batch culture was used, organic extract production increased from 400 to 466 mg/L, representing a 6.9-fold increase with respect to the initial production with S-MSM medium (Table 2).

BS compete with surfactants of petrochemical origin in three aspects: cost, functionality, and production capacity to meet the needs of the intended application [30]. Any attempt to increase BS yields requires an optimal addition of media components and selection of the optimal culture conditions to induce the maximum productivity [4]. However, in the cosmetic or pharmaceutical sectors, higher price dimensions are standard, and therefore, BS can easily compete.

3.1.8. Organic extract solubility

Solubility was studied with the most frequently used organic solvents. Organic extracts were dissolved with some difficulty in water and ethyl acetate, sonication being necessary to obtain a brown translucent dispersion. In contrast, they were rapidly dissolved with methanol or ethanol, while being only partially soluble in chloroform and *n*-hexane, resulting in a cloudy dispersion. There was almost no solubility in acetonitrile.

The water solubility of the surfactant can be used to obtain a rough approximation of its HLB value [31]. When a complete organic extract was dissolved in water a translucent dispersion was obtained corresponding to an HLB of 11-13. TLC of the complete organic extract revealed many compounds. After extract purification, two fractions, apolar (A) and polar (P), were obtained. Fraction A was highly apolar and consisted of a phospholipid mixture, phosphatidylethanolamine being the most abundant compound [14]. Upon dissolving, a milky dispersion was obtained after vigorous agitation, and it corresponded to an HLB of 8-6. Fraction P, a more polar nitrogenated lipid, also consisted of a mixture of BS. This fraction dissolved easily in water giving a transparent brown solution, which corresponded to an HLB of 14-20 [32]. Fraction P was initially characterized as a lipopeptide but the absence of amino acid components in its acid digestion led us to discard this possibility. The presence of nitrogen in its polar head, its physicochemical properties and possible molecular weight, and the taxonomic position of the producer bacteria suggest that this compound could form part of the Flavolipid family of the Siderophore group [33].

In summary, a modified mineral MCA medium has been developed, containing urea and two carbon sources for the co-metabolic BS production by *S. detergens*. Additionally, the growth strategy was modified with 24 and 48 h feed-batch cultures and BS extraction was optimized. These changes induced a 6.9-fold increase in production (Table 2).

3.2. Physicochemical characterization

Solutions and dispersions of the complete fraction and purified fractions A and P were studied in more detail. The samples were prepared by weighing the powder and adding water to the initial concentration. The samples were then vortexed and sonicated at room temperature. Dilutions were made from these stock solutions by adding water or the appropriate aqueous solutions. The aggregates formed were characterized by determining their hydrodynamic radii and z-potential. Concentrated solutions were also examined by X-Ray scattering to gain a deeper understanding of the structure of the aggregates. Finally, adsorption from solution was also examined as a function of pH.

3.2.1 Hydrodynamic radii and ζ -potential.

Concerning the ζ -potential results, no dependence was apparent for the different samples as a function of concentration (results not shown). All values fell within -57 ± 9 mV, which corresponds to electrostatically stabilized particles [32]. On the contrary, the size of the particles was independent of concentration only for the polar fraction and the complete fraction below 10g/L (Figure 7). The dispersions of the apolar fraction were too turbid to be measured at concentrations above 0.1 g/L and the decrease in radius was only apparent and caused by the excess of dispersion. One would expect the size to be independent of concentration for kinetically stable vesicles [34], which could be the case of the polar and complete fraction and the apolar fraction below 0.01 g/L. The low concentration at which samples from the apolar fraction still produced a reasonable scattered intensity for measurement was somewhat surprising, particularly if we compare this to the critical micellization concentration CMC obtained from the stabilization of the solution surface tension: 0.2 to 0.001 g/L. This could mean that the molecules responsible for the decrease of the surface tension and the objects measured by light dispersion may be different.

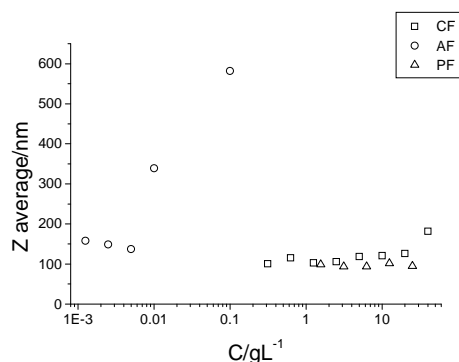


Figure 7: Z average as a function of concentration for the three fractions studied. The measurements were performed at 25°C (complete fraction □; apolar fraction ○; polar fraction △).

The negative ζ -potential agrees with the observation of titrable protons with a pKa of 5.2 [14]. Titration of the samples with acid did show neutralization of the ζ -potential (Figure 8 a) and systematic increases in size (Figure 8 b). The increase in size occurs close to the point where the ζ -potential decreases in absolute value below 20 mV, agreeing with the classical view of electrostatic stabilization. Therefore, the growth can be attributed to flocculation of smaller entities.

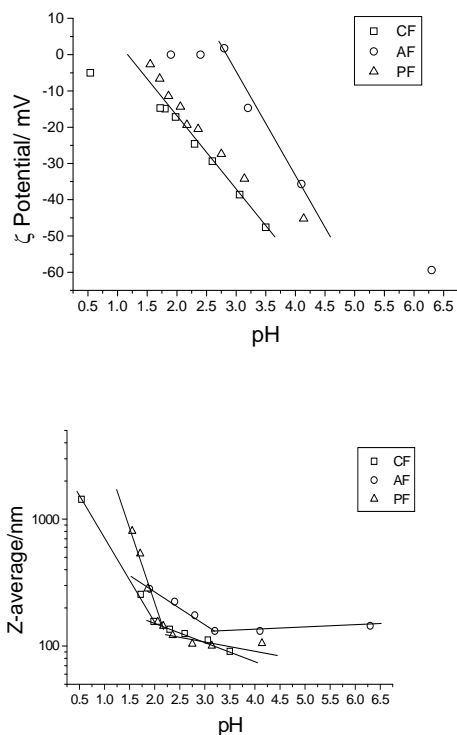


Figure 8: a) ζ -potential as a function of pH for the three fractions studied. The measurements were performed at 25°C. Initial sample concentration was 5g/L for the complete fraction, 0.005g/L for the apolar fraction and 1.6g/L for the polar fraction (complete fraction \square ; apolar fraction \circ ; polar fraction Δ). b) Z average as a function of pH for the three fractions studied. The measurements were performed at 25°C. The concentrations are as in Figure 7 (Complete fraction \square ; apolar fraction \circ ; polar fraction Δ).

A significant difference between the different fractions is the pH at which neutralization and growth occur. While the apolar fraction lost most of its charge at pH=3, the other two fractions maintained a significant proportion up to pH=2. This is unexpected, considering we obtained a pKa value of 5.2 from the titration, which would imply that the Z-potential did not decrease until the proportion of charged groups was below 1% and 0.1%, respectively. A possible explanation for this observation could come from a difference in the measured pKa and the intrinsic pKa of the charged groups, that is, a pKa shift due to aggregation. It is tempting to attribute the pKa value observed from titration to the presence of carboxylic acid groups. However, the ζ -potential titration suggests groups with an intrinsic pKa of 1-3, a reasonable candidate being phosphate or citrate. Indeed, strong pKa shifts have been observed for different phospholipids, either zwitterionic or with a net charge [34-36]. The remaining difference between the intrinsic pKa of the apolar fraction and the other two fractions could be due to either a real difference between the polar heads or to remaining differences in aggregation between single and double chain phosphates.

3.2.2. Small-angle X-ray scattering and polarized microscopy

More details about the aggregation were obtained from polarizing light microscopy and small angle x-ray scattering. The complete and apolar fractions showed similar results with both techniques. The polarizing optical microscopy revealed the formation of threaded structures and Maltese crosses, both characteristic of lamellar liquid crystalline phases [37] (Figure 9). The SAXS results were also compatible with bilayer structures.

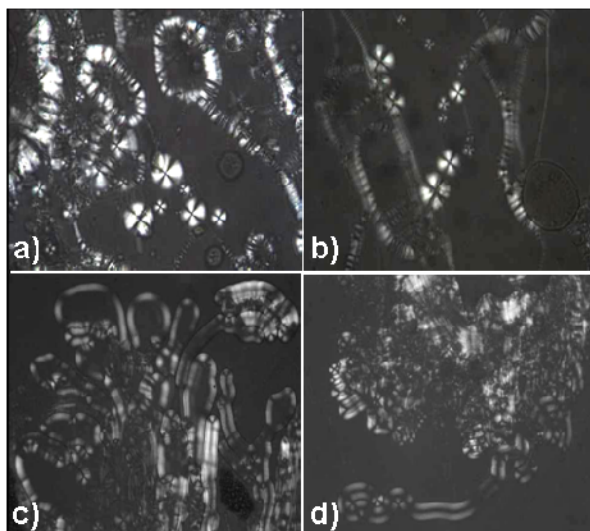


Figure 9: Crossed polarizing optical microscopy of water penetrated samples at 25°C. Upper images (a,b) correspond to the complete fraction with 848 while lower images (c,d) correspond to the apolar fraction. The width of the pictures corresponds to 848 (a,b) and 212 μm (c,d).

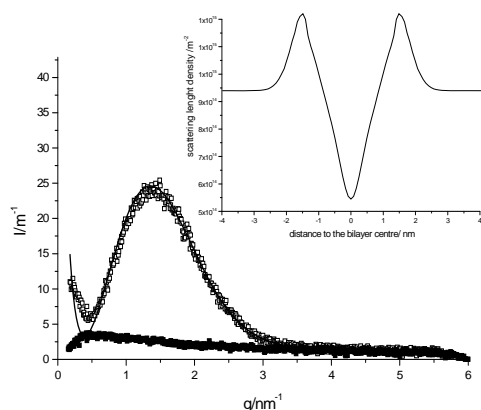


Figure 10: X-ray scattering intensity as a function of dispersion vector modulus q measured at 25°C. The concentration of the apolar fraction (open symbols) was 10 g/L and that of the polar fraction 4 g/L (full symbols). For the apolar fraction the curve corresponds to the MCG model fitting and the insert corresponds to the scattering length density across the bilayer for this model.

Figure 10 shows the intensity obtained as a function of the dispersion vector at 25°C, together with the fit of a bilayer model for the apolar fraction (see the experimental section for details of the fitted model) [18,19]. In the inset the scattering length density as a function of the distance from the center of the bilayer is also shown. The scattering length density of hydrocarbon is lower than that of water while that of the polar groups is typically higher. The hydrophobic core of the bilayer has a thickness of 1.5 nm, which could correspond to interdigitated hydrocarbon chains with 14-18 carbon atoms. Increasing the temperature to 37°C did not result in any significant differences in scattering intensity and bilayer thickness, which was 5.0 nm. This bilayer was thicker than those obtained from dirhamnolipids [6] and comparable to those obtained from

classic phospholipids. The electronic profile, however, shows a more extended polar head region than that of classic phospholipids [18], possibly due to the presence of large polar groups. On the other hand, interdigitation is thought to contribute to pore formation in phospholipid bilayers and consequently to the hemolytic and bactericidal activity of surfactants [38].

The polar fraction did not show any significant textures when observed by polarizing light microscopy, except in the dry state when crystals were formed at room temperature. The SAXS measurements were significantly different from those of the other two fractions. The intensity was considerably lower and appreciable scattering was only observed at small q . The fitting of globular models did not lead to any significantly good fitting for any set of reasonable parameters. The low intensity itself may be partly the result of the higher CMC and also due to partial cancellation of intensity from above and below water electron densities. No further details could be elucidated for this sample due to this low intensity and high noise of the SAXS.

While a difference in ζ -potential behavior as a function of pH was observed between the apolar fraction and the other two fractions, in the more concentrated regime observed by PLM and SAXS the different behavior corresponded to the polar fraction. This must be a consequence of the different techniques sensing different properties and the different fractions containing varying proportions of some of the active molecules. While the most soluble part of the complete fraction provides a ζ -potential that can be brought to zero only at pH=1.2, the less soluble is already cancelled at pH=2.9. This can be explained by considering that the more soluble components are single chain compounds while the less soluble are double chain compounds. The double chain components induce the formation of vesicles and lamellar liquid crystalline phases, which were detected both in the complete and apolar fractions. The pKa shift induced by aggregation may be stronger for a flatter structure like those formed in the apolar and complete fractions, compared to the smaller structures formed by the polar fraction.

3.2.3 Surface tension characterization

To further characterize the physicochemical behavior of the complete fraction, the surface tension of solutions at different pH were measured as a function of concentration. The results are plotted in Figure 11. Three pH conditions were studied: buffering at pH=3 (below the titration pKa=5.2), pH=7 (above the titration pKa) and at the natural pH of the solutions (pH ranging from ~6 at low concentration to 3.5 at high concentration).

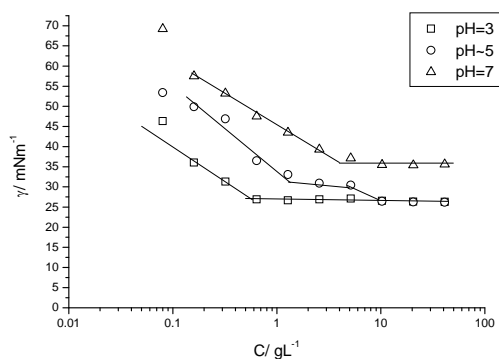


Figure 11: Surface tension as a function of surfactant concentration measured at 25°C and three pH conditions by means of the ring method for the complete fraction.

The higher the pH, the higher the concentration at which the surface tension stabilizes. This observation is consistent with the polar heads of the surfactant being pH-sensitive, with the negative charge of the acid groups increasing along with the pH. The higher the charge the higher the solubility of the monomer and, therefore, the higher the concentration at which the surface tension stabilizes, presumably due to the formation of micelles or vesicles [31]. The disappearance of the intermediate plateau at pH=7 and pH=3 deserves further comment. Our group previously attributed this intermediate plateau to the presence of some protein on which micellization took place before reaching the water monomer solubility [14]. These differences can be understood on the basis of the different charge behavior of the surfactant molecules and protein. At neutral pH the surfactant molecules were mainly negatively charged, their aqueous solubility had increased and, at the same time, the affinity for the protein had decreased. The decreased affinity can be due to the increased global negative charge of the protein, which would account for a net repulsion of the surfactant to the protein. At acidic pH the protein charge should turn more positive but the main effect would be a decreased solubility of the monomer and a consequent decrease of the critical aggregation concentration to forming vesicles. Even if some aggregation occurs on the protein, the effect can no longer be detected because the protein-surfactant aggregates would be less surface-active than the surfactant aggregates.

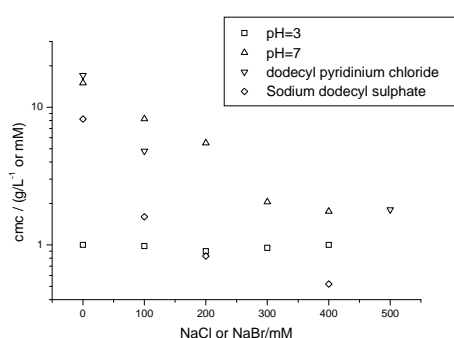


Figure 12: Effect of NaCl addition on the surface tension cmc at neutral (up triangles) and acidic conditions (squares) measured at 25°C. The CMC of dodecyl pyridinium chloride (down triangles) and sodium dodecyl sulfate (diamonds) from the literature [31] as a function of NaCl concentration at 25°C are also shown for comparison. The CMC values are given in g/L in the case of the biosurfactants and mM in the case of the literature values.

The effect of ionic strength on the CMC at pH=3 and pH=7 is reasonable for nonionic molecules in the first case and ionic molecules in the second. The CMC at low pH is independent of ionic strength (n.b. we can only compare within a limited range of ionic strength because the initial point for acquiring the desired pH already has a significant ionic strength). In the case of neutral pH, the ionic strength has a significant decreasing effect on the CMC, as found in ionic surfactants [31]. In Figure 12 we compare the influence of ionic strength on the BS CMC at two pH values with the data of an anionic and cationic surfactant from the literature. These observations agree with the general behavior exposed above concerning the different charging situations at different pH.

CONCLUSIONS

Successful biosurfactant commercialization partly depends on bioprocess economics and knowledge of BS properties [11]. In the present study, surfactant production by the new BS producer, *S. detergens*, has been improved by a systematic one-factor-at-a-time screening approach focusing on medium composition, carbon-feed strategy/pH control and downstream processing. The developed MCA medium contained urea and glucose plus C₁₁₋₁₃ to allow the co-metabolism requisite for bacterial BS production. The use of two different carbon sources for BS production is not frequent [22-25], but in the present case it seemed to be essential. The use of glucose alone led to bacterial growth but without BS production, while no bacterial growth was observed when only n-alkane was added to the media. The results obtained with this medium showed that BS production is growth-associated. Extraction after lyophilization and feed-batch culture with pH control increased BS production 6.9-fold.

The different fractions obtained by purification of the crude extract behaved differently according to their polarity. All fractions produced negatively charged particles that lost their charge upon acidification, with proton affinities compatible with phosphate as one of the components of the head-group. The complete extract and polar fraction showed similar behavior, while the apolar fraction was neutralized at a higher pH. Upon charge neutralization, all fractions showed particle growth, probably by flocculation induced by the absence of charge stabilization. The complete extract and the apolar fraction formed lamellar phases with a bilayer thickness of around 5.0 nm, about 1.5 nm being occupied by the hydrophobic moieties. This suggests the presence of large polar heads and interdigitation of the hydrophobic moieties [18]. The low scattering signal obtained from the polar fraction must be related with high monomer solubility combined with low aggregate contrast. In contrast with the electrokinetic studies, SAXS showed a similarity in behavior of the complete extract and the apolar fraction. The surface tension at controlled pH can be interpreted in terms of headgroup charge changes due to the presence of weak acid protons producing predominantly charged species at neutral pH and species with no net charge at acidic pH.

Acknowledgements:

We are grateful to J. Caelles of the SAXS-WAXS service at IQAC for technical assistance with SAXS measurements. I. Carrera is acknowledged for experimental help with the physicochemical characterization. Financial support from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness through projects CTQ2007-66244 and CTQ2010-14897 and Generalitat de Catalunya through Grant 2009SGR1331 is gratefully acknowledged.

References

- [1] J.D. Van Hamme, A. Singh, O.P. Ward, *Biotech. Adv.* 24 (2006) 604.
- [2] I.D. Bushnell, H.E. Hass, *J. Bacteriol.* 41 (1941) 653.
- [3] M. Pacwa-plociniczak, G.A. Plaza, Z. Piotrowska-Seget, S.S. Cameotra *Int. J. Mol. Sci.* 12, (2011) 633.
- [4] S. Mukherjee , P. Das , R. Sen *Trends Biotechnol.* 24 (2006) 509.

- [5] A. Pinazo , M. Angelet , R. Pons , M. Lozano , M.R. Infante , L. Pérez L. Langmuir 25 (2009) 7803.
- [6] M. Sánchez , F.J. Aranda , M.J. Espuny , A. Marques , J.A. Teruel J.A., A. Manresa , A. Ortiz J. Colloid Interface Sci. 307 (2007) 246.
- [7] S. Joshi, S. Yadav, A. Nerurkar, A.J. Desai J. Microbiol. Biotechnol. 17 (2007) 313.
- [8] M.O. Ilori, S.A. Adebusoye, A.C. Ojo World J. Microbiol. Biotechnol. 24 (2008) 2539.
- [19] C. Sivapathasekaran, S. Mukhrjee, R. Sen. Biotechnol. J. 5 (2010) 1060.
- [10] L.M. San Anna, G.V. Sebastian, E.P. Menezes, T.L.M. Alves, A.S. Santos, N. Pereira Jr., D.M.G. Freire, Brazilian J. Chem Engin. 19 (2002) 159.
- [11] M. Nitscke, G.M. Pastore, Bioresour. Technol. 97 (2006) 336.
- [12] S. Mukherjee, P. Das, C. Sivapathasekaran, R. Sen, Biochem. Eng. J. 42 (2008) 245.
- [13] T.B. Lotfabad, M. Shourian, R. Roostaazad, A.R. Najafabadi, M.R. Adelzadeh, K.A. Noghabi , Colloids Surface B Biointerfaces 69 (2009) 183.
- [14] C. Burgos-Díaz, R. Pons, M.J. Espuny, F.J. Aranda, J.A. Teruel, A. Manresa, A. Ortiz, A.M. Marqués, J. Colloid Interface Sci. 361 (2011) 195.
- [15] A.M. Marqués, C. Burgos-Díaz, F.J. Aranda, J.A. Teruel, A. Manresa, A. Ortiz, M. Farfan, Inter. J. Syst. Evol. Microbiol. doi: 10.1099/ijs.0.036707-0 (2012).
- [16] D. Orthaber, A. Bergmann, O. Glatter, J. Appl. Cryst. 33 (2000) 218.
- [17] L. Pérez, A. Pinazo, M.R. Infante, R. Pons, J. Phys. Chem. B 111 (2007) 11379.
- [18] G. Pabst, M. Rappolt, H. Amenitsch, P. Laggner, Phys. Rev. E 62 (2000) 4000.
- [19] M.C. Morán, A. Pinazo, P. Clapés, M.R. Infante, R. Pons, J. Phys. Chem. B 109 (2005) 22899.
- [20] R.G. Laughlin, The Aqueous Phase Behavior of Surfactants, Academic Press, London, 1994.
- [21] T. Morita, Y. Ishibashi, N. Hirose, K. Wada, M. Takahashi, T. Fukuma, T. Imura, H. Sakai, M. Abe, D. Kitamoto, Biosci. Biotechnol. Biochem. 75 (2011) 1371.
- [22] I.N.A. Van Bogaert, K. Saerens, C. De Muynck, D. Develter, W. Soetaert, E.J. Vandamme, Appl. Microbiol. Biotechnol. 76 (2007) 23.
- [23] A. Daverey, K. Pakshirajan, Food Res. Int. 42 (2009) 499.
- [24] S. Pansiripat, O. Pornsunthorntawe, R. Rujiravanit, B. Kitiyanan, P. Somboonthanate, S. Chavadej, Biochem. Engin. J. 49 (2010) 185.
- [25] F.M. Bento, C.C. Gaylarde, Int. Biodeter. Biodegrad. 38 (1996) 31.
- [26] E. Haba, M.J. Espuny, M. Busquets, A. Manresa, J. Appl. Microbiol. 88 (2000) 379.
- [27] L. Rodrigues, J. Teixeira, R. Oliveira, H.C. van der Mei, Process Biochem. 41 (2006) 1.
- [28] R. Thavasi, V.R.M. Subramanyam Nambaru, S. Jayalakshmi, T. Balasubramanian , I.M. Banat, Mar Biotechnol. 11 (2009) 551.
- [29] M.S. Kuyukina, I.B. Ivshina, J.C. Philp, N. Christofi, S.A. Dunbar, M.I. Ritchkova, J. Clin. Method. 46 (2001) 149.
- [30] J.M. Luna, R.D. Rufino, C.D.C. Alburquerque, L.A. Sarubbo, G-M Campos-Takaki, Int. J. Mol. Sci. 12 (2011) 2463.
- [31] M.J. Rosen, Surfactants and Interfacial Phenomena. John Wiley, New Jersey, USA (2004).
- [32] W.A. Adamson, in: Physical Chemistry of Surfaces 5th edition, p.218. John Wiley and Sons, New York, 1990.
- [33] G. Soberón-Chávez, R.M. Maier, in: G. Soberón-Chavez (Ed.), Springer-Verlag, Berlin, 2011, p.1.

- [34] N. Lozano, A. Pinazo, C. La Mesa, L. Pérez, P. Andreozzi, R. Pons, J. Physical Chem. B 113 (2009) 6321.
- [35] E.E. Kooijman, K.M. Carter, E.G. van Laar, V. Chupin, K.N.J. Burger, B. de Kruijff, Biochem. 44 (2005) 17007.
- [36] M.R. Moncelli, L. Becucci, R. Guidelli. Biophys. J. 66 (1994) 1969.
- [37] F.B. Rosevear, J. Soc. Cosmetic Chemists, 19 (1968)581.
- [38] T-S. Nguyen, P.M.M. Weers, V. Raussens, Z. Wang, G. Ren, T. Sulchek, P.D. Hoeplich Jr., R.O. Ryan, BBA-Biomembranes 1778 (2008) 303.

ARTÍCULO 4

Propiedades Biológicas de los Biotensioactivos Producidos por *Sphingobacterium detergens*.

César Burgos-Díaz¹, Raquel Martín-Venegas², Verónica Martínez²,
Carolina Emilia Storniolo², Rut Ferrer² y Ana M. Marqués¹.

¹ Departamento de Microbiología, Facultat de Farmàcia, Universidad de Barcelona. 08028 Barcelona, España.

² Departamento de Fisiología, Facultat de Farmàcia, Universidad de Barcelona. 08028 Barcelona, España.

(Resultados no publicados)

3.4. Propiedades Biológicas de los Biotensioactivos Producidos por *Sphingobacterium detergens*.

(Resultados no publicados)

Resumen

Para conocer las posibles aplicaciones de los biotensioactivos producidos por *S. detergens* en biomedicina y cosmética, se ha estudiado el efecto de los biotensioactivos sobre diferentes líneas celulares. Para ello se estudió la actividad hemolítica de las dos fracciones A y B (apolar y polar), provenientes de la mezcla de biotensioactivos producidos por *S. detergens*. Tanto la fracción A como la B presentaron actividad hemolítica, 100% y 83% respectivamente. Además se observó que esta actividad es dependiente de la concentración de biotensioactivo, a mayor concentración de BT mayor actividad hemolítica. Las dos fracciones presentaron diferentes comportamientos en las curvas de liberación de hemoglobina con respecto a la concentración de biotensioactivo. La fracción A presentó un comportamiento lineal y la fracción B un comportamiento sigmoidal. El comportamiento diferente obtenido con las dos fracciones podría indicar diferencias con respecto a los mecanismos de cómo ocurre la hemólisis para cada fracción.

Además, se ha estudiado el posible efecto irritante del biotensioactivo sobre la piel, utilizando dos líneas celulares, fibroblastos (3T3) y queratinocitos (HaCaT), y dos métodos para determinar citotoxicidad, captación de rojo neutro (NRU) y reducción de la sal tetrazolio (MTT). Se determinó que la fracción B es menos irritante que la fracción A. Además, las dos fracciones presentaron valores de IC₅₀ (concentración de biotensioactivo que provoca la disminución de la viabilidad celular en un 50%) mayores que el tensioactivo de referencia dodecil sulfato de sodio (SDS). El ensayo del NRU presentó menos variabilidad que el ensayo del MTT a la hora de determinar la acción irritante de los biotensioactivos.

También se ha estudiado el efecto de las dos fracciones sobre la proliferación de células epiteliales de cáncer de colon (Caco-2), donde se observó que tanto la fracción A como la B inducen una antiproliferación de dichas células y que esta inhibición del crecimiento celular es debida principalmente a una inducción de la apoptosis y no a un efecto citotóxico del producto. Las dos fracciones, A y B, indujeron un 44% y 75% de apoptosis en células caco-2 respectivamente, siendo la fracción B más efectiva en inducir la apoptosis en esta línea celular.

Finalmente se estudió la capacidad antimicrobiana de los biotensioactivos mediante la realización de la concentración mínima inhibitoria, donde se determinó que el extracto crudo y sus correspondientes fracciones A y B, no presentan capacidad inhibitoria contra los microorganismos y a las concentraciones ensayadas. De acuerdo con estos resultados se puede decir que el biotensioactivo producido por la cepa 6.2 S es menos toxico que el dodecil sulfato de sodio (SDS) y que la mezcla de biotensioactivos producida por *S. detergens* presenta ciertas propiedades que podrían ser beneficiosas para su aplicación en farmacia.

Propiedades biológicas de una mezcla de biotensioactivos producidos por *Sphingobacterium detergens*. (Resultados no publicados)

César Burgos-Díaz¹, Raquel Martín-Venegas², Verónica Martínez², Carolina Emilia Storniolo², Rut Ferrer² y Ana M. Marqués¹.

¹ Departamento de Microbiología, Facultat de Farmàcia, Universidad de Barcelona. 08028 Barcelona, España.

² Departamento de Fisiología, Facultat de Farmàcia, Universidad de Barcelona. 08028 Barcelona, España.

Resumen

Los tensioactivos constituyen una clase de compuestos químicos que están presentes en la mayoría de preparaciones farmacéuticas, cosméticas y productos de limpieza. Debido a sus múltiples aplicaciones, el uso de estos productos puede comportar riesgos derivados de su efecto irritante y contaminación ambiental. Por esta razón se evaluaron las propiedades biológicas de los biotensioactivos producidos por la cepa 6.2S, fracción apolar (FA) y fracción polar (FB), tales como actividad antibacteriana, lítica y antiproliferativa.

La mezcla de biotensioactivos producidos por *Sphingobacterium detergens* presentó interesantes propiedades biológicas. Ambas fracciones, A y B, presentaron actividad hemolítica, 100% y 83% de hemólisis respectivamente. Las dos fracciones del biotensioactivo inducen la apoptosis sobre células epiteliales derivadas de un adenocarcinoma de colón (Caco-2), obteniéndose con la fracción A un 44% de células apoptóticas y 75% con la fracción B. Las dos fracciones del biotensioactivo presentaron valores de IC₅₀ mayores que el tensioactivo de referencia SDS, y siendo por tanto menos irritantes que el tensioactivo de síntesis química.

1. Introducción

Existe un interés creciente en el estudio de las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los biotensioactivos debido a sus potenciales aplicaciones en distintos sectores de la industria (Banat *et al.*, 2000, Dasai y Banat, 1997). Debido a una serie de características, en particular su alta biodegradabilidad y compatibilidad con el medio ambiente, el uso de biotensioactivos es recomendable en comparación a la utilización de tensioactivos sintetizados químicamente. Algunos de estos compuestos desarrollan importantes actividades biológicas, entre las que se destacan su acción antimicrobiana, actividad hemolítica y propiedades antitumorales (Lang y Waner, 1993; Zaragoza *et al.*, 2010; Seydlová y Svobodová, 2008). Es por esta razón que en la actualidad existe una intensa actividad investigadora dirigida a la identificación y caracterización de nuevos biotensioactivos (Rodrigues *et al.*, 2006).

Diversas investigaciones se han centrado sobre la actividad hemolítica que presentan los biotensioactivos, tales como di-ramnolípidos (Sánchez *et al.*, 2010), lipopéptidos (Aranda *et*

al., 2005), trealosalípidos (Zaragoza *et al.*, 2009). Los biotensioactivos al ser de naturaleza anfifílica se reparten en las membranas biológicas alterando sus propiedades fisicoquímicas y función (Ortiz *et al.*, 2009). Un ejemplo de estas alteraciones es la permeabilización y/o disrupción de las membranas de los eritrocitos (Zaragoza *et al.*, 2009). Esto puede ocurrir a diferentes concentraciones de biotensioactivo, dependiendo de la naturaleza del compuesto y características fisicoquímicas, principalmente de la CMC (Zaragoza *et al.*, 2010). Esta propiedad que presentan la gran mayoría de los tensioactivos de origen químico y biológico, puede ser en cierta parte una desventaja al momento de referirse a las posibles aplicaciones del biotensioactivo. Por esta razón es necesario realizar investigaciones al respecto para saber por ejemplo si los compuestos en estudio presentan actividad hemolítica, en que rangos de concentraciones se produce y los mecanismos de cómo ocurre, y sabiendo esta información intentar minimizar este efecto.

Por otro lado, algunos biotensioactivos, también pueden presentar actividad antimicrobiana. Estos compuestos tensioactivos tienen la capacidad de

interaccionar y perturbar las membranas citoplasmáticas de los microorganismos, produciendo la lisis celular, esta propiedad depende principalmente de la naturaleza y estructura de los tensioactivos (Keifer *et al.*, 2004; Ahlstrom *et al.*, 1999). Esta propiedad ha sido demostrada por varios biotensioactivos, principalmente por los lipopéptidos y glicolípidos. Ejemplos de éstos son la surfactina de *Bacillus subtilis* y los ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* (Lin, 1996). El lipopéptido cíclico, la surfactina, presenta una excelente actividad antibiótica, es anticoagulante y hemolítico, y además tiene propiedades antivírica. Por otro lado una mezcla de ramnolípidos producidos *P. aeruginosa* AT10 y *P. aeruginosa* 47T2, también han presentado actividad antibacteriana contra diferentes microorganismos (Haba *et al.*, 2003; Ábalos *et al.*, 2001).

Recientes estudios han concluido que algunos biotensioactivos pueden presentar actividad antitumoral, inhibiendo la proliferación celular de células cancerígenas por la inducción de la muerte celular programada o apoptosis. Esta propiedad ha sido demostrada en diversos biotensioactivos y compuestos de naturaleza anfipática, tales como soforolípidos (Chen *et al.*, 2006), esfingolípidos (Minamino *et al.*, 2003), y surfactina (Seydlová y Svobodová; 2008). Algunos fosfolípidos también han presentado propiedades anticancerígenas, donde se ha demostrado la efectividad de algunos de estos compuestos, tales como la fosfatidilcolina y la miltefosina en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer (Jansen *et al.*, 2004 y Terwogt *et al.*, 1999).

El conocimiento detallado de las propiedades biológicas de un tensioactivo determinado es importante, ya que, esto permitirá la selección de compuestos para sus usos específicos en función de las propiedades deseadas. En el presente estudio se determinaron las propiedades biológicas de la mezcla de biotensioactivos producidos por *Sphingobacterium detergens*, estudiando las posibles propiedades antiproliferativas en células Caco-2, actividad hemolítica, antimicrobiana, y los posibles efectos citotóxicos sobre líneas celulares de fibroblastos y queratinocitos.

2. Materiales y Métodos

2.1 Producción de biotensioactivo por *S. detergens*

Para la producción de biotensioactivos por *S. detergens* se utilizó un medio mineral (MCA) con la siguiente composición (g/L): KH_2PO_4 , 1; K_2PO_4 , 2; $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 0,88; CaCl_2 0,01; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5; KCl , 1,0; solución de oligo elementos, 0,05 mL (Marqués *et al.*, 2009), utilizando como fuente de carbono 1,5% (V/V) C_{11-13} (C_{10} 9,3%, C_{11} 32,4%, C_{12} 31,3%, C_{13} 26,7%) y 2% (V/V) de inóculo. El inóculo fue preparado en una solución de Ringer $\frac{1}{4}$, y ajustando la suspensión bacteriana de *S. detergens* (cultivo de 16 horas en placa de TSA) a un valor de 2 de la escala de McFarland. Los cultivos fueron incubados a 30°C en matraces Erlenmeyer de 1L con 200 mL de medio basal durante 24-48 h y 150 rpm de agitación.

2.1 Extracción orgánica del biotensioactivo

El biotensioactivo fue recuperado del sobrenadante del medio de cultivo después de eliminar las células por centrifugación a 8000xg en una centrifuga Avanti™ J-20 xp (Bekman Coulter™, USA) por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue liofilizado y posteriormente extraído 3 veces con igual volumen de una mezcla de acetato de etilo/metanol (8:1). La fase orgánica fue filtrada con sulfato de amonio anhidro para eliminar restos de agua y concentrada por un rotavapor con vacío (Büchi, Switzerland), obteniéndose de esta manera el extracto crudo para el análisis.

2.3 Purificación y fraccionamiento del extracto orgánico en fracción A y fracción B

Para purificar el extracto crudo se utilizó una modificación del método descrito por Van-Deckert. Se realizó una cromatografía en fase reversa con una columna (0,4-10cm) de silica gel (Kieselgel Merck type 9385 230-400 mesh, 60 Å, Sigma-Aldrich). El extracto crudo disuelto en 1mL de metanol y 1mL de acetato de amonio (300mM en agua) fue aplicado a la columna. La fracción que no es retenida por la columna (no fosfolípidos) se recolectó y se denominó como Fracción B. Posteriormente se lavó la columna con 6mL de agua mili-Q para eliminar impurezas y sales. Para la elución de

los fosfolípidos retenidos por la columna (Fracción A) se adicionó 1mL de metanol y 8mL de una solución cloroformo/metanol (1:1 v/v). Las fracciones A y B fueron secadas bajo un flujo de nitrógeno y se observaron por TLC tras el revelado con diferentes reveladores, ninhidrina, azul de molibdeno, yodo y reactivo de Molish.

2.4 Análisis de actividad hemolítica del biotensioactivo

Para la determinación de la actividad hemolítica se utilizó un método descrito por Ortiz *et al.*, 2008. Para ello se utilizaron eritrocitos de conejo, preparando una solución de trabajo a partir de los glóbulos rojos concentrados justo antes de realizar los experimentos. Las células fueron lavadas dos veces con tampón (150mM NaCl, 5mM Hepes, pH 7,4), y finalmente se resuspendieron en el mismo tampón antes de su uso. Todas estas operaciones se realizaron a 4°C. Para las medidas de liberación de hemoglobina, se diluyó el concentrado de eritrocitos hasta obtener una suspensión con una $A_{540}=1$. La liberación de hemoglobina se determinó en el sobrenadante después de incubar los eritrocitos con diferentes concentraciones del BT por debajo de la CMC (0 - 0,2 g/L Fracción A; y 0-3 g/L Fracción B), y midiendo la absorbancia a 540 nm después de sedimentar las membranas por centrifugación durante 2 minutos. La temperatura se mantuvo a 37°C y la cantidad de hemoglobina total se estableció lisando los eritrocitos con agua destilada.

2.5 Determinación de la toxicidad celular producida por los biotensioactivos sobre fibroblastos y queratinocitos

El efecto del BT (fracción A y fracción B) sobre la toxicidad celular, fue estudiado con dos líneas celulares, fibroblastos (3T3) y queratinocitos (HaCaT) humanos. Las dos líneas celulares fueron cultivadas en un medio RPMI 1640 (BioWhittaker-Lonza, Switzerland) suplementado con 10% suero fetal bovino, 2mM L-glutamina y una mezcla 1% de penicilina (10,000U/mL)/ estreptomycin (10,000 µg/ml) a 37°C y 5% CO₂ por 24hrs. Transcurrido el tiempo de incubación los cultivos fueron expuestos a diferentes concentraciones de biotensioactivo (Fracción A, 0,06-0,4 g/L; y Fracción B, 0,9-6 g/L) disuelto en medio RPMI suplementado con 5% de suero fetal bovino,

2mM glutamina y una mezcla 1% de una mezcla de antibióticos. Las placas fueron incubadas por 24h a 37°C y con 5% CO₂. También se utilizó un control de dodecil sulfato de sodio (SDS) 1 %, tensioactivo generalmente utilizado como referencia en los estudios de irritabilidad dérmica (Lee y Maibach, 1995; Effendy y Maibach, 1996).

Captación del Rojo Neutro (NRU):

Fundamento: El colorante rojo neutro (3 – amino – 7 – dimetilamino – 2 – metilfenazina, Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU) es un colorante catiónico débil que atraviesa la membrana celular pasivamente por un proceso de difusión no iónica y se une a la matriz intracelular de los lisosomas. Las células muertas o dañadas por un aumento de la permeabilidad de las membranas, pueden provocar la liberación del colorante o evitar su acumulación (Filman *et al.*, 1975), después de los procesos de lavado y fijación. De este modo, se considera que la cantidad de colorante retenido es directamente proporcional al número de células viables.

Metodología: Después del tratamiento con el biotensioactivo, el sobrenadante del medio fue aspirado y se adicionó 100 µl de la solución NRU por pocillo (50 µg/ml en el medio de cultivo). Después de tres horas de incubación a 37°C y 5% CO₂, el medio fue aspirado y las células fueron lavadas dos veces con PBS. Luego se adicionó una solución que contenía 1% de ácido acético y 50% de etanol absoluto en agua destilada (100µl por pocillo) para extraer el colorante. Después de 10 minutos en agitación. Se midió la absorbancia a una densidad óptica de 550 nm. Se considera que la cantidad de colorante retenido es proporcional al número de células viables.

Ensayo de reducción del difeniltetrazolio (MTT):

Fundamento: Es un ensayo colorimétrico basado en la incubación de células con 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU), una sal soluble de color amarillo. Las células captan el MTT por endocitosis y lo reducen a un formazán insoluble de color azul. Aunque siempre se ha considerado que la reducción del MTT a formazán tiene lugar en las mitocondrias, también se ha descrito su reducción en otros

compartimientos celulares (Liu *et al.*, 1997). Las células muertas o dañadas no puede metabolizar esta sal. Como en el NRU, en condiciones estables y controladas, se considera que la cantidad de MTT reducida es proporcional a la viabilidad.

Metodología: después del tratamiento del BT, el medio fue aspirado y se adicionó 100µl por pocillo de la solución MTT (0,5 µg/ml en PBS y diluido 1:10 en el medio de cultivo sin rojo de fenol). Después de 3 horas de incubación a 37°C y 5% CO₂, los cultivos fueron lavados con PBS y 100ul por pocillo dimetil sulfóxido (DMSO) que fue adicionado para extraer el producto. Se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia de la solución resultante a 550 nm. Se considera que la cantidad de MTT reducida es proporcional al número de células viables.

Cálculo de la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀). Con los resultados de las absorbancias para cada concentración se obtuvieron las graficas concentración - respuesta. En el caso del NRU, la viabilidad se expresó como porcentaje de captación de colorante por los lisosomas respecto a las células control que no habían sido tratadas. En el ensayo MTT, la viabilidad también se expreso el % de reducción del colorante respecto a las células control. Las curvas obtenidas se ajustaron a una función exponencial y se calcularon los índices de citotoxicidad o concentración inhibitoria 50 (IC₅₀), que corresponde a la concentración de tensioactivo que provocó la muerte del 50% de células.

2.6 Estudio del efecto de los biotensioactivos sobre la proliferación de células intestinales Caco-2

El efecto de los biotensioactivos sobre la proliferación celular fue evaluado en cultivos de células intestinales Caco-2 en estado de preconfluencia. El cultivo se mantuvo, siguiendo la metodología descrita por Thwaites *et al.* (1993), en un incubador a 37°C y en atmósfera de aire con un 5% de CO₂ y 90 % de humedad relativa. Para la realización de los experimentos las células fueron sembradas a una densidad de 10.000 cel/cm² en placas de cultivo con DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Médium; BioWhittaker-Lonza, Switzerland) suplementado con 4,5 g/L de D-glucosa, 2 mM de L-

glutamina, 1% (v/v) de aminoácidos no esenciales, 10% (v/v) de suero fetal bovino, 100 µg/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina). Después de 4 días de la siembra (estado de preconfluencia), el cultivo fue incubado con diferentes concentraciones del producto BT según su CMC (fracción A: 0,05-0,4 g/L; y fracción B 1,5-12 g/L) en presencia de suero fetal bovino, (FBS, BioWhittaker-Lonza, Switzerland) durante 48 horas. También se incubaron las células en ausencia de producto, tanto en presencia de FBS, para determinar la proliferación máxima, como en ausencia de FBS, para determinar la proliferación mínima del cultivo en ausencia de factores de crecimiento. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó el recuento de células viables.

Recuento de células viables. El recuento de células viables se realizó por observación al microscopio de fluorescencia tras la tinción del cultivo con naranja de acridina y bromuro de etidio. El fluorocromo naranja de acridina entra en las células vivas y tiñe de color verde el DNA bicatenario y de color naranja claro el DNA monocatenario y el RNA. En cambio, el bromuro de etidio únicamente puede atravesar la membrana plasmática de las células muertas y tiñe de color naranja rojizo su material genético (Parks *et al.*, 1979). Para esta determinación primero se eliminó el sobrenadante y se lavó dos veces el cultivo con 1 ml de un tampón fosfato estéril, D-PBS (Dubelcco's phosphate buffer saline; Sigma). Luego se adicionaron 200 µl de tripsina y se incubó 10 minutos en la estufa 37°C. Después de la incubación, se comprobó visualmente que la células se hubieran desprendido de la superficie de crecimiento y, a continuación se inactivó la tripsina por la adición de 600 µl de medio de cultivo (DMEM + FBS). Posteriormente se realizó un recuento para determinar el número de células viables de la suspensión de células obtenidas.

Preparación del colorante. Se preparó una solución de naranja de acridina de 10 µl/ml y una solución de bromuro de etidio de 200 µl/ml disueltos en PBS. A continuación, se mezclaron los dos colorantes a volúmenes iguales (1:1) y la solución resultante se diluyo 10 veces (solución de trabajo) y se guardo en un recipiente de vidrio tapado a 4°C.

Protocolo experimental. Se mezclaron 100 μ l de la suspensión celular con 500 μ l de medio (DMEM) con el objetivo de diluir la muestra. De esta suspensión, se tomaron 50 μ l, se mezclaron con 50 μ l de la solución de trabajo de colorante y se rellenaron las celdas necesarias de una cámara Fast-Read[®] para realizar el recuento de células viables por microscopia de fluorescencia. Finalmente se calculó el número de células viables por μ l de la suspensión celular inicial considerando que el volumen interior de cada celda era 1 μ l. Las células que presentaron fluorescencia al microscopio se determinaron como células viables

2.7 Estudio de la citotoxicidad del biotensioactivo mediante la determinación de la actividad lactato deshidrogenasa (LDH)

Para determinar los posibles efectos citotóxicos del biotensioactivo sobre las células Caco-2 se determinó la actividad lactato deshidrogenada (LDH) como marcador de la integridad de la membrana celular (Cook y Mitchell, 1989). La determinación se realizó con un kit comercial (LHD Cytotoxicity Assay Kit -Biochain[®], USA) siguiendo las especificaciones suministradas por la casa comercial.

El Kit consta de dos reactivos:

Reactivo A: contiene la diaforosa, que actúa como catalizador, y NAD⁺.

Reactivo B: contiene cloruro de tetrazolio y lactato sódico.

La reacción enzimática se produce en dos pasos. En primer lugar, el NAD se reduce a NADH/H⁺ por la conversión del lactato a piruvato catalizado por la LDH. En segundo lugar, el catalizador (la diaforosa) transfiere H/H⁺ del NADH/H⁺ a la sal de tetrazolio que se reduce a formazán. Esta reacción produce un cambio de color de amarillo pálido a rojo.

La liberación de la LDH se determinó en el medio de cultivo 48 horas después del tratamiento con los tensioactivos. Se preparó una solución de trabajo mezclando 1,5 ml de reactivo A con 3ml de reactivo B. Esta solución debe prepararse y utilizarse inmediatamente. En placas Costar 3690 de 96 pocillos se añadieron 100 μ l de las muestras y, a continuación, 45 μ l de la solución de trabajo. Se incubó durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad y,

transcurrido ese periodo, se realizó la lectura de absorbancia a 490 nm (Bio-Rad 550). Un alto valor de absorbancia con respecto al control indica un alto valor de citotoxicidad y por tanto daños a nivel de membrana.

2.7.1. Determinación de células apoptóticas después del tratamiento con el biotensioactivo

La disminución de la viabilidad celular en células Caco-2 por efecto del biotensioactivo se analizó mediante el marcaje usando la técnica TUNEL (Inglés: Terminal Transferase dUTP-biotin Nick End-Labeling) y citometría de flujo. Esta técnica se basa en marcar y detectar el extremo 3'OH expuesto de forma característica al fragmentarse el DNA en el proceso apoptótico. Detecta núcleos de células apoptóticas en cortes histológicos sin destruir la integridad tisular. La unión de dichos fragmentos de DNA a desoxiuridinotri-fosfato (dUTP) marcado con fluoresceína, se realizó en una reacción mediada por desoxinucleotidil-transferasa (TdT), siguiendo el protocolo del kit proporcionado por la casa comercial MEBSTAIN[®] Apoptosis Kit Direct.

Para la realización de los experimentos las células fueron sembradas a una densidad de 10.000 células/cm² en placas de cultivo con DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium suplementado con 4,5 g/L de D-glucosa, 2 mM de L-glutamina, 1% (v/v) de aminoácidos no esenciales, 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS), 100 U/mL de penicilina y 100 μ g/mL de estreptomina). Después de 4 días de la siembra (estado de preconfluencia), el cultivo fue incubado con diferentes concentraciones del producto BT (fracción A: 0,2 g/L; y fracción B: 1,5 g/L) en presencia de FBS durante 48 h a 37° C y 5% CO₂. También se utilizaron dos controles, incubando las células en ausencia de producto (BT), un control en presencia de un antibiótico derivado del indolcarbazol, la estaurosporina (+STP), compuesto que es capaz de inducir la apoptosis en distintas líneas celulares (control positivo) (Falcieri *et al.*, 1993); y otro control solo con suero fetal bovino (+FBS), para determinar el porcentaje de células no apoptóticas en ausencia de (STP) (control negativo). Después del tratamiento de las células Caco-2 se lavaron dos veces con PBS con 2% de albúmina de suero bovino (BSA) y se fijaron con un 4% de paraformaldehído tamponado (paraformaldehído al 4% en 0,1M de NaH₂PO₄,

pH 7,4) a 4°C por 30 minutos. Posteriormente las células se lavaron dos veces con PBS con 2% de BSA. Finalmente se adicionaron 200µl de etanol al 70% al pellet de las células y se incubó por 30 minutos a -20°C para permeabilizar las células. Después de lavar 2 veces con PBS con 0,2% BSA, se adicionó 30µl de la mezcla TdT (TdT y fluoresceína-dUTP) y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Finalmente las células se lavan 2 veces con PBS con 0,2 BSA, y se resuspendieron en 200-500 µl de PBS con 0,2% BSA. Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo para determinar el porcentaje de células apoptóticas mediante la intensidad de fluorescencia. A mayor intensidad de fluorescencia mayor porcentaje de apoptosis.

2.8. Concentración Mínima Inhibitoria CMI

La actividad antimicrobiana fue ensayada mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), definida como la mínima concentración de un compuesto que inhibe el crecimiento de algún microorganismo, después del tiempo requerido de incubación. Para ensayar la susceptibilidad de algunos microorganismos frente a la mezcla de BT, se realizó un ensayo de microdilución en caldo como describe Jorgensen y Turnidge (2003).

La actividad antibacteriana fue ensayada con 7 suspensiones de microorganismos: *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Mycobacterium phlei* (ATCC 41423), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella* Enteritidis (ATCC 49214), *Serratia marcescens* (ATCC 274), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213). La actividad antifúngica se estudió con *Candida albicans* (ATCC 10231), *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404), *Penicillium chrysogenum* (ATCC 9480), *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 18748). A partir de un cultivo 16 horas de los microorganismos antes mencionados, se preparó una suspensión a una densidad celular de aproximadamente 1×10^8 UFC/ml. Para bacterias el inóculo fue ajustado mediante la escala de McFarland a un valor de 0,5; mientras que para hongos el inóculo fue ajustado mediante una cámara de Neubauer. Las suspensiones de cada uno de los microorganismos fueron inoculados en una placa de 96 pocillos que contenía diferentes concentraciones (1024 µg/ml hasta 2 µg/ml) del extracto completo, Fracción A y Fracción B, en

caldo MHB (Mueller Hinton Broth) para suspensiones bacterianas, y caldo sauboraud para suspensiones de hongos y levaduras. La misma prueba fue realizada simultáneamente para un control negativo (solo MHB o Sauboraud), control de crecimiento (MHB + inóculo de organismo) y control de esterilidad (MHB + biotensioactivo). Las placas fueron incubadas a 37°C por 24 horas para bacterias y 25°C por 48 horas para hongos. El crecimiento o inhibición de los microorganismos se leyó visualmente.

3. Resultados y Discusión

3.1. Efecto del biotensioactivo sobre los eritrocitos (hemólisis)

La mayoría de los tensioactivos tanto de origen químico o biológico, pueden penetrar en las membranas biológicas, alterando su estructura y función. En la mayoría de los casos la adición de biotensioactivo sobre los eritrocitos causa hemólisis a través de dos mecanismos diferentes, ya sea por la disrupción directa de la membrana a través de su solubilización, proceso que normalmente ocurre a una alta proporción tensioactivo/membrana (valores cercanos y/o sobre la CMC), o puede ser debido al aumento de la permeabilización de la membrana a pequeños solutos, que normalmente ocurre a concentraciones bajas de tensioactivo (por debajo de la CMC) llevando a la lisis osmótica (Sánchez et al., 2010 y Ortiz et al., 2009). Esto ocurre dependiendo de la naturaleza del biotensioactivo y características fisicoquímicas, principalmente de la CMC (Zaragoza et al., 2010).

Para estudiar el efecto del biotensioactivo producido por *S. detergens*, se estudió la actividad hemolítica en eritrocitos de conejo. Para ello, se determinó el porcentaje de hemólisis, después de una hora de contacto a 37°C, con diferentes concentraciones del biotensioactivo producido por *S. detergens* (fracción A y B), la primera de ellas, fracción A, corresponde a una mezcla de fosfolípidos, donde el mayoritario de ellos fue identificado como una fosfatidiletaniloamina (Burgos et al., 2011), la segunda fracción, esta formada por una mezcla de lípidos nitrogenados de naturaleza polar, que se están caracterizando en la actualidad. Ambas fracciones presentan

diferentes valores de CMC (fracción A, 0,2 g/L; y fracción B, 6 g/L). Para el presente estudio se utilizaron concentraciones cercanas a sus correspondientes CMCs, siendo esta la razón de que las concentraciones utilizadas de la fracción B fuesen 10 veces más elevadas que las utilizadas en fracción A.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3.1, donde se puede observar que las dos fracciones presentan actividad hemolítica. En ambos casos hay una dependencia de la concentración de BT sobre el porcentaje de hemólisis de los eritrocitos al incrementar la concentración. La fracción A presentó un 100% de hemólisis, mientras que la fracción B solo presentó un 83%, después de una hora y a 37°C.

Para estudiar el comportamiento de ambos procesos se realizó un ajuste de los datos obtenidos en el ensayo de hemólisis. Para realizar dicho ajuste se utilizó el entorno de programación para análisis estadístico y gráfico R (R Development Core Team, 2011). Los resultados obtenidos con la fracción A se ajustan mejor un modelo lineal, donde **H** representa el porcentaje de hemólisis y **x** la concentración del extracto en g/L; **r** y **c** son constantes que simbolizan la tasa de hemólisis y la hemólisis residual (en el momento cero), respectivamente (figura 3,1; a). El elevado valor de **R²** obtenido (0,959) indica un buen ajuste al modelo lineal. Dicho ajuste sugiere que la reacción de hemólisis es un proceso en el que no se aprecia

una saturación. Por lo tanto, el 100% de hemólisis obtenida con la FA indica el consumo total del sustrato (eritrocitos), pero no una saturación del proceso.

Por otro lado, los resultados obtenidos con la fracción polar (B) muestran un comportamiento diferente al estudiar el proceso de la hemólisis. En este caso los resultados obtenidos se ajustan a una ecuación logística (curva sigmoidea), donde **H**, **x**, **r** y **c** tienen el mismo significado que en el caso anterior y **K** es la constante de saturación. Los resultados obtenidos se ajustan bien a dicha curva (ecuación logística), lo que indica que el proceso de hemólisis en este caso se satura llegando a un máximo de hemólisis del 83,3% (figura 3,1; fracción B). Una posible explicación al proceso de saturación que presenta la fracción B podría ser una posible competencia entre fragmentos celulares o cationes resultantes de la hemólisis como **K⁺** y las dianas del biotensioactivo en la membrana de los eritrocitos, teniendo como consecuencia una inactivación de la hemólisis.

Si comparamos ambos modelos teniendo en cuenta la constante **r** que mide el porcentaje de hemólisis en función de la concentración de BT, vemos que el proceso producido por la fracción A es mucho más efectivo (hemolítico), ya que se produce a una tasa 115 veces mayor que la de la fracción B.

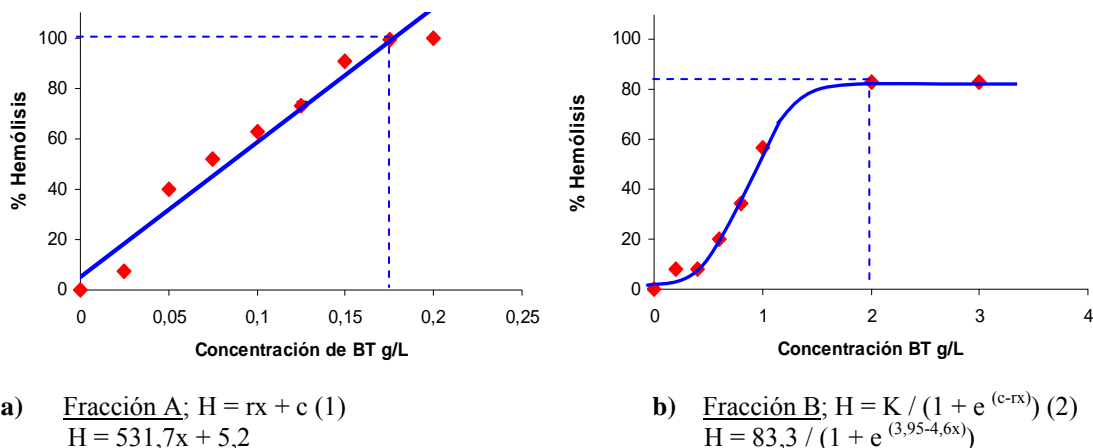


Figura 3.1: Dependencia de la hemólisis de eritrocitos de sangre se conejo con la concentración de biotensioactivo. Los eritrocitos fueron incubados por una hora a 37°C a diferentes concentraciones de biotensioactivo, determinando la cantidad hemoglobina liberada. A) fracción A; b) fracción B

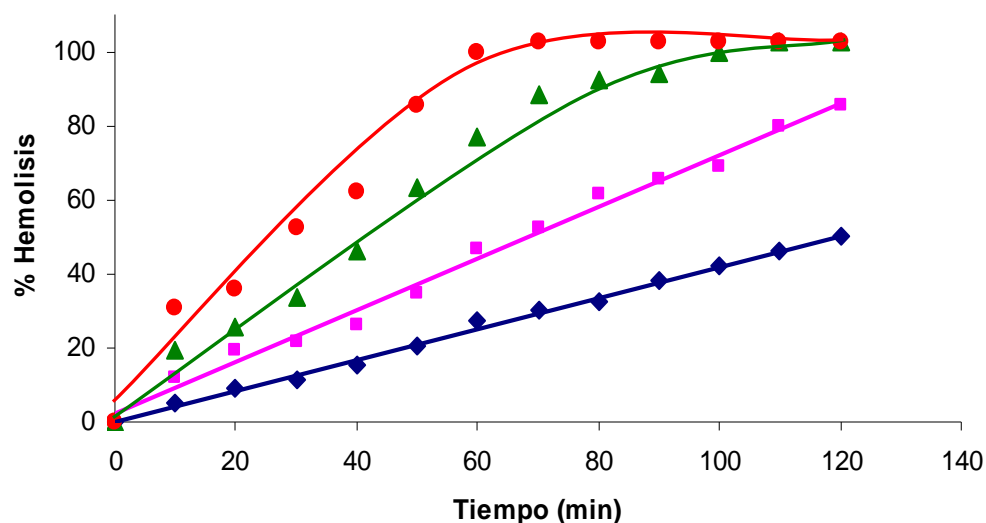


Figura 3.2: liberación de hemoglobina desde los eritrocitos de conejo, inducida por el biotensioactivo (fracción A) en función de tiempo. 0,2g/L (-●-); 0,15g/L (-▲-); 0,1 g/L (-■-); 0,05 g/L (-◆-).

Para profundizar en el mecanismo de hemólisis se realizó un estudio sobre la respuesta en el tiempo con diferentes concentraciones de la fracción A (Figura 3.2), donde se confirmó que la velocidad de hemólisis está ligada a la concentración de biotensioactivo. Para concentraciones bajas, como por ejemplo 0,05 g/L, la hemólisis fue un proceso lento y solo alcanzando un 40% de hemólisis en dos horas. Sin embargo, a concentraciones mayores, 0,2 y 0,15 g/L, se observa un incremento de la velocidad de hemólisis, ambas llegando al 100% de hemólisis a los 60 y 100 minutos de incubación a 37°, respectivamente.

Al comparar nuestros resultados con cinéticas de hemólisis realizadas con otros biotensioactivos, tales como di-ramnolípidos (diRL) (Sánchez *et al.*, 2010), trealosalípidos (THL) (Zaragoza *et al.*, 2009), se puede decir que con la fracción A la velocidad a que ocurre la liberación de hemoglobina es más lenta. Por ejemplo, con la concentración más alta ensayada con el di-ramnolípido (80 μ M) se alcanza el 100 % de hemólisis prácticamente a los 15-20 minutos y a los 40 minutos en el caso de trealosalípido (80 μ M), mientras que con 0,2 g/L de la fracción A se obtiene el 100% de hemólisis a los 60 minutos. Cabe destacar que las concentraciones utilizadas con THL y diRL, 80 μ M en ambos casos, corresponden a concentraciones por

debajo se sus correspondientes CMCs (THL, 300 μ M; y diRL, 110 μ M). Con la fracción A, la concentración máxima ensayada, 0,2 g/L, corresponde al valor de su CMC, y de acuerdo con la figura 3.2, si se redujese la concentración por debajo de la CMC, la velocidad de hemólisis sería menor y mostraría diferencias mayores. De acuerdo a estos resultados podríamos decir que la fracción A y B del biotensioactivo producido por *S. detergens* induce una hemólisis menos agresiva que la que producen los di-ramnolípidos, ya que la velocidad de liberación de hemoglobina es menor a la encontrada con los diRL y THL.

Con respecto a los mecanismos de hemólisis de ambas fracciones, se puede decir que al comparar las dos curvas obtenidas de la actividad hemolítica con respecto a la concentración de ambas fracciones, A y B (Figura 3,1; a y b), se puede observar que éstas presentan diferentes comportamientos, y que por tanto esto podría indicar que los procesos o mecanismos de cómo se produce la hemólisis podrían ser distintos. Un estudio previo realizado con ambas fracciones del biotensioactivo sobre placas de agar sangre, ya indicaba un comportamiento diferente, observándose que la fracción A presentaba una β -hemólisis (hemólisis total), mientras que la

fracción B una alfa-hemólisis (hemólisis parcial) después de 24 horas a 37°C.

El comportamiento lineal presentado por la fracción A en la cinética de hemólisis, es indicativo, según Sánchez *et al.* (2010), de un mecanismo lítico, es decir, una disrupción directa de la membrana a través de su solubilización, mientras que el comportamiento sigmoidal que presenta la fracción B en la curva de hemólisis con respecto a la concentración de biotensioactivo (figura 3,1; B), podría deberse a un mecanismo osmótico-lítico, similar a los obtenidos con los trealosalípidos producidos por *Rodococcus* sp.. Zaragoza *et al.* (2010), justifican este comportamiento sigmoidal con la necesidad de acumular una cantidad suficiente de biotensioactivo en la membrana de los eritrocitos para inducir la lisis por un mecanismo osmótico. Además estos autores indican que la presencia de un periodo de retraso en la actividad hemolítica en los primeros minutos de la curva (cinética de hemólisis), puede indicar que el biotensioactivo requiere de pasos previos para comenzar a permeabilizar la hemoglobina, uno de estos pasos es la adsorción del tensioactivo a la monocapa externa de la bicapa de las membranas, seguido por la formación de poros y la salida de solutos de bajo peso molecular (Zaragoza *et al.*, 2010).

Debido a las potenciales aplicaciones de los biotensioactivos en productos de consumo comercial tales como cosméticos, productos farmacéuticos o como aditivos alimenticios, es necesaria una caracterización apropiada de sus posibles acciones tóxicas laterales. Aquí, hemos mostrado que la mezcla de biotensioactivos producidos por *Sphingobacterium detergens* causa de forma lenta la hemólisis en eritrocitos de conejo. Esta acción hemolítica podría parecer en principio negativa para futuras aplicaciones en productos de uso humano y por tanto son necesarias más investigaciones para encontrar si disminuyendo las concentraciones utilizadas en estos productos, estos efectos colaterales indeseables podrían minimizarse.

3.2. Estudio de citotoxicidad del BT sobre queratinocitos y fibroblastos (IC_{50})

Los ensayos de citotoxicidad se encuentran entre los métodos *in vitro* utilizados con más frecuencia para predecir la toxicidad de una sustancia sobre diferentes tejidos. Muchos tensioactivos son irritantes primarios, es decir, son capaces de iniciar una reacción de irritación mediante una acción citotóxica directa sobre la piel, sin necesidad de una sensibilización inmunitaria previa (hipersensibilidad retardada). Por este motivo, los ensayos de citotoxicidad sobre células en cultivo se han propuesto para predecir posibles reacciones de irritación dérmica desencadenada por el biotensioactivo. Para estudiar los posibles efectos de la fracción A y B sobre la piel se han utilizado dos líneas celulares, fibroblastos (3T3) y queratinocitos (HaCaT). Para valorar la citotoxicidad de los compuestos en estudio se seleccionaron dos medidas indirectas de la viabilidad celular. Una fue la captación del colorante rojo neutro (NRU), que mide los posibles daños celulares a nivel de las membranas (Filman *et al.*, 1975); y otra fue el ensayo de la reducción de la sal MTT, para medir daño a nivel metabólico (Mosmann, 1983; Liu *et al.*, 1997). Los valores obtenidos se expresan en porcentaje de viabilidad comparados con el control, y a efectos comparativos se calculan las IC_{50} (concentración de tensioactivo que produce la reducción de la viabilidad celular en un 50%).

En la tabla 3.1 y en la figura 3.3 se muestran los resultados de citotoxicidad obtenidos con ambas fracciones A y B, y el SDS (control), sobre fibroblastos y queratinocitos. Además en la tabla se incluyen valores de IC_{50} de dos biotensioactivos, trealosalípidos (Marqués *et al.*, 2009) y ramnolípidos (Benincasa *et al.*, 2010).

Si comparamos los resultados obtenidos con las dos fracciones con propiedades tensioactivas producidas por *S. detergens*, se puede ver claramente que la fracción B presenta valores de IC_{50} mucho más altos que la fracción A, tanto en fibroblastos como queratinocitos. En consecuencia la fracción B es mucho menos citotóxica que la fracción A.

Tabla 3.1: resultados de citotoxicidad de la fracción A y B sobre queratinocitos y fibroblastos determinados con la prueba de rojo neutro (NRU) y tetrazolio (MTT). Los resultados están expresados como IC₅₀ (la dosis que inhibe la viabilidad a un 50%). Los valores representan el promedio de 4 replicas para este experimento.

Tensioactivos	Fibroblastos (3T3) (IC ₅₀ ; µg/ml)		Queratinocitos (HaCaT) (IC ₅₀ ; µg/ml)	
	MTT	NRU	MTT	NRU
Fracción A	134,2 ± 38,8	47,2 ± 3,1	120,6 ± 14,8	69,1 ± 5,5
Fracción B	824,9 ± 311,6	335,2 ± 19,9	725,4 ± 187,2	478,1 ± 60,1
SDS	53,5 ± 3,3	46,3 ± 1,7	47,6 ± 5,6	31,4 ± 2,9
Tealosalípidos*	91,1	117,4	70	90
Ramnolípidos**	53	52	77	76

Los valores calculados representan la media de IC₅₀, (X) ± SE (error estándar), por 4 replicaciones para este experimento (n=4); *Marqués et al., 2009 **Benincasa et al., 2010)

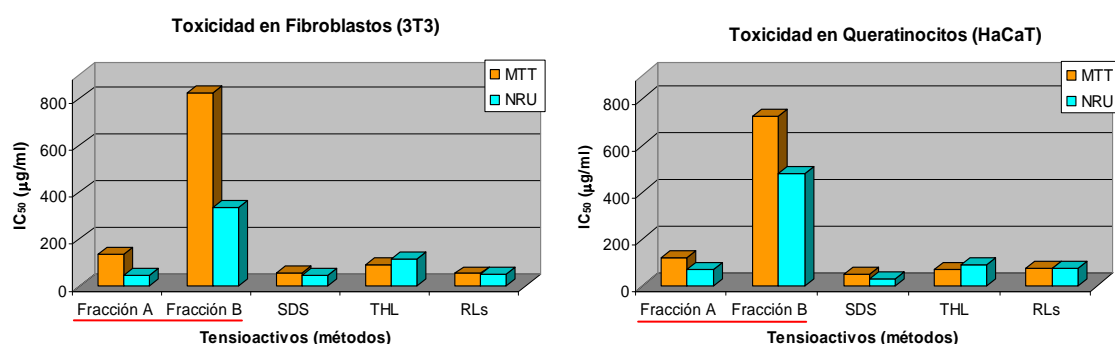


Figura 3.3: resultados de citotoxicidad de fracción A y B sobre queratinocitos y fibroblastos determinados con la prueba del NRU y MMT.

Por otro lado, si se comparan los valores de citotoxicidad (IC₅₀) entre ambos métodos, MTT y NRU, (Tabla 3.1 y Figura 3.3), se observan diferencias después del tratamiento con las dos fracciones de biotensioactivo. Se vio que el ensayo de la captación del rojo neutro (NRU) es mucho más sensible que el ensayo de la metabolización a la sal de formazán (MTT), tanto en queratinocitos como fibroblastos. Adicionalmente, los resultados obtenidos mediante el método del MTT han dado resultados con una enorme variabilidad si tenemos en cuenta los valores de error estándar obtenidos. Este hecho nos hace dudar de la idoneidad de este marcador para valorar la citotoxicidad de este tipo de compuestos. Si se compara este comportamiento con resultados publicados con otros tensioactivos de origen biológico (Marqués et al., 2009; Benincasa et al., 2010. Tabla 3.1 y Figura 3.3), se puede decir que nuestros resultados difieren con lo encontrado con otros biotensioactivos, donde generalmente se observan valores similares con ambos métodos (MTT y NRU). Resultados con mayor sensibilidad del NRU también fueron descritos por Fotakis y Timbrell (2006), al

estudiar la toxicidad del Cl₂Cd en diferentes tipos de células y por Weyermann et al. (2005), al estudiar diferentes compuestos tóxicos. Esta respuesta diferente entre ambos métodos (MTT y NRU), podría indicar un mecanismo de acción distinto, donde las fracciones A y B actúan inicialmente en el compartimiento lisosomal, mientras que la integridad de la membrana y/o la mitocondria se podría ver afectada posteriormente como consecuencia de un metabolito secundario (Burlando et al., 2008).

Cuando se comparan los valores de citotoxicidad de las dos fracciones, A y B, en ambas líneas celulares, fibroblastos y queratinocitos, no se observan diferencias remarcables tras el tratamiento con el biotensioactivo. En muchos estudios es frecuente encontrar una mayor sensibilidad de los fibroblastos (origen embrionario) que con los queratinocitos (origen dérmico). Benavides et al. (2004), Clothier et al. (1999); Ree et al. (1981) y Boukamp et al. (1988); en estudios previos han descrito una mayor resistencia a la citotoxicidad en queratinocitos, asociándose al origen epidérmico

de las células, ya que están constantemente expuestos a agentes externos.

La comparación de nuestro biotensioactivo con el dodecil sulfato de sodio (SDS) nos permitió tener una idea del potencial irritante de las fracciones A y B. Este tensioactivo aniónico se ha utilizado ampliamente para estudiar procesos de irritación dérmica y muchos estudios recomiendan su uso como compuesto de referencia debido a que actúa rápido, no es alérgico y sus efectos tóxicos son reproducibles (Lee y Maibach, 1995; Effendy y Maibach, 1996). De los resultados obtenidos en la tabla 3.1 se puede observar que las fracciones A y B presentan valores de IC_{50} más altos que los obtenidos con el SDS, por tanto, el potencial efecto irritante sobre la piel de estas fracciones es menor.

Al comparar nuestros resultados con valores de IC_{50} (NRU) obtenidos con otros biotensioactivos, trealosalípidos (Marqués *et al.*, 2009) y ramnolípidos (Benincasa *et al.*, 2010) (Tabla 3.1 y Figura 3.3), se observa que la fracción B, es mucho menos citotóxica que los trealosalípidos y ramnolípidos, y con las dos líneas celulares (fibroblastos y queratinocitos). Por otro lado, la fracción A, y los ramnolípidos presentan un comportamiento similar con fibroblastos. Con queratinocitos, los trealosalípidos también presentan una baja toxicidad, seguidos de los ramnolípidos y fracción A. Si tenemos en cuenta los valores de la CMC de los tensioactivos vemos que los trealosalípidos tienen una IC_{50} por encima de la CMC, la fracción A, ramnolípidos por debajo de la CMC, mientras que en la fracción B es un valor que es muy inferior a la CMC.

De acuerdo con los resultados de la IC_{50} se puede decir que los biotensioactivos producidos por *S. detergens*, presentan un efecto citotóxico menor que el SDS y, por tanto, un menor potencial irritante para la piel. En ese sentido, constituyen una posible alternativa en formulaciones galénicas o cosméticas.

3.3 Estudio del efecto del biotensioactivo sobre la proliferación de células intestinales Caco-2

Las células epiteliales del intestino (Caco-2), procedentes de un adenocarcinoma de colon humano, se diferencian una vez han llegado a la confluencia y tras 21-25 días en cultivo,

presentando muchas de las características estructurales y funcionales de las células absorbentes del intestino delgado (Hidalgo *et al.*, 1989). Además, estas células constituyen un modelo *in vitro* extensamente utilizado en estudios relacionados con los procesos de proliferación y diferenciación del epitelio intestinal.

Para determinar la posible capacidad antiproliferativa del biotensioactivo (fracción A y B), se realizaron estudios en cultivos de células intestinales Caco-2 en estado de preconfluencia. Además, se utilizaron dos controles, positivo y negativo, incubando las células en ausencia de producto (BT), tanto en presencia de suero fetal bovino (C/FBS), para determinar la proliferación máxima (control positivo), como en ausencia de FBS (S/FBS), para determinar la proliferación mínima del cultivo en ausencia de factores de crecimiento (control negativo).

De acuerdo a los resultados obtenidos sobre la proliferación celular, tras el tratamiento de las células con concentraciones crecientes de ambas fracciones de biotensioactivo (Figura 3.4 y 3.5), se puede observar que conforme se incrementa la concentración de biotensioactivo (fracción A y B) el número de células viables disminuye, y siendo más marcado este efecto con la fracción B.

Con respecto a la fracción A (Figura 3.4), los resultados muestran una inhibición de la proliferación celular a concentraciones entre 0,05 y 0,2 g/L, observándose valores de “número de células viables” similares a los obtenidos con el control sin FBS. La reducción en el número de células viables a estas concentraciones de BT no puede atribuirse a un efecto citotóxico del tratamiento ya que la actividad de la LDH en el sobrenadante de estas muestras no difiere de la obtenida en ausencia de BT (Figura 3.4), pudiendo indicar un crecimiento celular más lento o una inducción de apoptosis.

La actividad de la LDH en el medio de cultivo es un buen indicador de la permeabilidad de la membrana celular (Benford y Hubbard, 1987), de manera que un aumento de su actividad indica que la integridad de la membrana está comprometida. A la concentración más alta de tratamiento de la fracción A (0,4 g/L) se observó

una marcada reducción del número de células viables con respecto al control (C/FBS). A esta concentración se observa además un efecto citotóxico del BT sobre el cultivo celular que podría explicar la reducción en el número de células viables.

Con respecto a la fracción B (Figura 3.5), los resultados muestran que a medida que aumenta la concentración de BT se observa una fuerte disminución del número de células viables. Cabe remarcar que las concentraciones utilizadas con esta fracción son 10 veces superiores que las empleadas con la fracción A, debido al valor de su CMC. Se pudo observar que a concentraciones superiores a 1,5 g/L, que corresponde a la cuarta parte del valor de la CMC, se observa una fuerte inhibición de la proliferación celular, pero sin mostrar un efecto citotóxico en el rango de concentraciones comprendidas entre 1,5-6 g/L. Sin embargo, a valores superiores de la CMC se observa un aumento de la actividad LDH.

Cabe destacar que en ambos casos, fracción A y B, el aumento de la citotoxicidad (valor de LDH) del producto coincide con el valor de sus respectivas CMCs, pudiendo indicar que la citotoxicidad que presentan estos productos por encima de este valor (CMC), podría estar asociada

directamente con la formación de agregados (micelas).

Por otro lado, si comparamos la reducción del número de células viables presentada por la fracción B con respecto a la fracción A, se puede observar que esta reducción ocurre a valores de concentración muy por debajo de la CMC en la fracción B (6 g/L), mientras que con la fracción A la disminución del número de células viables ocurre sobre el valor de su CMC (0,2 g/L). Esto podría indicar que con la fracción A, la marcada reducción de células viables, podría tener relación directa con la formación de agregados, mientras que con la fracción B no.

3.3.1 Estudio de la apoptosis sobre células Caco-2 inducida por la mezcla de biotensioactivos producido por *S. detergens*.

La apoptosis o muerte celular programada se puede definir como el conjunto de reacciones bioquímicas que tienen lugar en la célula, que concluyen con su muerte de una forma ordenada y silenciosa, sin producir ningún tipo de reacción en los tejidos. La apoptosis es un proceso de autodestrucción celular controlada que permite al organismo su correcta morfogénesis y la eliminación de las células que amenacen su supervivencia, y además, es necesaria para evitar la sobreproducción celular.

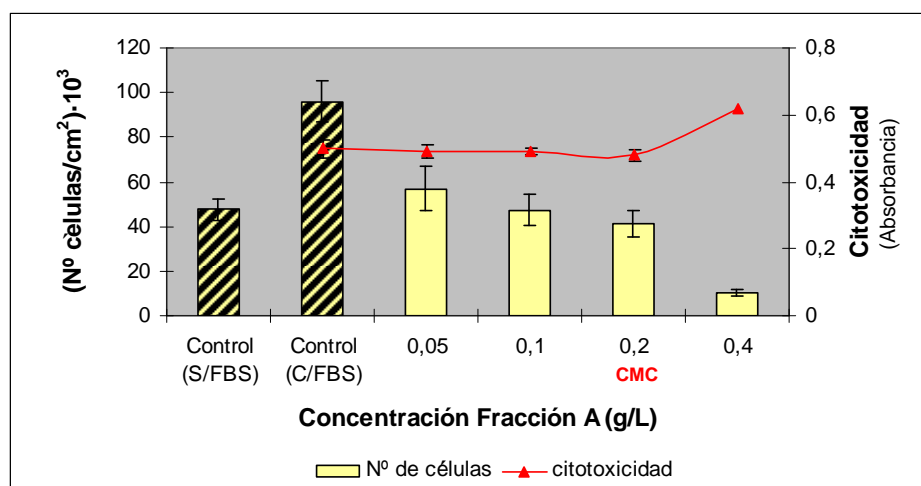


Figura 3.4: Número de células viables tras 48h de incubación con el BT y valores de la actividad de la lactato deshidrogenasa (citotoxicidad) inducida por diferentes concentraciones de la fracción A en células del epitelio intestinal (Caco-2). Los valores representan la media del número de células/cm² y los valores de la actividad de la lactato deshidrogenada (X) ± SE por 6 replicaciones para este experimento.

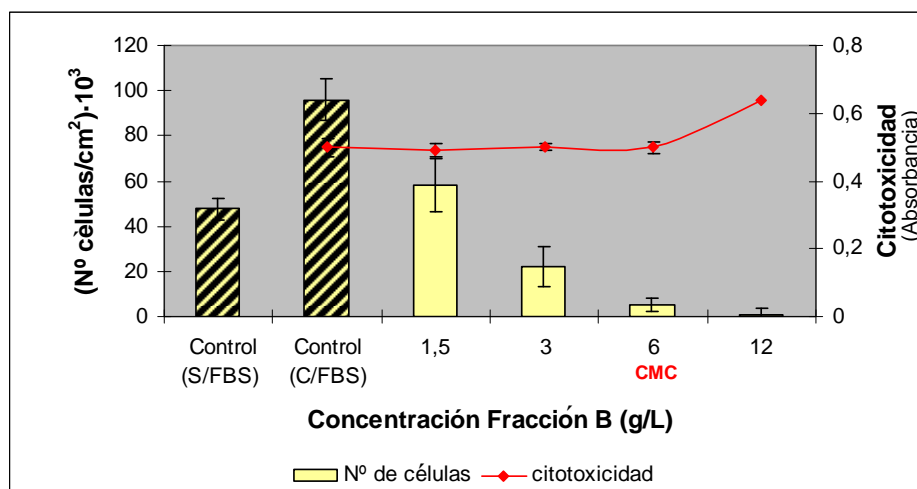


Figura 3.5: Número de células viables tras 48h de incubación con el BT y valores de la actividad de la lactato deshidrogenasa (citotoxicidad) inducida por diferentes concentraciones de la fracción B en células del epitelio intestinal (Caco-2). Los valores representan la media del número de células/cm² y los valores de la actividad de la lactato deshidrogenada (X) ± SE por 6 replicaciones para este experimento.

Este tipo de muerte celular es de vital importancia, tanto durante el desarrollo embrionario como durante la vida adulta (Kerr *et al.*, 1972; Jacobson *et al.*, 1997). La pérdida de regulación de la apoptosis es un factor crítico en la oncogénesis. La inducción de la apoptosis de células tumorales o el impedimento de su inhibición son hipotéticos mecanismos antitumorales de algunos tensioactivos. La inducción de la fragmentación proteica y del DNA son otros posibles mecanismos.

Con la finalidad de evaluar si la disminución de la viabilidad celular por efecto del biotensioactivo se produce por apoptosis, se analizaron los cambios morfológicos característicos de las células apoptóticas, en nuestro caso la fragmentación del DNA, mediante citometría de flujo. Para ello los cultivos fueron incubados durante 48 h con la concentración más elevada de biotensioactivo no citotóxica, 0,2 g/L de la fracción A, que corresponde al valor de su CMC, y con 1,5 g/L de la fracción B, que corresponde a la cuarta parte del valor de su CMC.

Además, se utilizaron los dos controles, positivo y negativo, incubando las células en ausencia de producto (biotensioactivo), con estaurosporina (+STP, control positivo) en el primer caso, y con suero fetal bovino (+FBS, control negativo) en el segundo. Los resultados obtenidos del efecto del BT sobre la regulación de la apoptosis se muestran en la figura 3.6. En dicha figura se

puede observar que ambas fracciones del biotensioactivo, A y B, inducen la apoptosis sobre células intestinales Caco-2, observándose un 44% de células apoptóticas con la fracción A y un 75% con la fracción B, después del tratamiento con el biotensioactivo. Cabe destacar que el control positivo de estaurosporina, antibiótico que induce la apoptosis, solo alcanza un 80% de apoptosis, por lo tanto, si tomamos este resultado como referencia de valor máximo de apoptosis, nuestros resultados aumentarían a un 55% (FA) y 93,8% (FB) de células apoptóticas posibles. De acuerdo a estos resultados se puede decir que el descenso de viabilidad celular observada en el estudio anterior con ambas fracciones, podría estar asociada principalmente a un proceso de apoptosis y no de citotoxicidad. Es decir, tanto la fracción A, que corresponde a una mezcla de fosfolípidos, y especialmente la fracción B, que corresponden a lípidos nitrogenados, podrían inducir la apoptosis en células tumorales.

Una investigación realizada por Minamino *et al.*, (2003), ha descrito que un tipo de fosfolípido, las ceramidas y esfingofosfolípidos (SPLs) aislados de *Sphingobacterium spiritivorun* ATCC 33861 sp. también inducían la apoptosis pero en una línea celular de leucemia mieloide humano (HL-60). Estos autores describieron que las ceramidas y SPLs inducían la fragmentación del DNA, primera característica bioquímica de la apoptosis o muerte celular programada, y activación de la caspasa-3, seguidos por cambios en la morfología,

tales como alteraciones en el núcleo y células y acortamiento del ciclo celular. Este estudio podría explicar en parte el posible mecanismo de inducción de la apoptosis de la fracción A, debido principalmente a que la fracción A es una mezcla de fosfolípidos producidos por *S. detergens*.

Estudios realizados con otros biotensioactivos, como por ejemplo la surfactina, también han mostrado su efecto sobre la proliferación de líneas celulares de carcinoma de colon humano, mostrando que este biotensioactivo bloquea fuertemente la proliferación celular. La inhibición del crecimiento fue debida a la inducción de la apoptosis por el BT y detención del ciclo celular producido por la supresión de las señales de regulación de supervivencia celular, tales como EPK y PI3K/Akt (Seydlová y Svobodová; 2008). Los Soforolípidos producidos por una cepa de levadura, *Wickerhamiella domercqiae*, también inducen la apoptosis en una línea celular cancerígena de hígado humano. En dichas células se observaron los cambios morfológicos característicos de células apoptóticas, tales como condensación de la cromatina, cuerpos apoptóticos y activación de las endonucleasas. Además, se observó que el tratamiento con los soforolípidos incrementa la fase G₁ y parcialmente la fase S de las células cancerígenas H7402 (Chen et al., 2006). Algunos tensioactivos de síntesis química también inducen la apoptosis. Enamoto et al. (2007) determinaron

que un tensioactivo catiónico que posee sales de amonio cuaternario, induce la apoptosis en células normales y cancerígenas.

Diversas enfermedades están asociadas con la pérdida de la regulación del proceso apoptótico, algunas presentan un aumento de la supervivencia celular (asociado a la inhibición de la apoptosis) y otras un exceso de muerte celular (asociado a un exceso de activación de la apoptosis) (López-Hoyos 1998). Entre las enfermedades en las que hay una inhibición de la apoptosis se incluye el cáncer, las infecciones virales y las enfermedades autoinmunes (Thatte y Dahanukar 1997). Dado que en muchos tumores malignos la apoptosis está inhibida, esta se acepta como un mecanismo clave en todas las facetas del cáncer, incluyendo la hiperplasia, transformación neoplásica, la expansión tumoral, neo-vascularización y la metástasis.

Finalmente y de acuerdo a estos resultados se puede decir que ambas fracciones podrían tener la capacidad de actuar como agente anticancerígeno mediante la inducción de apoptosis sobre las células Caco-2. Sin embargo, y pese a estos buenos resultados preliminares, se requieren más estudios al respecto para determinar por ejemplo el verdadero mecanismo de inducción de la apoptosis, y saber si estos compuestos inducen la apoptosis en otras líneas celulares de origen cancerígeno.

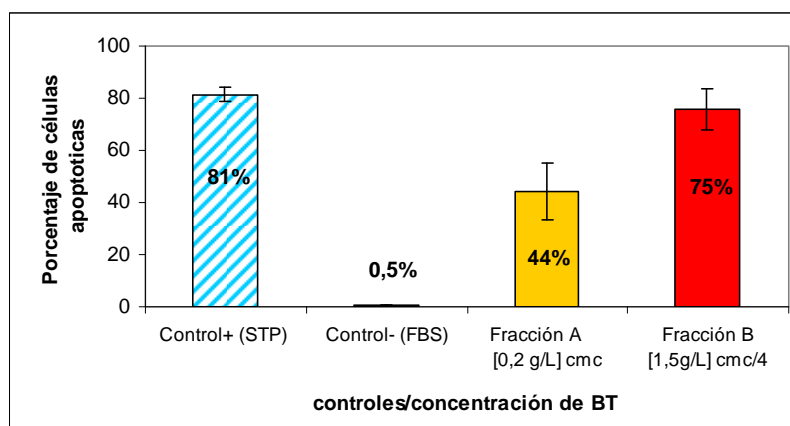


Figura 3.6: porcentaje de apoptosis inducido por las fracciones A y B de la mezcla de biotensioactivos producidos por *S. detergens* en células del epitelio intestinal (caco-2). Los valores representan el porcentaje de células apoptóticas (%) \pm SE por 3 replicaciones para este experimento.

3.4 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto crudo producido por la cepa 6.2S.

Muchos biotensioactivos han demostrado ser buenos agentes antimicrobianos. Esta propiedad ha sido demostrada por varios biotensioactivos, principalmente los lipopéptidos y glicopéptidos. Ejemplos de éstos son los ramnolípidos de *Pseudomonas aeruginosa* y la surfactina de *Bacillus subtilis*, los cuales presentan actividad como antibióticos (Lin, 1996).

Debido a las potenciales aplicaciones de los tensioactivos como desinfectantes y antibióticos, es interesante conocer sus propiedades antimicrobianas con el fin de ampliar el número de posibles aplicaciones. Por esta razón se evaluó la actividad antimicrobiana de la mezcla de biotensioactivos producidos por *S. detergens* en base a su concentración mínima inhibitoria mediante el ensayo de susceptibilidad antimicrobiana (Jorgensen y Turnidge, 2003). Después de la exposición de los microorganismos a distintas concentraciones del BT (1024 µg /ml hasta 2 µg/ml), se determinaron las concentraciones capaces de inhibir el crecimiento de los cultivos microbianos, donde se pudo observar que el extracto completo y sus dos fracciones, A y B, presenta una escasa actividad antimicrobiana frente a las bacterias y hongos ensayados. Solo se observó una leve inhibición del crecimiento con *Trichophyton mentagrophytes* (CMI 512 µg/ml) con la fracción B.

Debido a la casi nula actividad antibacteriana que presentó la mezcla de biotensioactivos producidos por la cepa 6.2S, estos no podrían ser utilizados como agentes desinfectantes o antisépticos. Sin embargo, sus interesantes propiedades físicoquímicas, tales como estabilidad al pH y temperatura, capacidad emulsionante, bajos niveles de toxicidad celular y capacidad de inducir la apoptosis, hacen a estos biotensioactivo como potenciales compuestos para ser aplicados en la industria cosmética y farmacéutica.

4. Conclusiones

Estudio de la actividad hemolítica de las fracciones de biotensioactivo producido por *S. detergens*:

- Ambas fracciones del biotensioactivo producido por *S. detergens* presentan actividad hemolítica, 100% la fracción A y 83% la fracción B.
- Las dos fracciones presentan diferentes comportamientos en las curvas de liberación de hemoglobina con respecto a la concentración de biotensioactivo, la fracción A presenta un comportamiento lineal similar a los di-ramnolípidos y la fracción B un comportamiento sigmoidal similar a los obtenidos con los trealosalípidos. Los diferentes comportamientos obtenidos podrían estar asociados a los distintos mecanismos en como se produce la hemólisis con ambas fracciones, donde la fracción A presentaría un mecanismo hemólisis simplemente lítico, mientras que la fracción B un mecanismo osmótico-lítico.

Estudio sobre el efecto del biotensioactivo sobre Queratinocitos y Fibroblastos:

- La fracción B presentó valores de IC₅₀ mucho mayores que los obtenidos con la fracción A, indicando una menor citotoxicidad.
- Ambas fracciones del biotensioactivo son menos citotóxicas que el tensioactivo de referencia (SDS), y por tanto podrían ser utilizadas en productos de galenica.
- El ensayo de captación de rojo neutro (NRU) es un buen método para determinar la citotoxicidad con este tipo de compuestos (fracción A y B).
- La fracción B es mucho menos citotóxica que ramnolípidos y trealosalípidos.
- La fracción A presentó valores similares de IC₅₀ con ramnolípidos y trealosalípidos, en fibroblastos.

Con respecto al estudio del efecto del biotensioactivo sobre células cancerígenas Caco-2:

- La fracción A produce una antiproliferación celular entre las concentraciones 0,05 - 0,2 g/L y una reducción de las células viables por citotoxicidad sobre el valor de la CMC.

- La fracción B presenta una fuerte reducción del número de células viables a concentraciones por encima de 1,5 g/L, concentraciones que corresponden a valores muy por debajo de la CMC. Esta fracción no presentó valores de citotoxicidad (LDH) por debajo de la CMC.

- La citotoxicidad presentada por las fracciones A y B, a valores superiores de sus respectivas CMCs, podría estar directamente relacionada con la formación de agregados por el biotensioactivo.

- Las fracciones A y B tienen la capacidad de inducir la apoptosis en células Caco-2, siendo la fracción B más efectiva en inducir la apoptosis que la fracción A, induciendo un 75% de células apoptóticas tras el tratamiento.

Referencias

Ábalos A., Pinazo A., Infante R., Casals M., García F. y Manresa A. (2001) Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. *Langmuir* 17, 1367-1371.

Ahlstrom, B., Thompson, R.A. y Edebo, L. (1999). The effect of hydrocarbon chain length, pH, and temperature on the binding and bactericidal effect of amphiphilic betaine esters on *Salmonella typhimurium*. *APMIS* 107, 318-324.

Aranda, F.J., Teruel, J.A. y Ortiz, A. (2005). Further aspects on the hemolytic activity of the antibiotic lipopeptide iturin A. *Biochim Biophys Acta* 1713, 51-56.

Banat, I.M., Makkar, R.S. y Cameotra, S.S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol* 53, 495-508.

Benavides, T., Martínez, V., Mitjans, M., Infante, M. R., Moran, C., Clapes, P., Clothier, R. y Vinardell, M. P. (2004a). Assessment of the potential irritation

and photoirritation of novel amino acid-based surfactants by in vitro methods as alternative to the animal tests. *Toxicology* 201, 87-93.

Benavides, T., Mitjans, M., Martínez, V., Clapes, P., Infante, M.R., Clothier, R.H. y Vinardell, M.P. (2004b). Assessment of primary eye and skin irritants by in vitro cytotoxicity and phototoxicity models: an in vitro approach of new arginine-based surfactant-induced irritation. *Toxicology* 197, 229-237.

Benford, B.J. y Hubbard, S.A. (1987). Preparation and culture of mammalian cells. in *Biochemical Toxicology: A Practical Approach*, eds Snell K., Mullock B, 57-79

Benincasa, M., Ábalos, A., Oliveira, I. y Manresa, A. (2004). Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. *Antonie Van Leeuwenhoek* 85, 1-8.

Benincasa, M., Marqués, A., Pinazo, A. y Manresa, A. (2010). Rhamnolipid surfactants: alternative substrates, new strategies. *Adv Exp Med Biol* 672, 170-184.

Boukamp, P., Pretrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., y Fusening, N.E. (1998) Normal keratinisation in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J cell Biol* 106, 761-771.

Burgos-Díaz, C., Pons, R., Espuny, M. J., Aranda, F. J., Teruel, J. A., Manresa, A., Ortiz, A. y Marqués, A. M. (2011). Isolation and partial characterization of a biosurfactant mixture produced by *Sphingobacterium* sp. isolated from soil. *J Colloid Interface Sci* 361, 195-204.

Burlando, B., Parodi, A., Volante, A. y Bassi, A. M. (2008). Comparison of the irritation potentials of *Boswellia serrata* gum resin and of acetyl-11-keto-beta-boswellic acid by in vitro cytotoxicity tests on human skin-derived cell lines. *Toxicol Lett* 177, 144-149.

Chen, J., Song, X., Zhang, H., Qu, Y. B. y Miao, J. Y. (2006). Sophorolipid produced from the new yeast strain *Wickerhamiella domercqiae* induces apoptosis in H7402 human liver cancer cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 72, 52-59.

Clothier, R., Willshaw, A. y Cox, H. (1999). The use of human keratinocytes in the EU/COLIPA International in vitro phototoxicity test validation study and the ECVAM/COLIPA study on UV filter chemical. *ALTA* 27, 247-259

- Cook, J.A. y Mitchell, J.B. (1989). Viability measurements in mammalian cell systems. *Anal Biochem* 179, 1-7.
- Desai, J.D. y Banat, I.M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol Rev* 61, 47-64.
- Effendy, I. y Maibach, H. I. (1996). Detergent and skin irritation. *Clin Dermatol* 14, 15-21.
- Enomoto, R., Suzuki, C., Ohno, M. y other authors (2007). Cationic surfactants induce apoptosis in normal and cancer cells. *Ann N Y Acad Sci* 1095, 1-6.
- Falcieri, E., Martelli, A.M., Bareggi, R., Cataldi, A. y Cocco, L. (1993). The protein kinase inhibitor staurosporine induces morphological changes typical of apoptosis in MOLT-4 cells without concomitant DNA fragmentation. *Biochem Biophys Res Commun* 193, 19-25.
- Filman, D.J., Brawn, R.J. y Dandliker, W.B. (1975). Intracellular supravital stain delocalization as an assay for antibody-dependent complement-mediated cell damage. *J Immunol Methods* 6, 189-207.
- Fotakis, G. y Timbrell, J.A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett* 160, 171-177.
- Haba, E., Espuny, M.J., Busquets, M. y Manresa, A. (2000). Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. *J Appl Microbiol* 88, 379-387.
- Haba, E., Pinazo, A., Jauregui, O., Espuny, M.J., Infante, M.R. y Manresa, A. (2003). Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044. *Biotechnol Bioeng* 81, 316-322.
- Hidalgo, I.T., Raub, T.J. y Borchardt, R.T. (1989). Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 96, 736-749.
- Jacobson, M.D., Weil, M. y Raff, M.C. (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell* 88, 347-354.
- Jansen, M., Treutner, K. H., Schmitz, B., Otto, J., Jansen, P. L., Neuss, S. y Schumpelick, V. (2004). Phospholipids reduce gastric cancer cell adhesion to extracellular matrix in vitro. *BMC Gastroenterol* 4, 33.
- Jorgensen, J.H. y Turnidge, J.D. (2003). Susceptibility Test Methods: Dilution and Disk Diffusion Methods. En: *Manual of Clinical Microbiology*, pág. 1108-1127. Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Tenover, M.C. y Tenover, R.H. (Eds). Washington, DC. USA.
- Keifer, P.A., Peterkofsky, A. y Wang, G. (2004). Effects of detergent alkyl chain length and chemical structure on the properties of a micelle-bound bacterial membrane targeting peptide. *Anal Biochem* 331, 33-39.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. y Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.
- Lang, S. y Wagner, F. (1993) Biological activities of biosurfactants. En: *Biosurfactants production, Properties, Applications*. Kosaric N. (ed). Marcel Dekker: Nueva York.
- Lee, C.H. y Maibach, H.I. (1995). The sodium lauryl sulfate model: an overview. *Contact Dermatitis* 33, 1-7.
- Lin, S.C. (1996). Biosurfactants: recent advances. *J. Chem Technol Biotechnol* 66, 109-120.
- Liu, Y., Peterson, D.A., Kimura, H. y Schubert, D. (1997). Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem* 69, 581-593.
- Lopez-Hoyos, M., Carrio, R., Merino, J. y Merino, R. (1998). Regulation of B cell apoptosis by Bcl-2 and Bcl-XL and its role in the development of autoimmune diseases (Review). *Int J Mol Med* 1, 475-483.
- Marqués, A.M., Pinazo, A., Farfan, M., Aranda, F.J., Teruel, J.A., Ortiz, A., Manresa, A. y Espuny, M.J. (2009). The physicochemical properties and chemical composition of trehalose lipids produced by *Rhodococcus erythropolis* 51T7. *Chem Phys Lipids* 158, 110-117.
- Minamino, M., Sakaguchi, I., Naka, T., Ikeda, N., Kato, Y., Tomiyasu, I., Yano, I. y Kobayashi, K. (2003). Bacterial ceramides and sphingophospholipids induce apoptosis of human leukaemic cells. *Microbiology* 149, 2071-2081.

Ortiz, A., Teruel, J.A., Espuny, M.J., Marqués, A., Manresa, A. y Aranda, F.J. (2009). Interactions of a bacterial biosurfactant trehalose lipid with phosphatidylserine membranes. *Chem Phys Lipids* 158, 46-53.

Ortiz, A., Teruel, J.A., Espuny, M.J., Marqués, A., Manresa, A. y Aranda, F. J. (2008). Interactions of a *Rhodococcus* sp. biosurfactant trehalose lipid with phosphatidylethanolamine membranes. *Biochim Biophys Acta* 1778, 2806-2813.

Parks, D.R., Bryan, V.M., Oi, V.T. y Herzenberg, L. A. (1979). Antigen-specific identification and cloning of hybridomas with a fluorescence-activated cell sorter. *Proc Natl Acad Sci* 76, 1962-1966.

Ree, K., Johnsen, A.S., Rugstad, H.E., Bakka, A. y Hovig, T. (1981). Characterization of a human epithelial cell line with special reference to its ultrastructure. *Acta Pathol Microbiol Scand A* 89, 73-80.

Rodrigues, L., Banat, I.M., Teixeira, J. y Oliveira, R. (2006). Biosurfactants: potential applications in medicine. *J Antimicrob Chemother* 57, 609-618.

Sanchez, M., Aranda, F.J., Teruel, J. A., Espuny, M. J., Marqués, A., Manresa, A. y Ortiz, A. (2010). Permeabilization of biological and artificial membranes by a bacterial dirhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Colloid Interface Sci* 341, 240-247.

Seydlova, G. y Svobodova, J. (2008). Development of membrane lipids in the surfactin producer *Bacillus subtilis*. *Folia Microbiol* 53, 303-307.

Seydlova, G. y Svobodova, J. (2008). Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications. *Cent Eur J Med* 3 (2), 123-133.

Terwogt, J.M., Mandjes, I.A., Sindermann, H., Beijnen, J.H. y ten Bokkel Huinink, W.W. (1999). Phase II trial of topically applied miltefosine solution in patients with skin-metastasized breast cancer. *Br J Cancer* 79, 1158-1161.

Thatte, U. y Dahanukar, S. (1997). Apoptosis: clinical relevance and pharmacological manipulation. *Drugs* 54, 511-532.

Thwaites, D.T., McEwan, G.T., Brown, C.D., Hirst, B.H. y Simmons, N.L. (1993). Na(+)-independent, H(+)-coupled transepithelial beta-alanine absorption by human intestinal Caco-2 cell monolayers. *J Biol Chem* 268, 18438-18441.

Weyermann, J., Lochmann, D. y Zimmer, A. (2005). A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int J Pharm* 288, 369-376.

Zaragoza, A., Aranda, F. J., Espuny, M.J., Teruel, J. A., Marqués, A., Manresa, A. y Ortiz, A. (2010). Hemolytic activity of a bacterial trehalose lipid biosurfactant produced by *Rhodococcus* sp.: evidence for a colloid-osmotic mechanism. *Langmuir* 26, 8567-8572.

Zaragoza, A., Aranda, F.J., Espuny, M.J., Teruel, J. A., Marqués, A., Manresa, A. y Ortiz, A. (2009). Mechanism of membrane permeabilization by a bacterial trehalose lipid biosurfactant produced by *Rhodococcus* sp. *Langmuir* 25, 7892-7898.

Capítulo 4

Discusión general

4. DISCUSIÓN GENERAL

El principal objetivo en la búsqueda de nuevos biotensioactivos es encontrar nuevos productos con alguna de las siguientes propiedades, elevada actividad superficial e interfacial, baja concentración micelar crítica (CMC), alta capacidad emulsionante, buena solubilidad y actividad en un amplio rango de pH. Además de estas propiedades fisicoquímicas, los biotensioactivos deben ser económicamente competitivos. Por lo tanto el segundo objetivo en la selección es aislar nuevas cepas bacterianas que sean capaces de producir biotensioactivos con un elevado rendimiento (Walter *et al.*, 2000). En la presente tesis doctoral, se ha estudiado la mezcla de biotensioactivos producida la cepa *S. detergens* 6.2S. La cepa 6.2S fue aislada a partir de una muestra de suelo volcánico de la isla de São Miguel (Portugal) y fue seleccionada, identificada y descrita por primera vez como productora de biotensioactivos. La mezcla de compuestos producidos por esta nueva especie, presentó interesantes propiedades superficiales, fisicoquímicas y biológicas, las cuales se describen a continuación.

4.1. Aislamiento, selección e identificación de microorganismos productores de biotensioactivos

4.1.1. Búsqueda, aislamiento y selección de microorganismos a partir de muestras de suelos volcánicos

Debido al gran número de cepas que deben ser caracterizadas en un proceso de selección, una estrategia eficiente es la clave para el éxito en el aislamiento de microorganismos nuevos e interesantes. Una estrategia completa para la búsqueda de nuevos biotensioactivos consiste en tres pasos: lugar de muestreo, aislamiento de cepas e investigación de las cepas de interés (Walter *et al.*, 2000).

En el presente estudio se realizó una búsqueda de nuevos microorganismos productores de tensioactivos. Para ello a partir de 10 muestras de suelos volcánicos no contaminados provenientes de las islas Azores (Portugal), se aislaron 54 microorganismos (31 bacilos Gram negativos (BGN), 19 bacilos Gram positivos (BGP), 2 cocos Gram positivos (CGP) y 2 levaduras (Pág. 38; Artículo 1). La primera selección de posibles cepas productoras de tensioactivos se realizó utilizando el medio S-MSM (medio de sales minerales de screening) como cultivo inicial para la producción de BT. Este estudio permitió seleccionar a 16 bacilos Gram negativos (BGN) por su capacidad de bajar la tensión superficial e interfacial del sobrenadante del medio de cultivo a valores inferiores a 40 mN/m o 10 mN/m

respectivamente, criterio utilizado para la selección de microorganismos productores de biotensioactivos (Ruggeri *et al.*, 2009).

Los microorganismos productores de biotensioactivos pueden aislarse a partir de diferentes muestras ambientales, tales como agua, suelos, materiales de desecho, etc. (Walter *et al.*, 2000). Sin embargo, Bodour y Miller-Maier (1998) mostraron que en muestras de suelos contaminados existe una mayor probabilidad de encontrar cepas productoras de BT que en suelos no contaminados. Muchos microorganismos productores de biotensioactivos han sido aislados de muestras de suelos o aguas contaminadas con algún compuesto orgánico hidrofóbico. Por ejemplo, Mercadé *et al.* (1996) aislaron cuatro bacterias del género *Rhodococcus* sp. y un *Bacillus* sp., ambos productores de tensioactivos, a partir de suelos contaminados con compuestos derivados del petróleo.

No obstante, en los ambientes no contaminados, como por ejemplo suelos o aguas marinas, también se han encontrado diferentes aislados con interesantes propiedades superficiales (Walter *et al.*, 2000). En un estudio realizado por Jaysree *et al.* (2011) se aisló un *Bacillus subtilis* a partir de muestras de agua no contaminadas. El microorganismo aislado producía un tensioactivo con interesantes propiedades superficiales y emulsionantes. Además, la búsqueda de microorganismos en ambientes no contaminados puede favorecer el aislamiento de nuevas cepas productoras de biotensioactivos, tal como sucedió en nuestro caso con los suelos volcánicos.

Los 16 BGN preseleccionados se identificaron mediante el sistema API 20 E[®] y 20 NE[®]. De acuerdo con los resultados 10 aislados pertenecían al género *Pseudomonas*, grupo de microorganismos muy estudiado y presente en muchas muestras ambientales. Las 6 cepas restantes, no pertenecían al género *Pseudomonas*, y se caracterizaron como *Sphingomonas* sp., *Brevundimonas* sp., *Sphingobacterium* sp., *Rhizobium* sp., *Aeromonas* sp., *Ochrobacterium* sp. Con dichos aislados se estudió si la propiedad de bajar la tensión superficial era una propiedad estable que se mantenía durante varios cultivos y si además estos aislados eran capaces de producir tensioactivos con diferentes fuentes de carbono, como C₁₁₋₁₃, glucosa, glicerol o aceite de oliva residual de fritos. Entre los 6 aislados, se escogió la cepa 6.2S por su velocidad de crecimiento, su estabilidad en la capacidad de bajar la tensión superficial, y por tratarse de un género bacteriano no descrito hasta la actualidad como productor de tensioactivos. Varios estudios describen a los ambientes terrestres y marinos como una gran fuente para aislar

nuevos microorganismos productores de biotensioactivos (Walter *et al.*, 2000), sin embargo, la probabilidad de aislar nuevos microorganismos y efectivos como productores de biotensioactivos es baja. Por ejemplo, en nuestro caso, a pesar de realizar aislamientos en suelos no contaminados, de los 54 BGN estudiados un 11%, proporción relativamente alta, fue seleccionado como posibles productores de BT para continuar el estudio, aunque solo uno de ellos fue escogido como buen productor de biotensioactivos. En el estudio realizado por Bodour *et al.* (2003), a partir de muestras ambientales contaminadas y no contaminadas, se aislaron 1305 microorganismos, de los cuales solo 45 aislados, un 3,4% del total, fueron considerados productores de tensioactivos. De estos 45 aislados, solo uno, *Flavobacterium* sp. MTN11, fue descrito como nuevo microorganismo productor de biotensioactivos. En otro estudio también realizado por Bodour *et al.* (2004) con muestras de suelos co-contaminados con compuestos orgánicos y metales, se aisló un porcentaje más alto de microorganismos productores de tensioactivos que en los estudios anteriores, un 8,4 % de cepas fueron productoras de un total de 203 aislados. Este resultado puede indicar que algunos ambientes contaminados con más de un contaminante pueden ejercer una presión selectiva sobre algunos microorganismos para la producción de biotensioactivos. Como se ha comentado anteriormente, la probabilidad de aislar microorganismos productores de BT es baja, pudiendo ser consecuencia de que las condiciones de enriquecimiento del cultivo no fueran las adecuadas para el crecimiento de los microorganismos productores, o bien, por la baja sensibilidad del método de medida de la actividad superficial utilizado (Soberón-Chávez y Maier, 2011).

4.2. Identificación del microorganismo productor de biotensioactivos

Como se comentó en el apartado anterior el aislado 6.2S fue identificado inicialmente mediante el sistema API 20 NE[®], el cual situó a la cepa dentro del género *Sphingobacterium*, con una probabilidad del 67% de ser *Sphingobacterium multivorum*. Por esta razón se amplió el estudio con los caracteres fenotípicos recomendados para confirmar la identificación del aislado 6.2S comparado con la cepa tipo de *S. multivorum* DSM 11691^T. Se observaron diferencias en los resultados de las pruebas de hidrólisis de la gelatina y crecimiento en MacConkey, que fueron positivas para la cepa 6.2S y negativas para *S. multivorum* DSM 11691^T. Estas diferencias entre ambas pruebas no confirmaban la identificación obtenida a partir del sistema API 20 NE[®], indicando que el aislado 6.2S podría tratarse de otra especie del género *Sphingobacterium*.

De acuerdo con estos resultados se decidió realizar un estudio filogenético, secuenciando el gen que codifica el 16S rRNA. A partir del alineamiento de la secuencia obtenida comparado con otras secuencias del gen 16S rRNA de las cepas tipo de todas las especies descritas de *Sphingobacterium* se construyó un árbol filogenético (Artículo 2, Fig. 1, Pág. 65), donde se confirmó que el aislado 6.2S pertenece al género *Sphingobacterium*. La cepa 6.2S se agrupó en un cluster bien definido formado por cuatro especies, y mostrando un alto grado de homología con las secuencias de *S. siyangense* (SY1^T) (99% de similitud), *S. canadense* (CR11^T) (98,8%), *S. multivorum* (JCM 21156^T) (98,6%) y *S. thalpophilum* (DSM 11723^T) (97%). Todos los valores obtenidos fueron iguales o superiores al 97%, límite establecido para delimitación de especies (Gevers *et al.*, 2005; Tindall *et al.*, 2010). Por lo tanto, la cepa 6.2S quedó claramente situada a nivel de género, pero no fue posible la diferenciación a nivel de especie entre las cuatro especies más próximamente relacionadas. El gen 16S rRNA es un marcador universal relativamente poco afectado por las presiones ambientales, y por tanto muy conservado entre especies bacterianas. La comparación de las secuencias del 16S rRNA (o de los genes que los codifican) permiten establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariotas, constituyendo en numerosas situaciones el marcador inicial y suficiente para realizar una identificación molecular rápida y precisa de las bacterias (Rodicio y Mendoza, 2004). Sin embargo, en otras situaciones, la alta homología genética en determinados géneros bacterianos no permite utilizar el 16S rRNA para la clasificación filogenética a nivel de especie (o incluso de género). En estos casos, se puede recurrir a otros genes conservados que presenten una mayor variación nucleotídica (Woese, 1987).

4.2.1. Secuenciación parcial del gen chaperona 60 (*cpn60*)

El gen chaperona 60 (*cpn60*), al ser menos conservado que el 16S rRNA se utiliza en algunos casos en donde los resultados obtenidos con este gen no son resolutivos. Las proteínas tipo chaperona son un conjunto de proteínas presentes en todas las células y cuya función es la de ayudar al plegamiento de otras proteínas, tras su síntesis o durante su ciclo de actividad (por ejemplo, en defensa de estrés térmico). Mehnaz *et al.* (2001), utilizaron este gen para el estudio taxonómico de una nueva especie del género *Sphingobacterium*, *Sphingobacterium canadense*, especie bacteriana aislada de raíces de maíz. Por lo tanto, de acuerdo con Mehnaz *et al.* (2001), se realizó la secuenciación parcial del gen *cpn60* para establecer las relaciones filogenéticas entre la cepa 6.2S y las especies más cercanas del género *Sphingobacterium*. Es de destacar que fue necesario diseñar

cebadores distintos para conseguir realizar las reacciones de PCR y de secuenciación (Artículo 2, Pág. 51). La comparación de las secuencias del gen *cpn60* mostró una menor homología respecto a los resultados obtenidos con el 16S rRNA (Artículo 2; Fig. 2; Pág. 63). Los porcentajes de similitud de la cepa 6.2S con respecto a las cepas agrupadas en el mismo cluster fueron de 85,5% con *S. thalophilum*^T, 90,3% con *S. canadense*^T y *S. multivorum*^T y 89,3% con *S. siyangense*^T. La cepa 6.2S presentó en todos los casos porcentajes de similitud inferiores al 97%. Este resultado nos muestra que nuestro aislado 6.2S no pertenece a ninguna de estas especies, y por tanto que podría ser una nueva especie del género *Sphingobacterium*. Las secuencias del gen *cpn60* del aislado 6.2S (503 pb) y *S. siyangense* SY1^T (558 bp) que se obtuvieron en este estudio fueron depositadas en la base de datos del GenBank con los números de acceso JN015214 y JN015215, respectivamente.

4.2.2. Hibridación DNA-DNA y contenido de guanina-citosina (G+C).

Los resultados obtenidos de la secuenciación parcial del gen chaperona 60 (*cpn60*) que indicaban la presencia de una nueva especie de *Sphingobacterium*, fueron confirmados mediante un análisis de hibridación DNA-DNA. El porcentaje de hibridación DNA-DNA entre nuestro aislado y las 3 especies más próximas en el árbol filogenético del gen *cpn60* (Artículo 2; Tabla 1; Pág. 59), *S. siyangense* (KCTC 22131^T), *S. multivorum* (DSM 11691^T) y *S. canadense* (LGM 23727^T), fue claramente inferior al 70% (19-39 DNA-DNA similitud), limite aceptado para la separación de especies (Wayne *et al.*, 1987). Estos resultados confirmaron que este nuevo aislado no pertenece a ninguna de las especies descritas del género *Sphingobacterium* y permitieron proponer y ser aceptada como una nueva especie de este género con el nombre de *Sphingobacterium detergens* sp. nov. con cepa tipo 6.2S^T y depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo como CECT 7938^T y en la Colección Belga BCCMTM/LMG Bacteria Collection como LMG 26465^T.

Es de destacar que cuando se realizó la hibridación DNA-DNA de *S. canadense* (LGM 23727^T) y *S. siyangense* (KCTC 22131^T) se obtuvieron valores de hibridación 66 %, muy cercanos al 70%, indicando que son bacterias muy relacionadas entre sí, próximas al limite teórico aceptado en la actualidad para la diferenciación de especies.

Por otro lado, los resultados del contenido G+C (Guanina + Citosina) obtenidos para el aislado 6.2S (40,0 mol %) fueron concordantes con los datos encontrados en la literatura para las especies conocidas del género *Sphingobacterium*. El valor

de G+C de las especies del género *Sphingobacterium* es de 39-42 mol % (Krieg *et al.*, 2010).

4.2.3. Pruebas bioquímicas y quimiotaxonómicas del aislado 6.2S

Para completar la descripción de la nueva especie se realizó un estudio más completo que incluyese pruebas morfológicas, metabólicas y quimiotaxonómicas comparando con las cuatro especies de *Sphingobacterium* más relacionadas (Artículo 2; Tabla 2; Pág. 60). Se observó que el aislado 6.2S presenta las características típicas del género *Sphingobacterium*. Sin embargo, cuando se estudiaron pruebas metabólicas como asimilación de diferentes fuentes de carbono, hidrólisis de diferentes sustratos, producción de ácido a partir de carbohidratos, crecimiento a diferentes temperaturas y concentraciones de NaCl, etc. se observaron unas diferencias que se describen en el tabla 2, Pág. 60 y que apoyan los resultados moleculares. El estudio de los ácidos grasos (Tabla 3; Pág. 61) y el perfil de lípidos (Fig. S2; Pág. 64) también situaron a este microorganismo dentro del género *Sphingobacterium*.

4.2.4. Descripción de la nueva especie *Sphingobacterium detergens* sp. nov.

Los resultados obtenidos en este estudio polifásico (fenotípico, filogenético, molecular y quimiotaxonómico) fueron de gran utilidad para confirmar que el aislado 6.2S era una nueva especie del género *Sphingobacterium*, proponiéndose como *Sphingobacterium detergens* sp. nov., ya que se caracteriza por ser productora de una mezcla de tensioactivos (Marqués *et al.*, 2012). El género *Sphingobacterium* incluye una serie de especies, muchas de las cuales se han descrito recientemente gracias a las técnicas moleculares. Las especies descritas en los últimos diez años son *S. anhuiense* (Wei *et al.*, 2008), *S. bambusae* (Duan *et al.*, 2009), *S. canadense* (Mehnaz *et al.*, 2007), *S. composti* (Ten *et al.*, 2006), *S. daejeonense* (Kim *et al.*, 2006), *S. kitahiroshimense* (Matsuyama *et al.*, 2008), *S. shayense* (He *et al.*, 2010), *S. siyangense* (Liu *et al.*, 2008), *S. wenxiniae* (Zhang *et al.*, 2011).

4.3. Optimización de la producción de BT por *S. detergens*.

El tipo, calidad y cantidad de biotensioactivos producidos por un microorganismo depende principalmente de tres factores, de la cepa bacteriana seleccionada, de la composición del medio de cultivo (fuente de carbono, fuente de nitrógeno, elementos traza, etc.) y de las condiciones de cultivo tales como pH, temperatura,

agitación, etc. Una optimización de los componentes y condiciones del medio de cultivo, se traduce a menudo en un aumento de la producción del biotensioactivo (Jiménez-Islas *et al.*, 2010). Por esta razón se optimizó la composición del medio de cultivo y se estudiaron las mejores condiciones para el crecimiento y producción de biotensioactivos por *S. detergens*. Para dicho estudio se partió del medio de sales minerales, S-MSM, medio que se empleó como cultivo inicial durante la selección de la cepa productora de BT. Con este medio de cultivo se obtenía una escasa producción de BT (extracto orgánico) y crecimiento bacteriano, 68 mg/L y 0,57 mg proteína/ml respectivamente.

Para comenzar con la optimización de los componentes del medio se preparó un medio más simple, medio G-MSM (Medio mineral de crecimiento). El estudio se inició con la optimización de la fuente de nitrógeno. Para ello se emplearon cuatro compuestos diferentes de nitrógeno, tales como fosfato de amonio, sulfato de amonio y distintas concentraciones de urea. Se observó que 6.2 S solo crecía en presencia del extracto de levadura y los mejores resultados se obtuvieron con urea (0,88 g/L), observándose un buen crecimiento y un descenso de la tensión superficial e interfacial del sobrenadante del medio (Artículo 3; Pág. 76; Fig. 1). En algunos casos la fuente de nitrógeno puede ser una clave importante para la regulación en la síntesis de biotensioactivos y por esta razón hay muchas investigaciones utilizando diferentes fuentes de nitrógeno tales como urea, peptona, extracto de levadura, sulfato de amonio, nitrato de amonio, nitrato de sodio, etc. (Jiménez-Islas *et al.*, 2010). Estudios realizados por Guerra-Santos *et al.* (1984) y Rashedi *et al.* (2005), sobre el efecto de la fuente de nitrógeno en la producción de ramnolípidos por *P. aeruginosa*, determinaron que los mayores rendimientos se obtenían al emplear nitrato de sodio respecto al sulfato de amonio, mientras que con *Arthrobacter paraffineus* se obtenía la máxima producción de BT con las sales de amonio y urea (Guerra-Santos *et al.*, 1986). De acuerdo con estos autores el resultado varía según el metabolismo de cada microorganismo y cada caso requiere una optimización particular.

A continuación se estudiaron las concentraciones óptimas de los restantes nutrientes del medio de cultivo. Para ello se eliminó el extracto de levadura de dicho medio y se utilizó urea como única fuente de nitrógeno. Como al eliminar el extracto de levadura no se había observado crecimiento se adicionó glucosa al medio G-MSM y se estudió el efecto de este componente en dicho medio. Se inició el estudio con el medio G-MSM con glucosa y sin C₁₁₋₁₃, donde se obtuvo un buen crecimiento bacteriano, pero no se produjo BT, y el medio G-MSM con glucosa y

C₁₁₋₁₃, donde se obtuvo mediante esta combinación un buen crecimiento y un descenso marcado de la tensión superficial e interfacial. Este resultado indicó que ambas fuentes de carbono son necesarias para la producción de tensioactivo y que la bacteria no es capaz de utilizar el C₁₁₋₁₃ como única fuente de carbono para su crecimiento y producción de BT (Artículo 3; Pág. 77; Tabla 1). El co-metabolismo de glucosa y C₁₁₋₁₃ resultó imprescindible en la producción de biotensioactivos donde el microorganismo utilizaría la glucosa como fuente de energía para su crecimiento y el C₁₁₋₁₃ para inducir la producción de mezcla de tensioactivos.

A pesar de la dificultad de su determinación, se estudió el descenso de la concentración de C₁₁₋₁₃ en el medio de cultivo tras 48 horas de cultivo, donde se observó un descenso del 76,7 %, pudiendo ser consecuencia de su utilización como fuente de carbono o de una acumulación intracelular. Un caso similar fue descrito por Pansiripat *et al.* (2010) ya que describió una especie del género *Pseudomonas*, *P. aeruginosa* SP4, que fue capaz de utilizar simultáneamente dos fuentes de carbono, una fuente de carbono soluble y otra insoluble en agua, viéndose un incremento considerable de la producción de BT con la utilización de ambas fuentes de carbono.

Habiendo seleccionado la fuente de nitrógeno y sabiendo que la utilización simultánea de ambas fuentes de carbono era necesaria para la producción de biotensioactivo se realizó un estudio para determinar como afectaban el resto de los componentes del medio G-MSM, donde se determinó que un aumento de la concentración de fosfatos K₂HPO₄/KH₂PO₄ de 1/0,5 a 2/1 g/L, producía un incremento en la producción de biotensioactivo y crecimiento (Artículo 3; Pág. 78; Fig. 2). Esta mejora puede deberse principalmente a la capacidad tamponante de los fosfatos, manteniendo el pH óptimo de crecimiento de la bacteria (pH:7) durante más tiempo (18h) antes de que se comience acidificar el medio de cultivo. Por otro lado, el resto de los componentes no afectaron significativamente a la producción de BT.

Posteriormente, en un estudio para determinar el efecto de diferentes fuentes de carbono, como glicerol, aceite de oliva, keroseno, C₁₁₋₁₃, C₁₃, C₁₂₋₁₄ y C₁₅ sobre la producción de biotensioactivos por *S. detergens* (Pág. 79; Fig. 3 a); Artículo 3), se determinó que con el keroseno y los diferentes *n*-alcanos, se obtenían los mejores resultados de tensión superficial y producción de extracto orgánico. En muchos casos, la adición de sustratos inmiscibles en agua, como *n*-alcanos, activa la inducción de la producción del biotensioactivo (Nitschke *et al.* 2005). Un estudio

realizado por Robert *et al.* (1989), sobre el efecto de diferentes fuentes de carbono, solubles e insolubles en agua, en la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas* sp. describió que los rendimientos obtenidos con fuentes de carbono solubles en agua eran inferiores a los obtenidos con fuentes de carbono insolubles, tales como *n*-alcanos y aceite de oliva. Por otro lado, existen otros microorganismos que producen BT cuando crecen principalmente en presencia de fuentes de carbono solubles en agua. Por ejemplo, las bacterias del género *Bacillus* sp. producen lipopépidos, biotensioactivos con propiedades antimicrobianas, cuando crecen en presencia de glucosa como única fuente de carbono en el medio de cultivo (Nitschke y Pastore, 2006).

De acuerdo con estos resultados se definieron las concentraciones óptimas para la producción del biotensioactivo, obteniéndose de esta manera el medio MCA, medio optimizado, con urea como fuente de nitrógeno y con dos fuentes de carbono (C₁₁₋₁₃ y glucosa). La composición del medio MCA en (g/L) es la siguiente: KH₂PO₄, 1; K₂PO₄, 2; CO(NH₂)₂ 0,88; CaCl₂ 0,01; FeSO₄·7H₂O, 0,01; MgSO₄·7H₂O 0,5; KCl, 1,0; elementos traza 0,05 mL; 1,5% (V/V) C₁₁₋₁₃. La modificación de la composición química del medio de cultivo inicial (S-MSM) incrementó de forma marcada la biomasa y la cantidad de extracto, de 0,57 a 3,8 mg de proteína/ml y de 68 a 250 mg/L, respectivamente.

4.3.1. Curvas de crecimiento y viabilidad de *S. detergens*

Cuando se realiza un estudio de optimización para mejorar la producción de biotensioactivo, no solo la composición del medio es importante, también la estrategia empleada en la adición de nutrientes, el control del pH del cultivo y el método de extracción pueden afectar de forma significativa al resultado.

Antes de realizar la curva de crecimiento con el medio optimizado, MCA, se intentó optimizar la extracción empleando diferentes disolventes. La extracción orgánica del BT se realizó empleando metanol, cloroformo, acetato de etilo/metanol (8:1), hexano y ter-butil-éter. Dicho estudio mostró que se obtenía una mayor cantidad de extracto tras la extracción utilizando la mezcla de acetato de etilo/metanol (8:1). Además la extracción se optimizó gracias a una previa concentración del medio por liofilización y su posterior extracción (3 veces) con acetato de etilo/metanol (8:1). Dicho proceso significó un aumento de la cantidad de extracto orgánico obtenido de 250 mg/L a 400 mg/L, valor que se multiplica por 6 desde el inicio.

Con el medio optimizado (MCA) se realizó una curva de crecimiento con *S. detergens*, donde se estudiaron como evolucionaban los parámetros de tensión superficial e interfacial, biomasa, pH, y consumo de glucosa y urea, durante 60 horas de cultivo (Pág. 81; Fig. 4; Artículo 3). Se observó que después de 30 horas de cultivo se alcanza el máximo valor de biomasa, 3,8 mg/ml y el mínimo valor de tensión superficial e interfacial, 35 mN/m y 5 mN/m, respectivamente. También se observó que el descenso de tensión superficial e interfacial coincidía con la fase exponencial de la curva de crecimiento. Además, un estudio cualitativo realizado por cromatografía en capa fina para determinar la producción BT durante las 60 horas de cultivo, indicó que la mezcla de biotensioactivos se producía durante la fase exponencial de crecimiento de *S. detergens*. De acuerdo a estos resultados se consideró que la producción de BT está asociada al crecimiento de *S. detergens*. Dependiendo del microorganismo la producción de biotensioactivos puede estar asociada a las diferentes fases de crecimiento. Por ejemplo, la biosíntesis de biotensioactivos por *B. subtilis* comenzó en la fase exponencial y continuó durante la fase estacionaria, obteniéndose en esta última fase el 50% de la producción de biotensioactivo por el microorganismo (Nitschke y Pastore, 2006). Muchos microorganismos tienen su producción de BT asociada con la fase estacionaria, como un metabolito secundario. Por ejemplo la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 se asocia principalmente a la fase estacionaria de crecimiento, incrementándose considerablemente la producción de BT en esta fase de crecimiento (Santa Anna *et al.*, 2002). Por el contrario, *B. circulans* (MTCC 8281), *L. lactis* 53 y *Streptococcus thermophilus* A (Sivapathasekaran *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2006), producen biotensioactivos en fase de crecimiento, resultado similar al encontrado con *S. detergens*.

Por otro lado, se observó que el crecimiento de la bacteria podría estar ligado a la evolución de pH, ya que entre las 18 y 24 horas de cultivo se produce una acidificación del medio, de pH 7 a 5, produciéndose a su vez un cese en el crecimiento. Algunos microorganismos pueden alterar el pH del medio como consecuencia de la producción de ácidos por la utilización de algunos carbohidratos, como por ejemplo la glucosa. Estos cambios pueden ser tan marcados que pueden llegar a inhibir el crecimiento del microorganismo (Krieg *et al.*, 2010). *S. detergens* se caracteriza por asimilar oxidativamente diferentes carbohidratos para la obtención de energía para su crecimiento y producir ácidos a partir de algunos ellos, tales como D-glucosa y sucrosa (Krieg *et al.*, 2010, Marqués *et al.*, 2012). Esta característica metabólica explicaría la acidificación que sufre el medio de cultivo tras el crecimiento de éste microorganismo.

Además, se realizó un seguimiento a la bacteria mediante microscopia electrónica durante 48 horas de cultivo (Pág. 83; Fig. 6 a), b), c); Artículo 3), que mostró una alteración de la morfología celular de la bacteria y la aparición de zonas claras en el citoplasma después de las 24 horas, indicando una posible acumulación del C₁₁₋₁₃. A las 48 horas de vio una condensación del citoplasma y una posible disrupción de la pared celular, resultado que concuerda con la baja viabilidad encontrada en la curva de viabilidad después de las 48 h de cultivo.

Por lo tanto, el cese del crecimiento y de la producción de biotensioactivo puede deberse a la acidificación del medio de cultivo, o bien a que la bacteria ha llegado a la fase estacionaria por falta de algún nutriente. Para determinar si estos dos factores afectaban al crecimiento y a la producción de biotensioactivo, se realizaron dos curvas de crecimiento, alimentando una de ellas. En dichas curvas se estudiaron los parámetros de biomasa (mg proteína/ml), viabilidad celular (ufc/ml), y pH durante 60 horas de cultivo (Pág. 83; Fig. 6 d); Artículo 3). El cultivo alimentado se mantuvo en todo momento a pH:7, mediante la adición de NaOH 1N y se adicionó urea cuando los niveles de este componente eran bajos (24 y 48 horas de cultivo). Se observó que en el cultivo normal (sin alimentar), la viabilidad celular presentaba una fuerte disminución después de las 24 horas de cultivo. Este resultado coincidió con el máximo valor de biomasa alcanzado a las 24 horas de cultivo (3,8 mg/ml) y con el descenso del pH de 7 a 5, entre las 18 y 24 horas de cultivo. Por otro lado, con el cultivo alimentado se observó que tanto el número de células viables como la cantidad de biomasa (proteína), siguieron aumentando hasta aproximadamente las 40 horas de cultivo, aumentando el valor de biomasa de 3,7 mg de proteína/ml, cultivo sin alimentar, a 4,7 mg de proteína/ml con el cultivo alimentado.

Se observó claramente que si el cultivo se mantiene a pH:7 continúa creciendo casi hasta las 35 horas y por tanto este parámetro (pH) estaría muy ligado al crecimiento de la bacteria, siendo el principal responsable de que el microorganismo pare de crecer entre las 18 y 24 horas de cultivo. Además al estudiar la producción de biotensioactivo en ambos cultivos, alimentado y sin alimentar, se observó que al alimentar el cultivo se produce un aumento en la producción de BT, de 400 mg/L con el medio MCA-lio a 466 mg/L; lo que se traduce en un aumento del 16,5%.

Finalmente comentar que los cambios realizados en la composición de algunos componentes del medio, en el modo de extracción tras liofilización del

sobrenadante, en el control del pH y en la alimentación del medio de cultivo produjeron una mejora significativa en la producción de BT por *S. detergens*. Dicha producción aumentó desde 68 mg/L que se obtenía inicialmente con el medio (S-MSM) a 466 mg/L con el medio MCA alimentado. Lo que se traduce en un aumento de producción de casi 7 veces desde el valor inicial.

4.4. Caracterización química de la mezcla biotensioactivos

4.4.1. Caracterización del extracto orgánico producido por *S. detergens*.

El análisis de los carbohidratos totales (fenol-sulfúrico), lípidos totales (determinación de lípidos totales descrito por Daniels *et al.*, 1994) y proteína total (Lowry), reveló que el extracto crudo producido por *S. detergens*, después de 48 horas de crecimiento en el medio MCA, está compuesto principalmente por un 71,6% de lípidos, seguido por un 5,6% de carbohidratos y un 4,4% de proteína. Posteriormente un estudio por cromatografía en capa fina (TLC) realizado para conocer el tipo y número de productos presentes en el extracto crudo, reveló que *S. detergens* 6.2S se caracterizaba por producir una mezcla de posibles biotensioactivos que se revelaron como fosfolípidos, lipopéptidos y un glucolípido apolar (Artículo 1; Fig. 3; Pág. 42). Algunos microorganismos pueden sintetizar simultáneamente una mezcla de biotensioactivos con distintas configuraciones moleculares, siendo muchas veces difíciles de purificar e identificar (Biria *et al.*, 2010). En un estudio similar realizado por Kretschmer *et al.* (1982) sobre la caracterización química del extracto crudo producido por *Rhodococcus erythropolis* DSM43215, se identificó una mezcla de 13 lípidos mayoritarios en el extracto, los cuales se clasificaron en lípidos polares y no polares, siendo los más abundantes los triglicéridos y los corinomicolatos de trealosa. El extracto crudo producido por *Streptococcus thermophilus* A, también fue caracterizado como una mezcla de biotensioactivos, presentando proteínas y polisacáridos en la mezcla (Rodrigues *et al.*, 2006).

Posteriormente el extracto orgánico producido por *S. detergens* fue purificado, obteniéndose dos fracciones que se denominaron fracción A, que corresponde a la parte apolar del extracto orgánico (40,0%), y fracción B, que corresponde a la parte polar del extracto (60%). Mediante un análisis por TLC y diferentes reveladores empleados para ambas fracciones se vio que la fracción A estaba formada por una mezcla de fosfolípidos mientras que la fracción B estaba formada por una mezcla de compuestos que inicialmente se identificaron como lipopéptidos y un glicolípido (Artículo 1; Pág. 42; Fig. 3). Cada componente de ambas fracciones

A y B, fueron purificados mediante una cromatografía preparativa para su posterior identificación.

4.4.2. Caracterización química de la fracción A

a) Cromatografía en capa fina bidimensional (TLC-BD)

Mediante una TLC-bidimensional realizada con la fracción A se pudo observar que los tres compuestos mayoritarios de la fracción A (A_1 , A_2 y A_3) eran una mezcla de compuestos de la misma familia. Las tres manchas A_1 , A_2 , A_3 , que parecían estar purificadas según la cromatografía en capa fina, se separaron en dos y tres compuestos después de realizar la TLC bidimensional, todos pertenecientes a la familia de los fosfolípidos (Artículo 1; Pág. 44; Fig. 5). Los compuestos de una misma familia pueden presentar la misma polaridad cuando se analizan por TLC, observándose una única mancha que no necesariamente es pura, sino que puede tratarse de mezclas dos o más compuestos. Este comportamiento hace que la caracterización completa de los compuestos de origen natural sea un reto de difícil superación. La fracción A sería el caso, ya que el compuesto A-1, se separó en dos compuestos, A-1.1 y A-1.2. El compuesto en mayor concentración (A-1.1), que reveló con Ninhidrina y azul de molibdeno, presentó una movilidad cromatográfica similar al patrón de fosfatidiletanolamina (PE), resultado que permitió su identificación. Por otro lado, el compuesto A-1.2 fue caracterizado como un fosfolípido no identificado. Otros autores también han descrito las propiedades tensioactivas de los fosfolípidos bacterianos. Kretschmer *et al.* (1982), identificaron fosfatidiletanolamina (PE) como BT en el extracto orgánico producido por *R. erythropolis*, actuando como un poderoso tensioactivo, bajando la tensión interfacial de un sistema agua/hexadecano a valores de 1mN/m. Cooper *et al.* (1979) observaron que la actividad superficial encontrada después de la fermentación con *Corynebacterium lepus*, se debía en parte a pequeñas cantidades de varios fosfolípidos producidos por esta bacteria.

Con respecto a las manchas A-2 y A-3, que también parecían estar puras según la TLC inicial, se separaron en tres manchas con un similar r_f , en A-2.1, A-2.1, A-2.1 (A-2) y en A-3.1, A-3.2, A-3.3 (A-3), después de realizar la TLC-bidimensional (TLC-BD) (Artículo 1; Fig. 5; Pag. 44). Todos los compuestos, tanto para A-2 y A-3, se revelaron con azul de molibdeno, lo que indica su carácter fosfolípido, mientras que con Ninhidrina sólo se revelan las manchas A-2.1 y A-3.1, indicando la presencia de grupos amino en estos fosfolípidos. Por lo tanto, estos resultados

pueden indicar que A-2 y A-3 podrían contener los mismos compuestos, pero en distinta concentración.

En nuestro caso esta técnica cromatográfica (TLC-BD) fue de gran utilidad para identificar el compuesto mayoritario del extracto y determinar la cantidad de compuestos que presenta la fracción A completa. Otros autores también han utilizado esta técnica para la identificación de fosfolípidos y lípidos bacterianos. Por ejemplo Cooper *et al.* (1979) utilizó la técnica (TLC-BD) para identificar seis fosfolípidos producidos por *Corynebacterium lepus*, tales como fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, fosfatidilinositol mannosido, fosfatidilglicerol fosfato, cardiolipina y fosfatidilserina.

b) Identificación de los grupos funcionales de la fracción A por espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)

Para completar la caracterización de los compuestos purificados se realizó un espectro de infrarrojos (FT-IR) (Pág. 44; Fig. 6; Artículo 1). Se observó que los espectros de las muestras A-1, A-2 y A-3 mostraban las mismas bandas de absorción. En los tres espectros se pudo observar las bandas características de los grupos aminos (N-H en $-\text{NH}_3^+$). Además se observó la presencia de los grupos $-\text{CH}_2$ y CH_3 correspondientes a las cadenas alifáticas y del enlace éster de grupos carbonilo (C=O en COOH) del BT. Cuando estos resultados fueron comparados con una base de datos se encontró una elevada similitud con los espectros de los fosfolípidos. Confirmando por lo tanto las bandas características de los fosfolípidos y la presencia de nitrógeno en cada una de las muestras.

De acuerdo a los resultados obtenidos por cromatografía en capa fina bidimensional (TLC-BD) y en concordancia a los datos del análisis de infrarrojo (IR), se puede decir que la fracción A es una mezcla de al menos cinco especies de fosfolípidos, siendo el mayoritario una fosfatiletanolamina. Probablemente muchos microorganismos tienen la capacidad de sintetizar varios biotensioactivos de la misma familia. Un ejemplo es *R. erythropolis* 51T7, el cual produce una mezcla de al menos seis trealosalípidos, entre los cuales los más abundantes son Th-Suc-C₉-C₉-C₁₀ o Th-Suc-C₁₁-C₁₀-C₇ (Marqués *et al.*, 2009). *P. aeruginosa* (47T2) también produce una mezcla de hasta 11 homólogos de ramnolípidos que contienen una o dos moléculas de ramnosa (Haba *et al.*, 2003).

c) Estudio de los ácidos grasos de la fracción A

Para identificar los ácidos grasos que forman la parte hidrofóbica de los fosfolípidos de la fracción A (A-1, A-2 y A-3), se realizó una metanólisis, hidrolizando los fracción hidrofílica e hidrofóbica (ácidos grasos). Los ácidos grasos fueron analizados por cromatografía GC-MS, identificándose tres ácidos grasos mayoritarios, ácido palmitoleico (C_{16:1}), ácido palmítico (C_{16:0}) y ácido pentadecanoico (C_{15:0}) (Artículo 1; Pág. 43-44; apartado 3.5.3). En la fracción A-1 y A-2 el ácido palmitoleico fue el ácido graso más abundante, 54,5 y 76% respectivamente. Si comparamos estos resultados con los datos obtenidos en el análisis de ácidos grasos de pared realizado con *S. detergens* (Artículo 2, Tabla 3, Pág. 61), se puede observar que los ácidos grasos predominantes de la pared celular, iso-C_{15:0} 2 OH y/o C_{16:1} *w7c* con un 43,71% (Marqués *et al.*, 2012), son similares a los ácidos grasos determinados en el extracto crudo.

4.4.3. Caracterización química de la fracción B (resultados no publicados)

De acuerdo con el estudio realizado por cromatografía en capa fina (TLC) y diferentes reveladores (reactivo Molish, ninhidrina y vapores de yodo) en la fracción B, se observaron 4 compuestos mayoritarios que se denominaron B1, B2, B3 y B4 (Anexo 1; Pág. 167; Fig. 1). Los tres primeros compuestos (compuestos mayoritarios) revelaron con ninhidrina, lo que pone de manifiesto la presencia de nitrógeno en su estructura. Cabe destacar que algunos de los compuestos de la fracción B reaccionaron con ninhidrina produciendo un color púrpura y otros un color amarillo, lo que indica la presencia tanto de aminas primarias (púrpura) ó secundarias (amarillo) (Anexo 1; Pág. 169; Fig. 6). Este resultado hizo pensar en la presencia de lipopéptidos en dicha fracción.

Los tres compuestos (B1, B2, B3) presentaron actividad superficial, descendiendo la tensión superficial a valores de 30 mN/m (Artículo 1; Pág 42; Fig. 3). El compuesto B4 responde como un glicolípido en el revelado de la TLC y en el caso de que fuese un BT, su carácter altamente apolar hace pensar que puede ser un BT muy efectivo. Pero su escasa concentración se ha pospuesto su estudio.

El estudio de espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier (FT-IR) realizado a la fracción B completa y los compuestos purificados B1, B2 y B3, originó espectros muy similares (Anexo 1; Pág. 167; Fig. 2), lo que podría indicar la presencia de compuestos de la misma familia. Las bandas de absorción de los espectros de IR indican la presencia de diferentes grupos. Se pudo observar dos

bandas intensas, una a 3254 cm^{-1} y otra aproximadamente a 1600 cm^{-1} que corresponden a la presencia de nitrógeno en su estructura. Un pico a 2934 cm^{-1} que se atribuye a la presencia de los grupos $-\text{CH}_2$ y CH_3 de las cadenas alifáticas. También se detectó una banda de baja intensidad de absorción a 1771 cm^{-1} y una banda simétrica a 1414 cm^{-1} , indicando la presencia de ésteres de grupos carbonilo ($\text{C}=\text{O}$ en COOH) en el BT (Anexo 1; Pág. 168; Fig. 3).

Para confirmar o descartar la presencia de lipopéptidos en la fracción B, se realizó un estudio mediante una hidrólisis y posterior determinación de aminoácidos por HPLC (Pág. 166; Anexo 1). Dicho estudio indicó que los compuestos de la fracción B no presentaban aminoácidos ni enlaces peptídicos, indicando por lo tanto, que los compuestos de la fracción B no pertenecen a la familia de los lipopéptidos, y que corresponderían a una mezcla de lípidos nitrogenados (resultados no presentados).

Por otro lado, una hidrólisis ácida realizada a la fracción B para hidrolizar los ácidos grasos (cola apolar) de la cabeza polar de los compuestos de esta fracción, indicó que hay una mayor proporción en peso de la parte hidrofílica (polar) que de la parte hidrofóbica (apolar), en una relación 10:1. Esta proporción explicaría la alta polaridad y CMC que presenta esta fracción. Posteriormente el estudio de los ácidos grasos realizado en la fase orgánica de la fracción B completa, determinó presencia tres ácidos grasos, hexadecanoico (C_{16}), palmítico (C_{15}) y otro ácido graso mayoritario sin identificar, pero por el aspecto del espectro podría tratarse de un ácido graso ramificado. El IR realizado con la fracción hidrofóbica de la fracción B confirmó la presencia de cadenas alifáticas con 2 bandas intensas a 2954 y 2851 cm^{-1} y otra banda a 1738 cm^{-1} correspondiente al enlace ester de los ácidos grasos. En este espectro no se observaron las bandas características de la presencia de nitrógeno y por tanto se confirma que los compuestos nitrogenados presentes en la fracción B se encuentran en la parte hidrofílica de la muestra (Anexo 1; Pág. 168; Fig. 4). Finalmente, un análisis elemental realizado a la fracción B completa y sus purificados, también confirmó la presencia de nitrógeno en la estructura.

Los espectros de masas (m/z) obtenidos a partir del estudio realizado por cromatografía ESI-MS (Ionización por Electrospray-Espectrometría de Masas) de la fracción B completa, mostraron una serie de 13 picos, muy repetitivos entre un análisis y otro. Las masas de dichos picos son (m/z): 261, 305, 349, 393, 437, 481, 525, 569, 613, 657, 701, 745 y 789, y presentando una diferencia características entre masas de 44 m/z (Pág. 168; Anexo 1; Fig. 5). Debido a la técnicas empleadas (MALDI-TOF, ESI-electrospray) y a las condiciones cromatográficas, es poco

probable que estas masas correspondan a fragmentos de moléculas más grandes, y que por lo tanto, todas estas masas podrían corresponder a los pesos moleculares (m/z) de esta familia de compuestos. Los ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* 47T2, por ejemplo, producen una mezcla de hasta 11 homólogos de ramnolípidos (RL_{47T2}). Estos RL difieren entre un homólogo y otro por los largos de cadena y/o por el número de moléculas de ramnosa que contienen, observándose de esta manera pérdidas (m/z) características entre un homólogo y otro (Haba *et al.*, 2003). En nuestro caso, la repetitiva diferencia de masa (44 m/z) observada en los espectros de ESI-MS y MALDI-TOF, podrían indicar la presencia de una familia de compuestos que difieren entre ellos por la presencia o ausencia de alguna estructura con masa 44 m/z . El valor de esta masa haría pensar que estas diferencias podrían corresponder a diferencias en los largos de las cadenas alifáticas de los compuestos. Sin embargo, al realizar una búsqueda en la base de datos con la masa exacta (44,0267 m/z), se pudo observar que esta masa correspondería a un polietilenglicol (C₂H₄O). Este resultado sería poco probable debido a la naturaleza bacteriana del producto, ya que en la actualidad no se han descrito biotensioactivos con este tipo de estructuras.

Entre los biotensioactivos descritos, los compuestos que podrían tener mayor similitud con la fracción B son los flavolípidos. Estos compuestos son un grupo de nuevos BT sintetizados por microorganismos de género *Flavobacterium* sp., género filogenéticamente cercano al género *Sphingobacterium* (Krieg *et al.*, 2010), y descritos por Bodour *et al.* (2004). Las bacterias de este género se caracterizan por producir una mezcla flavolípidos, y que difieren entre ellos por los largos de sus cadenas alifáticas. La estructura de los flavolípidos se caracterizan por presentar una cabeza polar formada por dos moléculas de cadaverinas (grupos amino) unidas entre si por una molécula de ácido cítrico, y una parte apolar con dos cadenas de ácidos grasos con largos comprendidos entre 6 a 10 carbonos. Son biotensioactivos que igual que la fracción B presentan una CMC relativamente alta (300 mg/L) en comparación a otros BT (ramnolípidos CMC entre 27-40 mg/L; trealosolípidos entre 4-15 mg/L; surfactina 10 mg/L) (Bodour *et al.*, 2004). Además, son compuestos que presentan una proporción en peso de la cabeza polar mucho mayor que la cola apolar. En la actualidad se sigue intentando dilucidar la estructura química de los componentes de esta fracción (B) y que presentan propiedades tan interesantes.

De acuerdo con estos resultados se puede concluir que la mezcla de biotensioactivos presentes en la fracción B, podría corresponder a una mezcla de lípidos nitrogenados de la misma familia con un alto carácter polar, debido

principalmente a la proporción de ambas fracciones (fracción polar más grande que la fracción apolar) y con un alto contenido de nitrógeno en la estructura. De acuerdo con Ortiz *et al.* (2010) los compuestos de esta fracción podrían presentar una forma molecular de cono invertido, donde la cabeza polar es mucho más grande que la parte hidrofóbica. Algunos ejemplos de estructuras con estas características son los lisofosfolípidos, detergentes y fosfolípidos con gran repulsión entre grupos polares. Los di-ramnolípidos producidos por *Pseudomonas* sp. también presentan esta forma molecular, observándose además que al comparar los valores de CMC con otros ramnolípidos publicados, estos presentan una CMC relativamente alta (0,11 mM, 71,5 mg/L), presentando propiedades como detergentes (Ortiz *et al.*, 2010).

4.5. Propiedades fisicoquímicas de los tensioactivos producidos por *Sphigobacterium detergens*.

Las propiedades fisicoquímicas más interesantes de los tensioactivos, están asociadas principalmente a su carácter anfipático, el cual les confiere la capacidad de bajar la tensión superficial y formar emulsiones de dos fases inmiscibles. Tales características les confieren propiedades interesantes que hacen de los tensioactivos uno de los productos más versátiles en procesos químicos (Desai y Banat, 1997). Desde un punto de vista fisicoquímico, cinco propiedades caracterizan a los tensioactivos: la concentración micelar crítica (CMC), la capacidad emulsionante, la capacidad de formar agregados, el balance hidrofílico-hidrofóbico (HLB) y la formación de cristales líquidos.

4.5.1. Estudio de la concentración micelar crítica (CMC)

La concentración micelar crítica (CMC) es un parámetro característico de cada tensioactivo y es utilizado para medir la eficiencia de un tensioactivo. Para calcular este valor se determinaron las curvas de tensión superficial en función de la concentración de biotensioactivo del extracto completo y sus correspondientes fracciones, A y B. La fracción A reduce la tensión superficial a 33 mN/m y presenta una CMC de 0,18 g/L. El perfil de la curva puede considerarse normal dentro de las respuestas que presentan los tensioactivos (Artículo 1; Pág. 41; Fig. 2C). El extracto completo reduce la tensión superficial a 22 mN/m y presenta una CAC de 2,05 g/L y una CMC de 4,9 g/L. La fracción B reduce la tensión superficial a 23 mN/m y presenta una CAC de 2,7 g/L y una CMC de 6,3. De acuerdo con estos resultados, las curvas de tensión superficial en función de la concentración del tensioactivo, obtenidas con el extracto completo y la fracción B presentaron un comportamiento

diferente, ya que se observaron en ambos casos dos mesetas (Artículo 1; Pág. 41; Fig. 2 a y b). Inicialmente se pensó que la presencia de la mezcla de tensioactivos inducía primero la adsorción en la superficie de un tipo de estos compuestos, responsable de una meseta y posteriormente los restantes. Después de realizar pruebas en el laboratorio con una mezcla de tensioactivos de características similares (reducción similar de la tensión superficial), no se pudo reproducir el resultado que se obtuvo experimentalmente con el extracto completo y fracción B, ya que solo se modificaba el perfil o la pendiente de las curvas halladas y no se presentaban la doble meseta tal como ocurre en nuestro caso (datos no publicados). De acuerdo con Bell *et al.* (2007), una posible explicación a este fenómeno podría estar relacionada con la presencia de una impureza (restos de proteína en el extracto) que podría formar un polímero al mezclarse con el tensioactivo. El autor plantea que la primera inflexión de la curva de tensión superficial/concentración corresponde a la concentración de agregación crítica (CAC), punto en el cual se comienzan a adsorber el tensioactivo/proteína (T/P) en la superficie. Al ir aumentando la concentración de (T/P) la tensión superficial permanecería constante hasta el punto que la superficie quedara saturada de T/P, produciéndose un descenso brusco de la tensión superficial, segunda inflexión. Esto se debe a que el tensioactivo desplaza a la proteína por ser más hidrofóbico. La presencia de casi un 5% de proteína en el extracto completo podría apoyar su efecto sinérgico como impureza, tanto en el extracto completo como fracción B.

Por último, mencionar que los dos parámetros fundamentales que definen a un tensioactivo son: la eficacia, que corresponde a la máxima disminución de tensión superficial o tensión interfacial que produce, y la eficiencia, que esta relacionada con el valor de la CMC, y es la cantidad mínima de tensioactivo que produce ese descenso máximo (Jiménez Islas *et al.*, 2009). De acuerdo con estos conceptos se puede decir que la fracción A es mucho más eficiente que la fracción B (CMC_A 0,18 g/L y CMC_B 6,3 g/L), ya que se necesita mucha menos cantidad de producto para bajar la tensión superficial a valores bajos (33 mN/m). Sin embargo, la fracción B es mucho más eficaz en bajar la tensión superficial que la fracción A, teniendo la capacidad de bajar la tensión superficial a valores de 23 mN/m casi 10 unidades menores que los que se obtienen con la fracción A. Es de destacar que la mezcla de BT producidos por *S. detergens* (6.2S) es la mezcla de BT más eficaz descrita en la literatura en la actualidad, ya que es capaz de reducir la tensión superficial a 22mN/m. El hecho que un tensioactivo sea muy eficiente es importante a nivel industrial, ya que se necesita menos cantidad de producto, reduciéndose los costes.

Si comparamos los valores de CMCs del biotensioactivo producido por *S. detergens*, extracto completo (4,9 g/L), fracción A (0,18 g/L), fracción B (6,3 g/L), con otros biotensioactivos, tales como trealosalípidos producidos por *Rhodococcus* sp., CMC: 0,039g/L, ramnolípidos de *P. aeruginosa* AT10, CMC: 0,12 g/L, y lichenisina producido por *Bacillus licheniformis*, CMC: 0,012 g/L (Marqués *et al.*, 2009; Haba *et al.*, 2003; Satpute., 2010) se puede decir que solo la fracción A presenta valores similares de eficiencia. La fracción B se caracterizó por ser poco eficiente, pero, tal y como hemos comentado anteriormente, la más eficaz que ha sido descrita hasta el momento.

4.5.2. Estabilidad del biotensioactivo e índice de emulsificación del sobrenadante del medio de cultivo de *S. detergens*

Con el sobrenadante del medio de cultivo, después 48 horas de cultivo y libre de células, se estudió la estabilidad del biotensioactivo tras el tratamiento térmico de la muestra a diferentes temperaturas, durante 30 min. (Artículo 1; Pág. 40; Fig. 1). Se observó que los valores de tensión interfacial y superficial no se modificaban de forma significativa después del tratamiento, y que sólo se producían cambios en la actividad superficial a 120°C (temperatura de esterilización), observándose un mayor descenso de los valores de tensión superficial e interfacial. Resulta difícil explicar el aumento de la actividad superficial después del tratamiento térmico a 120°C. Una posible explicación a este fenómeno podría ser que a altas temperaturas la mezcla de biotensioactivos podría fragmentarse en trozos de menor de tamaño, como por ejemplo restos de ácidos grasos, aumentando de esta manera la concentración de compuestos que se adsorben en la superficie y obteniéndose valores de tensión superficial e interfacial más bajos. Un estudio realizado por Lotfabad *et al.* (2009) también describió un biotensioactivo con propiedades termoestables y con interesantes propiedades emulsionantes, observándose una estabilidad del BT en un amplio rango de temperatura. En nuestro caso la capacidad emulsionante (%E₂₄) no se vio afectada en un rango de temperaturas comprendidas entre 0 a 100°C, manteniéndose el porcentaje de emulsión inicial (70%) durante 24 horas. Sin embargo, tras un tratamiento térmico de 120°C, se observó una fuerte disminución del porcentaje de emulsión, de 65 a 25% después de un día. De acuerdo con estos resultados se puede decir que el biotensioactivo es termoestable en un amplio rango de temperatura (0-100°C), pero que a temperaturas cercanas a la esterilización (121°C) se ve afectada la capacidad emulsionante.

También se estudió la respuesta del biotensioactivo presente en el sobrenadante a diferentes pHs. Para ello el pH del sobrenadante fue ajustado a valores de 1, 3, 5, 7, 9 y 12, calculando posteriormente la tensión superficial e interfacial y los valores de %E₂₄ (Artículo 1; Pág. 40; Fig. 1). De acuerdo a los resultados obtenidos se puede decir que los valores de tensión superficial e interfacial se mantienen sin cambios a pH 1, 3 y 5 (37 y 10 mN/m respectivamente), pero a valores de pH superiores a 5 se observa una reducción de la actividad superficial. Este cambio puede estar relacionado con el pKa del extracto completo (5,21±0,05, obtenido por valoración con NaOH), valor próximo al pKa de los ácidos carboxílicos. De acuerdo con este resultado, la forma iónica del biotensioactivo del sobrenadante, presente a pH 7 o superior presenta menor actividad superficial. En cuanto a la actividad emulsionante, a diferentes pH prácticamente no se modifica, encontrándose en todos los casos en un rango próximo al 70%.

Finalmente se estudió la estabilidad de la emulsión durante 1 mes a 25°C, pH 5 y utilizando un patrón de SDS al 1% (Artículo 1; Pág. 40; apartado 3.3). Se observó que el porcentaje de emulsión inicial (70-65%) se mantuvo constante durante 5 días y que solo después de un mes se observó un pequeño descenso (60-65% emulsión). Un criterio para identificar bioemulsionantes es su capacidad de mantener al menos el 50% del volumen original de la emulsión tras 24 h de su formación (Portilla-Rivera *et al.*, 2008). De acuerdo con este criterio la mezcla de BT del sobrenadante del medio de cultivo tiene propiedades emulsionantes, aunque esta propiedad se debe confirmar con el extracto purificado. La formación y propiedades de una emulsión dependen de sus componentes, proporción y condiciones físicas aplicadas en su preparación. El estudio de la formación de emulsiones es frecuente, pero su estabilidad varía mucho según el tipo de tensioactivo que se trate. Lotfabad *et al.* (2009), caracterizaron un biotensioactivo producido por *Pseudomonas aeruginosa* MR01, el cual mostraba un máximo de actividad emulsionante (70%) con hexadecano, manteniéndose este porcentaje estable por más de 5 meses, mientras que con aceite de oliva fue menos efectivo. Haba *et al.* (2003) estudiaron la actividad emulsionante de una mezcla de ramnolípidos (RL), obteniendo un 50-80% de emulsión con keroseno que colapsó en una semana, y 90% y 78% de emulsión con aceite de linaza y aceite de oliva que se mantuvieron por una semana.

La estabilidad de los tensioactivos a los diferentes tratamientos físicos y químicos, es de suma importancia por las potenciales aplicaciones de estos compuestos en diferentes procesos industriales donde se utilizan condiciones extremas de temperaturas y pH, como por ejemplo la industria alimentaria. Si bien estos

resultados son preliminares y se necesitan más estudios, se puede decir que el biotensioactivo producido por *S. detergens* presenta una gran estabilidad en un amplio rango de temperatura y que es muy estable a pH bajos.

4.5.3. Efecto del pH en la CMC del extracto crudo

Para estudiar el efecto del pH sobre la concentración micelar crítica (CMC) del extracto crudo, fue necesario determinar previamente el pKa del biotensioactivo. Para ello se realizó una valoración ácido-base con NaOH, obteniéndose un valor de constante de acidez de pKa 5,21. Dos unidades superiores al pKa, a pH 7, más del 98% de las moléculas estarán cargadas negativamente, mientras que dos unidades por debajo del pKa, a pH 3, más del 98% de las moléculas serán neutras (Ishigami *et al.*, 1987). De acuerdo con el valor de pKa obtenido, se estudió el efecto del pH sobre el BT a tres pHs, a pH 7 que corresponde a la forma ionizada, a pH 5 que corresponde con el pK de la muestra y a pH 3 que corresponde a la forma no ionizada. De los resultados de la curva de tensión superficial/concentración de BT se pudo observar que el pH afecta de forma marcada en los resultados (Artículo 3; Pág. 88; Fig. 11), fenómeno que ya se había observado al estudiar el sobrenadante del medio de cultivo. A pH 7 el extracto es menos efectivo en bajar la tensión superficial, llegando a valores de tensión superficial superiores a 40 mN/m. Conforme se desciende el pH la mezcla de BT es más efectiva y a pH 5 se observa un comportamiento en forma de meseta con dos puntos de inflexión, efecto que ya se ha comentado anteriormente. Finalmente a pH 3, se obtiene el comportamiento habitual, y obteniéndose una disminución marcada del valor del valor de CMC de 4,9 a 0,9 g/L. Además, se observó un aumento en la actividad superficial, alcanzándose valores de tensión superficial a niveles inferiores a 30 mN/m. La explicación más plausible es que la presencia de repulsiones electrostáticas entre las moléculas del biotensioactivo cargadas negativamente y su mayor solubilidad (pH:7) hace más difícil su asociación en agregados micelares si lo comparamos con las moléculas neutras presentes a pH 3,0. Un fenómeno similar fue encontrado por Sánchez *et al.* (2010), ya que soluciones de di-ramnolípidos (diRL) cargadas negativamente, presentaron un valor de tensión superficial (γ_{TS}) mucho más alto (un orden de magnitud) que las de la especie sin carga.

4.5.4. Efecto de la fuerza iónica en la CMC del biotensioactivo

El estudio del efecto de la fuerza iónica (NaCl) sobre la CMC del biotensioactivo, confirmó los resultados anteriores. Mientras que a pH 3 no se vio afectada la actividad superficial por la fuerza iónica entre 0-400 mM de NaCl, a pH 7 la CMC se

redujo al aumentar la fuerza iónica en el mismo rango de concentraciones (Pág 89; Fig. 12). Este comportamiento es consecuencia de la presencia de moléculas neutras del biotensioactivo a pH 3 y cargadas negativamente a pH 7. Según Rosen (2004) este comportamiento es el esperado en tensioactivos iónicos. Resultados similares fueron encontrados por Sánchez *et al.* (2010) al realizar un estudio sobre el efecto de la fuerza iónica en la CMC del di-ramnolípido (diRL), donde se observó que a pH 4,0 la CMC no fue afectada por la fuerza iónica entre 0-500 mM de NaCl, mientras que a pH 7,4 la CMC se redujo drásticamente al aumentar la fuerza iónica en el mismo rango. Este comportamiento esperado también confirmó la presencia de moléculas neutras de diRL a pH 4,0 y cargadas negativamente a pH 7,4.

4.5.5. Estudio mediante microscopia con filtro de luz polarizada, dispersión de rayos X (SAXS) y modelaje molecular

Para determinar el tipo de agregados que forman el extracto completo y sus dos fracciones A y B, se realizó inicialmente un estudio mediante un microscopio con filtro de luz polarizada, a temperatura ambiente (25°C). Se observó que tanto el extracto completo como la fracción A presentan birrefringencia bajo el microscopio con luz polarizada, poniéndose de manifiesto la formación de cruces de malta y estructuras mielínicas características de la formación de cristales líquidos en fase laminar (Rosevear, 1968). Los tensioactivos generalmente tienden a formar cristales líquidos en fase laminar a altas concentraciones, mientras que en soluciones diluidas tienden a formar vesículas (Sánchez-Martínez., 2010). Algunos autores indican que la presencia de cristales líquidos en sistemas de tensioactivos aumenta la estabilidad de las emulsiones, previniendo el colapso de las gotas y promoviendo la solubilización de aceites en agua (Vogt Singer *et al.*, 1990). Por otro lado, la fracción B no presentó birrefringencia bajo el microscopio con luz polarizada, observándose la formación de cristales tras el secado de la muestra a temperatura ambiente.

Los resultados obtenidos del análisis de dispersión de rayos X y posterior modelaje, fueron concordantes con el estudio previo de microscopía realizado con los biotensioactivos. Se observó que la fracción A y el extracto completo, mostraban resultados similares con ambas técnicas (Artículo 3; Pág. 87; Fig. 10). Las dos muestras se ajustaron a un modelo de bicapa tal como describen Pabst *et al.* (2000) y Morán *et al.* (2005). Además, se observó después del modelaje que las bicapas formadas por la fracción completa y fracción A presentaban un núcleo hidrofóbico de 1,5 nm de grosor, pudiendo indicar este valor que las cadenas alifáticas pueden estar interdigitadas y presentar entre 14-18 átomos de carbono.

El incremento de temperatura no produjo una diferencia significativa en la intensidad de la dispersión, siendo el grosor de la bicapa de 5,0 nm. Por otro lado, la fracción B presentó una baja intensidad en el análisis por SAXS, por lo que no se pudo definir un modelo de estructura. La alta CMC y polaridad presentada por la fracción B hace pensar que los BT presentes podrían formar micelas de tamaño pequeño, con dificultad para organizarse en formar de bicapas u otro tipo de estructuras complejas características de los tensioactivos.

4.5.6. Estudio de la distribución del diámetro de partícula y potencial ζ del biotensioactivo

Las soluciones del extracto completo y de las fracciones A y B purificadas fueron estudiadas con más detalle. Los agregados formados se caracterizaron con su radio hidrodinámico y potencial ζ . El potencial ζ es un importante parámetro para describir el comportamiento electrostático de partículas. Además, gracias a este parámetro es posible predecir los posibles comportamientos de una dispersión como por ejemplo su posible aglomeración, sedimentación o suspensión de partículas (Marsalek, 2012). Según Marsalek (2012), las partículas que presentan valores de potencial ζ entre -30 mV y +30 mV tienden a aglomerarse y precipitar, siendo más marcado este efecto el punto isoeléctrico (potencial ζ igual a cero (mV)). A valores superiores o inferiores a este rango (-30 mV y +30), las suspensiones presentan una mayor estabilidad. Al estudiar el potencial ζ con los biotensioactivos producidos por *S. detergens*, se observó que no había una dependencia aparente en función de la concentración de BT. Todos los valores hallados, tanto para el extracto completo y las fracciones A y B, se encontraron dentro de un valor promedio de potencial ζ de -57 ± 9 mV. El signo negativo (-) de este parámetro nos indicó la carga global de los compuestos, es decir, que la mezcla de biotensioactivos producidos por *S. detergens*, se comportan como biotensioactivos aniónicos. Este resultado concuerda con el carácter aniónico ya descrito en el estudio del efecto del pH y la fuerza iónica recientemente comentado.

Al estudiar el efecto de la concentración sobre el tamaño de partícula, la fracción A mostró una dependencia con respecto a la concentración del BT (Pág. 85; Fig. 7). Las dispersiones de la fracción A eran demasiado turbias para ser medidas a concentraciones superiores a 0,1 g/L. La baja concentración a la cual la fracción A produce una razonable intensidad de dispersión es sorprendente, particularmente si comparamos estos resultados con el valor de la CMC obtenida de la estabilización de la solución de la tensión superficial (0,01 frente a 0,2 g/L). Esto podría significar que las moléculas responsables del descenso de la tensión superficial y de los

objetos medidos por dispersión de luz pueden ser diferentes. Esta característica de agregación al aumentar la concentración del BT es un comportamiento esperado en los compuestos anfipáticos. Los tensioactivos forman agregados moleculares, micelas, bicapas, vesículas, etc en disolución a concentraciones superiores a un determinado valor, generalmente sobre concentración micelar crítica (CMC) (Murigari *et al.*, 2003). Sin embargo, el extracto completo y la fracción B, el tamaño de partícula fue independiente de la concentración de BT a concentraciones inferiores a 12 g/L. Lozano *et al.* (2009), atribuyen este comportamiento a la formación de vesículas estables en agua.

Posteriormente se estudió el efecto del pH sobre el potencial ζ y diámetro de partícula. Se observó una neutralización del potencial ζ a pH 3 para la fracción apolar y a pH 2 o inferior para la fracción completa y polar (Artículo 3; Pág. 86; Fig. 8 a), resultado que está ligado con el incremento del tamaño de partícula (Artículo 3; Pág. 85; Fig. 8 b). El incremento de la partícula se atribuye a que a pH 3 o inferior las moléculas están sin ionizar favoreciendo de esta manera la agregación y no una repulsión de las moléculas como sucedería a pHs superiores con moléculas cargadas negativamente. Es sorprendente observar que estos valores difieren de forma marcada con el valor del pKa previamente calculado por una valoración ácido-base. Una posible explicación para esta observación podría venir por diferencias entre el pKa medido y el pKa intrínseco de los grupos cargados, es decir, un cambio como consecuencia de la agregación. Además, no se debe olvidar que el trabajar con mezclas de origen biológico dificulta mucho las medidas y especialmente su interpretación.

4.5.7. Estudio de la solubilidad del extracto

Para estudiar la solubilidad del extracto orgánico se utilizaron diferentes disolventes con distinta polaridad, tales como agua, etanol, acetonitrilo, acetato de etilo, cloroformo y finalmente n-hexano. Se observó que el extracto orgánico es muy soluble en disolventes polares tales como metanol y etanol; seguido por acetato de etilo y agua. Desde el punto de vista industrial y medioambiental, está muy valorado que los productos, puedan solubilizarse en disolventes con nula o baja toxicidad como el agua. La fracción A presenta una mayor afinidad en disolventes apolares, como el cloroformo. Sin embargo, en agua esta fracción forma una dispersión lechosa bastante estable (no precipita). Por otro lado, la fracción polar del extracto completo (fracción B), presenta una mayor afinidad con disolventes polares, como agua y metanol.

A partir de la solubilidad en agua de los extractos orgánicos, y de su aspecto se hizo una estimación del HLB de acuerdo con Rosen (2004). A la fracción A, que forma una dispersión lechosa en agua, le correspondería un valor de HLB entre 8-6. Los tensioactivos que presentan dicho HLB se caracterizan por presentar buenas propiedades como humectantes. Este resultado se corresponde con los valores de HLB descritos en la bibliografía para los fosfolípidos (Hasenhuettl y Hartel, 2008), La fracción B que forma solución traslúcida en agua, y de acuerdo con Rosen (2004) presentaría un valor de HLB entre 14-20. Los compuestos que presentan dicho HLB se caracterizan por poseer propiedades detergentes.

Bergenstahl. (2008) al igual que Rosen (2004), estableció una relación directa del valor de HLB con el aspecto de la solución en agua, pero además observó que existía una relación entre el tipo de agregado formado (micela, vesícula, etc.) y el aspecto de la solución. Describió que un tensioactivo que tiene la capacidad de agregarse en forma de bicapas, presenta un aspecto de dispersión lechosa en agua y valores de HLB comprendidos entre 7-10, mientras que los tensioactivos que forman soluciones claras en agua se caracterizan por formar micelas en agua y presentar valores de HLB mayores a 13.

4.6. Propiedades biológicas del biotensioactivo producido por *S. detergens*

Algunos biotensioactivos pueden presentar propiedades interesantes como actividad antimicrobiana y antitumoral, pero a su vez pueden producir irritación dérmica u ocular. (Lang y Waner, 1993; Zaragoza *et al.*, 2010; Seydlová y Svobodová, 2008). Por esta razón en la actualidad existe una intensa actividad investigadora dirigida a la identificación y caracterización de nuevos biotensioactivos (Rodrigues *et al.*, 2006). Para estudiar las posibles aplicaciones de los biotensioactivo producidos por *S. detergens* en biomedicina y cosmética, se estudió el efecto de los tensioactivos sobre diferentes tipos de células

4.6.1. Efecto del biotensioactivo sobre los eritrocitos (hemólisis)

Debido a la potencial aplicación de los biotensioactivos en productos de consumo, tales como cosméticos, productos farmacéuticos o como aditivos alimenticios es necesaria una caracterización apropiada de sus posibles acciones toxicas laterales. Por esta razón se ha estudiado la actividad hemolítica de las fracciones A y B (apolar y polar). Inicialmente se estudió el porcentaje de hemólisis de diferentes concentraciones de biotensioactivo, próximas a la CMC (Pág. 102; Fig. 3.1 a y b; Artículo 4). Se observó que ambas fracciones estudiadas presentaban actividad

hemolítica, siendo del 100% en la fracción A y del 83% en la fracción B, tras una hora de contacto. Además se observó que la liberación de hemoglobina era dependiente de la concentración de biotensioactivo, ya que a mayor concentración de BT se produjo una mayor actividad hemolítica. La curva de hemólisis vs concentración de biotensioactivo la fracción A se ajustó bien a una ecuación lineal, mientras que la fracción B tuvo un comportamiento sigmoidal. Si se compara la r obtenida en cada curva (%hemólisis/concentración BT) la fracción A tiene una tasa de hemólisis 115 veces superior que la fracción B.

Con respecto al posible mecanismo de hemólisis, los diferentes comportamientos obtenidos con las dos fracciones podrían indicar diferencias con respecto a sus mecanismos. El comportamiento lineal presentado por la fracción A en la cinética de hemólisis es indicativo, según Sánchez *et al.* (2010), de un mecanismo lítico, es decir, una disrupción directa de la membrana a través de su solubilización. El comportamiento sigmoidal que presenta la fracción B podría deberse a un mecanismo osmótico-lítico, similar a los obtenidos con los trealosalípidos producidos por *Rhodococcus* sp. (Zaragoza *et al.*, 2010). Este comportamiento necesita acumular una cantidad de BT en la membrana de los eritrocitos antes de inducir la lisis por un mecanismo osmótico. Es decir, primero hay adsorción del tensioactivo a la monocapa externa de la bicapa de las membranas, seguido por la formación de poros y la salida de solutos de bajo peso molecular (Zaragoza *et al.*, 2010).

Además, la cinética de hemólisis realizada con concentraciones crecientes de la fracción A (0,05-0,10 g/L) (Pág. 103; Fig. 3.2), mostró que la velocidad de hemólisis aumentó considerablemente a concentraciones más altas del BT, alcanzándose el máximo de liberación de hemoglobina (100%) más rápido en dichas concentraciones que en las concentraciones más bajas. Si comparamos la cinética de hemólisis descrita con di-ramnolípidos (Sánchez *et al.*, 2010) y con trealosalípidos (Zaragoza *et al.*, 2010) vemos que la velocidad de hemólisis presentada por la fracción A y la fracción B son inferiores a las descritas con dichos biotensioactivos. En los dos trabajos anteriormente citados se trabajó a concentraciones inferiores a sus CMCs. Por lo tanto, si se comparase la hemólisis de las fracciones A y B a concentraciones equivalentes a las usadas con los otros BT las diferencias serían aún más marcadas.

De acuerdo con estos resultados se puede decir que la mezcla de biotensioactivos producidos por *S. detergens* induce la hemólisis en eritrocitos de conejo. Esta

acción hemolítica podría parecer en principio negativa para futuras aplicaciones en productos de uso humano y por tanto son necesarias más investigaciones para determinar si disminuyendo las concentraciones utilizadas de estos productos su actividad deseada (emulsionante o estabilizante) se mantiene, pero estos efectos colaterales indeseables se minimizan.

4.6.2. Estudio de citotoxicidad del BT sobre queratinocitos y fibroblastos (IC₅₀)

Para estudiar el potencial efecto irritante dérmico del biotensioactivo se emplearon dos líneas celulares, fibroblastos (3T3) y queratinocitos (HaCaT), utilizando dos ensayos de citotoxicidad *in vitro*: el ensayo de reducción de la sal de tetrazolio (MMT) y la captación de rojo neutro (NRU). Los ensayos de citotoxicidad están entre los métodos más comunes utilizados para predecir la toxicidad de sustancias en varios tejidos y tipos celulares (Benavides *et al.*, 2004a, 2004b). Para realizar el estudio se pusieron los dos tipos de células 24 h en contacto con las dos fracciones de tensioactivo y se utilizó SDS al 1% como control. Posteriormente se midió la viabilidad celular por los dos métodos (Pág. 105; Tabla 3.1; Fig. 3.3). Se observó que la fracción B era mucho menos citotóxica que la fracción A, ya que presentó valores de IC₅₀ mayores que la fracción apolar (A). Además, las dos fracciones presentaron valores de IC₅₀ mayores que el tensioactivo de referencia, el SDS. Estos resultados indican que las dos fracciones de BT producidos por *S. detergens*, presentan una menor acción irritante dérmica que el SDS.

Adicionalmente, se observó que el ensayo del NRU era la mejor técnica para determinar la citotoxicidad de las fracciones A y B. Los resultados obtenidos mediante el método del MTT presentaron una enorme variabilidad, si tenemos en cuenta los valores de error estándar obtenidos. Este hecho nos hizo dudar de la idoneidad de este marcador para valorar la citotoxicidad de este tipo de compuestos.

Por otro lado, al comparar resultados de IC₅₀ (NRU) obtenidos en este trabajo con los obtenidos con otros biotensioactivos como los trealosalípidos (Marqués *et al.*, 2009) y los ramnolípidos (Benincasa *et al.*, 2010), se observó que la fracción B, es mucho menos citotóxica que dichos tensioactivos, tanto con fibroblastos como con queratinocitos. Las diferencias de citotoxicidad (IC₅₀) obtenidas con otros BT podrían deberse a diferencias de estructura química, carga, o bien a diferencias en las CMCs de los compuestos.

De acuerdo con los resultados de la IC_{50} se puede decir que los biotensioactivos producidos por *S. detergens*, presentan un efecto citotóxico menor el SDS y, por tanto, un menor potencial irritante para la piel. En ese sentido, podrían constituir una posible alternativa en formulaciones galénicas o cosméticas.

4.6.3. Estudio del efecto de los biotensioactivos producidos por *S. detergens* sobre la proliferación de células intestinales Caco-2: inducción de la apoptosis.

Se estudió el efecto de las dos fracciones de BT sobre la proliferación de células epiteliales de cáncer de colón (Caco-2). Estas células constituyen un modelo *in vitro* extensamente utilizado en estudios relacionados con los procesos de proliferación y diferenciación del epitelio intestinal. Se observó que después del tratamiento de las células Caco-2 con concentraciones de ambos biotensioactivos, conforme se incrementaba la concentración de biotensioactivo (fracción A y B) el número de células viables disminuía, y siendo más marcado este efecto con la fracción B (Pág. 107-108; Fig. 3.4 y 3.5). Cabe destacar que en ambos casos la reducción del número de células viables no puede atribuirse a un efecto citotóxico (lisis celular) del tratamiento, ya que a concentraciones inferiores a 0,2 g BT/L de la fracción A, y 6 g BT/L de la fracción B, la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) en el sobrenadante no difiere de la obtenida en ausencia de BT, pudiendo indicar un crecimiento celular más lento o una inducción de apoptosis.

Por otro lado, el aumento de la citotoxicidad (valor de LDH) de ambas fracciones ligado en ambos casos a las concentraciones de sus respectivas CMCs (0,2 g/L con la fracción A, y 6 g/L con la fracción B), puede indicar que la citotoxicidad de estos productos podría estar asociada directamente con la formación de agregados (micelas).

Con la finalidad de evaluar si la disminución de la viabilidad celular por efecto del biotensioactivo se produce por apoptosis, se analizaron los cambios morfológicos característicos de las células apoptóticas, en nuestro caso la fragmentación del DNA, mediante citometría de flujo. Para ello los cultivos fueron incubados durante 48 h con la concentración más elevada de biotensioactivo no citotóxica, 0,2 g/L de la fracción A, que corresponde al valor de su CMC, y con 1,5 g/L de la fracción B, que corresponde a la cuarta parte del valor de su CMC. Los resultados obtenidos del efecto del BT sobre la regulación de la apoptosis mostraron que ambas fracciones del biotensioactivo inducen la apoptosis sobre células intestinales Caco-2, observándose un 44% de células apoptóticas tras tratamiento con la fracción A y un

75% con la fracción B (Pág 109; Fig. 3.6). De acuerdo con estos resultados se puede decir que el descenso de viabilidad celular observada en el estudio anterior está asociada principalmente a un proceso de apoptosis. Es decir, tanto la fracción A, que corresponde a una mezcla de fosfolípidos, y especialmente la fracción B, mezcla de lípidos nitrogenados, podrían inducir la apoptosis en células tumorales.

Diversas enfermedades están asociadas con la pérdida de la regulación del proceso apoptótico, algunas presentan un aumento de la supervivencia celular (asociado a la inhibición de la apoptosis) y otras un exceso de muerte celular (asociado a un exceso de activación de la apoptosis) (López-Hoyos, 1998). Entre las enfermedades en las que hay una inhibición de la apoptosis se incluye el cáncer (Thatte y Dahanukar, 1997). Dado que en muchos tumores malignos la apoptosis esta inhibida esta se acepta como un mecanismo clave en todas las facetas del cáncer, incluyendo la hiperplasia, transformación neoplásica, la expansión tumoral, neo-vascularización y la metástasis.

La investigación realizada por Minamino *et al.*, 2003 describió que los fosfolípidos, las ceramidas y esfingofosfolípidos (SPLs), aislados de *Sphingobacterium spiritivorun* ATCC 33861 sp. también inducían la apoptosis en una línea celular de leucemia mieloide humana (HL-60). Estos autores describieron que las ceramidas y SPLs inducían la fragmentación del DNA, primera característica bioquímica de la apoptosis o muerte celular programada, y activación de la capasa-3, seguidos por cambios en la morfología, tales como alteraciones en el núcleo y células y acortamiento del ciclo celular. Este estudio podría explicar en parte el posible mecanismo de inducción de la apoptosis de la fracción A, debido a que la fracción A es una mezcla de fosfolípidos producidos por *Sphingobacterium detergens* 6.2S. Sin embargo, se necesitan más estudios al respecto para confirmar estos resultados.

Estudios realizados con otros biotensioactivos, como por ejemplo los soforolípidos producidos por la levadura *Wickerhamiella domercqiae*, también inducen la apoptosis en una línea celular cancerígena de hígado humano. En dichas células se observaron los cambios morfológicos característicos de las células apoptóticas, tales como condensación de la cromatina, cuerpos apoptóticos y activación de las endonucleasas. Además se observó que el tratamiento con los soforolípidos incrementa la fase G₁ y parcialmente la fase S de las células cancerígenas H7402 (Chen *et al.*, 2006). La surfactina también produce un efecto sobre la proliferación de líneas celulares de carcinoma de colon humano, mostrando que este biotensioactivo bloquea fuertemente la proliferación celular. La inhibición del

crecimiento fue debida a la inducción de la apoptosis por el BT y detención del ciclo celular producido por la supresión de las señales de regulación de supervivencia celular, tales como EPK y PI3K/Akt (Seydlová y Svobodová, 2008).

Finalmente y de acuerdo con estos resultados se puede decir que ambas fracciones podrían tener la capacidad de actuar como agentes anticancerígenos por su inducción de apoptosis sobre las células Caco-2. Sin embargo, y pese a estos buenos resultados preliminares, se requieren más estudios al respecto para determinar el verdadero mecanismo de inducción de la apoptosis y saber si estos compuestos inducen la apoptosis en otras líneas celulares de origen cancerígeno.

4.6.4. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto crudo producido por *S. detergens*.

Algunos biotensioactivos han demostrado presentar propiedades antimicrobianas. Esta propiedad ha sido demostrada en glicolípidos y especialmente lipopéptidos. Como ejemplo podemos citar los ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* (AT10) (Ábalos *et al.*, 2001) y la surfactina reproducida por *Bacillus subtilis* (Lin, 1996). Debido al elevado nivel de resistencia que presentan en la actualidad muchos microorganismos responsables de enfermedades infecciosas es interesante conocer si los nuevos BT presentan estas propiedades. Por esta razón se evaluó la actividad antimicrobiana de la mezcla de biotensioactivos producidos por *S. detergens* mediante el estudio de la concentración mínima inhibitoria (Jorgensen y Turnidge, 2003).

La mezcla de biotensioactivos producidos por *S. detergens* presentó una escasa actividad antimicrobiana frente a las bacterias y hongos ensayados, observándose solo una leve inhibición del crecimiento con *Trichophyton mentagrophytes* (CMI 512 µg/ml) con la fracción B. Estos resultados indican que los BT producidos por *S. detergens*, no podrían ser utilizados como antimicrobianos.

Las propiedades fisicoquímicas, tales como su elevada eficacia, estabilidad al pH y temperatura, capacidad emulsionante, sus bajos niveles de toxicidad celular y elevada capacidad de inducir la apoptosis hacen que estos compuestos puedan tener interés para diferentes aplicaciones industriales y sanitarias.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- La cepa 6.2S, aislada de suelos volcánicos e identificada como *Sphingobacterium detergens* sp. nov., es el primer microorganismo de este género descrito como productor de biotensioactivos.
- El co-metabolismo de una fuente de carbono soluble (glucosa) y otra insoluble (n-alcanos, C₁₁₋₁₃) es necesario para la producción de biotensioactivos por *S. detergens*.
- La optimización del medio de cultivo, la estrategia de alimentación y control del pH, junto con la extracción con acetato de etilo/metanol (8:1) y previa liofilización, permitieron aumentar la producción 7 veces con respecto al medio inicial (S-MSM).
- *S. detergens* produce una mezcla de compuestos con actividad superficial, identificándose por TLC dos grandes grupos de compuestos, fosfolípidos y lípidos nitrogenados.
- La mezcla de biotensioactivos producida por *S. detergens* presenta una CAC de 2,05 g/L, una CMC de 4,9 g/L y tiene la capacidad de reducir la tensión superficial a 22 mN/m, siendo este valor la mayor eficacia descrita en biotensioactivos.
- La fracción A o apolar del extracto orgánico (40%) baja la tensión superficial a 33 mN/m, tiene una CMC de 0,18 g/L y está formada por una mezcla de fosfolípidos, siendo el más abundante la fosfatidiletanolamina.
- La fracción B o polar del extracto orgánico (60%) baja la tensión superficial a 23 mN/m, tiene una CAC de 2,7 g/L y una CMC de 6,3 g/L. Esta fracción está formada por una mezcla de tensioactivos de la misma familia con gran región hidrofílica con grupos nitrogenados.
- La mezcla de tensioactivos del sobrenadante mostró estabilidad térmica, capacidad emulsionante y mayor eficiencia a pH ácido.
- El pH del medio afectó a la actividad superficial de los tensioactivos producidos por *S. detergens*, siendo más eficaces a pH ácido. A pH neutro, pero no a pH 3,

al aumentar la fuerza iónica, la CMC desciende indicando un carácter aniónico del BT a dicho pH.

- La fracción completa y la fracción A forman cruces de Malta y estructuras mielínicas. Por SAXS y posterior modelaje se determinó la presencia de bicapas (5 nm) con un núcleo hidrofóbico de 1,5 nm que puede corresponder a cadenas hidrocarbonadas (C₁₄₋₁₈) interdigitadas. La fracción B forma cristales al secarse. La baja intensidad de dispersión puede ser consecuencia de su pequeño tamaño y elevada CMC.
- El potencial Z es independiente de la concentración del biotensioactivo, obteniéndose un valor promedio de -59 ± 9 mv. El diámetro de partícula es independiente de la concentración con el extracto completo y la fracción B, a concentraciones inferiores a 12 g/L.
- El pH presenta un efecto sobre el potencial Z y el diámetro de partícula de la fracción completa y fracciones A y B. A pHs ácidos (3-1,5) el potencial Z tiende a neutralizarse y el diámetro de partícula a aumentar su tamaño.
- La fracción B hemolizó el 83% de los hematíes de conejo. La fracción A hemolizó el 100% de los hematíes, presentando una tasa de hemólisis 115 veces superior que la fracción B. La capacidad hemolítica de ambas fracciones fue inferior a la presentada por di-ramnolípidos, trealosalípidos y SDS al 1%.
- La fracción B es mucho menos citotóxica que la fracción A y ambas presentan menor toxicidad que el SDS en fibroblastos y queratinocitos, indicando una baja irritabilidad dérmica. El ensayo del NRU es la mejor técnica para realizar los estudios de citotoxicidad con los BT estudiados.
- La fracción A (0,2 g/L) y la fracción B (1,5 g/L) inducen la apoptosis en el 44% y en el 75% de las células cancerígenas Caco-2.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Ábalos, A., Pinazo, A., Infante, M.R., Casals, M., García, F. y Manresa, A. (2001). Physicochemical and Antimicrobial Properties of New Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from Soybean Oil Refinery Wastes. *Langmuir* 17, 1367-1371.

Al-Araji, L., Abd.Rahman, R.N., Basri, M. y Salleh, A. (2007). Minireview: Microbial Surfactant. *As Pac J Mol Biol Biotechnol* 15 (3), 99-105.

Benincasa, M., Ábalos, A., Oliveira, I. y Manresa, A. (2004). Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. *Antonie van Leeuwenhoek* 85, 1-8.

Benincasa, M., Marqués, A., Pinazo, A. y Manresa, A. (2010). Rhamnolipid surfactants: alternative substrates, new strategies. *Adv Exp Med Biol* 672, 170-184.

Bodour A. y Miller-Maier, R. (1998). Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *J Microbiol Methods* 32 (3), 273-280.

Bodour, A., Guerrero-Barajas, C., Jiorle, B.V., Paull, A.K., Somogyi, A., Trinh, L.N., Bates, R.B. y Maier R.M. (2004). Structure and characterization of flavolipids, a novel class of biosurfactants produced by *Flavobacterium* sp. Strain MTN11. *Appl Environ Microb* 70, 114-120.

Bodour, A.A., Drees Kevin, P. y Maier, R.M. (2003). Distribution of Biosurfactant-Producing Bacteria in Undisturbed and Contaminated Arid Southwestern Soils. *Appl Environ Microbiol* 69 (6), 3280-3287.

Brown, M.J. (1991). Biosurfactants for cosmetic applications. *Int J Cosmet Sci* 13 (2), 61-4.

Burgos-Díaz, C., Pons, R., Espuny, M.J., Aranda, F.J., Teruel, J.A., Manresa, A., Ortiz, A. y Marqués, A.M. (2011). Isolation and partial characterization of a biosurfactant mixture produced by *Sphingobacterium* sp. isolated from soil. *J Colloid Interface Sci* 361, 195-204.

Dahrazma, B. y Mulligan, C.N. (2007). Investigation of the removal of heavy metals from sediments using rhamnolipid in a continuous flow configuration. *Chemosphere* 69, 705-711.

Daniels, L., Hanson, R. y Phillips, J. (1994). Chemical Analysis. Pág 512-554. En: *Methods for General and Molecular Bacteriology*. Grehardt P., Murray R.G.E., Wood W.A. y Krieg N.R. eds. Washington D.C. A.S.M.

Davey, M.E., Caiazza, N.C. y O'Toole, G.A. (2003). Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 185, 1027-1036.

Desai, J.D. y Banat, I.M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Bio R* 61, 47-64.

Domingues, M.R., Reis, A. y Domingues, P. (2008). Mass spectrometry analysis of oxidized phospholipids. *Chem Phys Lipids* 156, 1-12.

Edser, C. (2006). Latest market analysis. *Focus on Surfactants* 2006 (5), 1-2.

Espinosa-Urgel, M. (2003). Resident parking only: rhamnolipids maintain fluid channels in biofilms. *J Bacteriol* 185, 699-700.

Espuny, M.J., Andres, C., Mercadé, M.E., Robert, M., Manresa, M.A. y Guinea, J. (1991). R-bodies in *Pseudomonas aeruginosa* strain 44T1. *Antonie Van Leeuwenhoek* 60, 83-86.

Esumi, K. (2001). Adsorption and adsolubilization of surfactants on titanium dioxides with functional groups. *Colloids Surf Physicochem Eng Aspects* 176, 25-34.

Esumi, K., Toyoda, A., Gojino, M., Sahara, T., Fukui, H. y Koide, Y. (1998). Adsorption Characteristics of Cationic Surfactants on Titanium Dioxide with Quaternary Ammonium Groups and Their Adsolubilization. *J Colloid Interface Sci* 202, 377-384.

Fang, J. y Barcelona, M.J. (1998). Structural determination and quantitative analysis of bacterial phospholipids using liquid chromatography/electrospray ionization/mass spectrometry. *J Microbiol Methods* 33, 23-35.

Francy, D.S., Thomas, J.M., Raymond, R.L. y Ward, C.H. (1991). Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. *J Ind Microbiol Biotechnol* 8, 237-245.

García, M.T., Campos, E., Sanchez-Leal, J. y Ribosa, I. (2000). Anaerobic degradation and toxicity of commercial cationic surfactants in anaerobic screening tests. *Chemosphere* 41, 705-710.

García, M.T., Ribosa, I., Guindulain, T., Sánchez-Leal, J. y Vives-Rego, J. (2001). Fate and effect of monoalkyl quaternary ammonium surfactants in the aquatic environment. *Environ Pollut* 111, 169-175.

Georgiou, G., Lin, S.C. y Sharma, M.M. (1992). Surface-active compounds from microorganisms. *Bio/Technology* 10, 60-65.

Gevers, D., Cohan, F.M., Lawrence, J., Spratt, B.G., Coenye, T.E., Feil, J., Stackebrandt, E., Van de Peer, Y., Vandamme, P., Thompson, F.L. y Swings, J. (2005). Re-evaluating prokaryotic species. *Nat Rev Microbiol* 3, 733-739.

Griffin, W.C. (1949). Classification of surface-active agents by "HLB". *J Soc Cosmet Chem* 1, 311-326.

Guerra-Santos, L., Kappeli, O. y Fiechter, A. (1986). Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. *Appl Environ Microbiol* 24, 443-448.

Guerra-Santos, L., Kappeli, O. y Fiechter, A. (1984). *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Appl Environ Microbiol* 48, 301-305.

- Haba, E., Espuny, M.J., Busquets, M. y Manresa, A. (2000). Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. *J Appl Microbiol* 88, 379-387.
- Haba, E., Pinazo, A., Jauregui, O., Espuny, M.J., Infante, M.R. y Manresa, A. (2003). Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044. *Biotechnol Bioeng* 81, 316-322.
- Holmberg, K., Jonsson, B., kronberg, B.I. y Lindman, B. (2002). Surfactants and polymeric in aquos solution. 2^a Ed wiley and Sons, New York.
- Ishigami Y., Gama Y., Nagahora, H., Yamaguchi, M., Ankara, H. y Kamata, T. (1997). The pH-sensitive conversion of molecular aggregates of rhamnolipid biosurfactant. *Chem Lett* 5, 763-766.
- Jiménez Islas, D., Medina Moreno, S.A. y Gracida Rodríguez, J.N. (2010). Propiedades, aplicaciones y producción de biotensoactivos. *Rev Int Contam Ambient* 26 (1), 65-84.
- Kearns, D.B. y Losick, R. (2003). Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 49, 581-590.
- Kim, E.J. y Shah, D.O. (2003). A cloud point study on the micellar growth of an amphiphilic drug in the presence of alcohol and ionic surfactant. *J Phys Chem B* 107, 8689-8693.
- Kim, H.S., Jeon, J.W., Kim, B.H., Ahn, C.Y., Oh, H.M. y Yoon, B.D. (2006). Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, by *Candida* sp. SY16 using fed-batch fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 70, 391-396.
- Kozubek, A., Zarnowski, R., Stasiuk, M. y Gubernator, J. (2001). Natural amphiphilic phenols as biofungicides. *Cell Moll Biol Lett* 6, 351-355.
- Lin, S.C. (1996). Biosurfactants: recent advances. *J Chem Technol Biotechnol* 66, 109-120.
- Linhardt, R.J., Bakhit R., Daniels, L., Mayerl, F., Pickenhagen, W. (1989) Microbially produced rhamnolipid as a source of rhamnose. *Biotechnol Bioeng* 33, 365-368.
- Makkar, R.S. y Cameotra S.S. (2002). An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new application. *Appl Microbiol Biotechnol* 58, 428-434.
- Makkar, R., Cameotra, S. y Banat, I. (2011). Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express* 1 (5), 1-19.
- Makkar, R.S. y Cameotra, S.S. (1998). Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 20, 48-52.
- Marqués, A.M., Burgos-Díaz, C., Aranda, F.J., Teruel, J.A., Manresa, A., Ortiz, A. y Farfán, M. (2012). *Sphingobacterium detergens* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol*. En prensa.

Marqués, A.M., Pinazo, A., Farfán, M., Aranda, F.J., Teruel, J.A., Ortiz, A., Manresa, A. y Espuny, M.J. (2009). The physicochemical properties and chemical composition of trehalose lipids produced by *Rhodococcus erythropolis* 51T7. *Chem Phys Lipids* 158, 110-117.

Marzalek, R. (2012). Zeta Potential – Applications. 2nd International Conference on Environment and Industrial Innovation. *IPCBE 35*, IACSIT Press.

Mercadé, M.E., Monleón, L., de Andrés, C., Rodón, I., Martínez, E., Espuny, M.J. y Manresa, A. (1996). Screening and selection of surfactant-producing bacteria from waste lubricating oil. *J Appl Microbiol* 81, 161-166.

Morigaki K., Walde P., Misran M. y Robinson B.H. (2003). Thermodynamic and kinetic stability. Properties of micelles and vesicles formed by the decanoic acid/decanoate system. *Colloids Surf A* 213, 37-44.

Mukherjee, S., Das, P. y Sen, R. (2006). Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends Biotechnol* 24, 509-515.

Mulligan, C. N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environ Pollut* 133, 183-198.

Muthusamy, K., Gopalakrishnan, S., Kochupappy, Ravi, T. y Sivachidambaram, P. (2008). Biosurfactants: Properties, commercial production and application. *Curr Sci* 94 (6), 736-747.

Nitschke, M., Costa, S.G. y Contiero, J. (2005). Rhamnolipid surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. *Biotechnol Prog* 21, 1593-1600.

Nitschke, M. y Pastore, G.M. (2006). Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Bioresour Technol* 97, 336-341.

Nitschke, M. y Costa, S.G.V.A.O. (2007). Biosurfactants in food industry. *Trends Food Sci Tech* 18, 252-259.

Pacwa-Plociniczak, M., Plaza, G.A., Piotrowska-Seget, Z. y Cameotra, S.S. (2011). Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *Int J Mol Sci* 12, 633-654.

Pasquali, R.C., Bregni, C. y Serrao, R. (2006). Características e identificación de los cristales líquidos liotrópicos. Revisión bibliográfica. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 37 (2), 38-53.

Pasquali, R.C., Bregni, C. y Serrao, R. (2005). Estructura de las principales fases líquido – cristalinas liotrópicas. *Acta Farm Bonearense* 24 (3), 453-457.

Poremba, K., Gunkel, W., Lang, S. y Wagner, F. (1991). Toxicity testing of synthetic and biogenic surfactants on marine microorganisms. *Environ Toxicol Water Qual* 6 (2), 157-163.

Portilla-Rivera, O., Torrado, A., Dominguez J.M. y Moldes, A.B. (2008). Stability and emulsifying capacity of biosurfactants obtained from lignocellulosic sources using *Lactobacillus pentosus*. *J Agricu Food Chem* 56, 8074-8080.

Pramauro, E. y Pelizzetti, E. (1996). Surfactants in Analytical Chemistry. Applications of Organized Amphiphilic Media, *Wilson and Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry* 31. S.G. Weber (Ed) Elsevier, Netherlands.

Paraskevopoulou, A. y Kiosseoglou, V. (1995). Study of emulsifying properties of low-in-cholesterol egg yolk prepared with the use of polysorbate-80. *Develop Food Sci* 37, 675-684.

Pruthi, V. y Cameotra, S. (2003). Effect of nutrients on optimal production of biosurfactants by *Pseudomonas putida* - A gujarat oil field isolate. *J Surfactants Deterg* 6, 65-68.

Rashedi, H., Jamshidi E., Mazaheri, A.M. y Bonakdarpour, B. (2006). Biosurfactant production with glucose as a carbon source. *Chem Biochem Eng Q* 20, 99-106.

Rashedi, H., Mazaheri, A.M., Bonakdarpour, B. y Jamshidi E. (2005). Environmental importance of rhamnolipid production from molasses as a carbon source. *Int J Environ Sci Tech* 2, 59-62.

Ravoo, B.J., y Engberts, J.B.F.N. (1994). Single-Tail Phosphates Containing Branched Alkyl Chains. Synthesis and Aggregation in Water of a Novel Class of Vesicle-Forming Surfactants. *Langmuir* 10 (6), 1735-1740.

Rieger, M.M., Rhein, E.L. y Dekker, M. (1997). Surfactants in Cosmetics. 2nd ed, Marcel Dekker, Nueva York.

Robert, M., Mercadé, E., Andrés, C., Espuny, M. J., Manresa, M.A. y Guinea, J. (1991). Optimización de la producción de biotensioactivos por *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. <http://grasasyaceites.revistas.csic.es>. Vol. 42 Fase. 1, 1-7.

Robert, M., Mercadé, M.E., Bosch, M.P., Parra, J.L., Espuny, M.J., Manresa, M.A. y Guinea, J. (1989). Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. *Biotechnol Lett* 11, 871-874.

Roberts, D. (2000). Aquatic toxicity—Are surfactant properties relevant?. *J Surfactants Deterg* 3, 309-315.

Rodicio, M. y Mendoza, M.C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 22, 238-245.

Rodrigues, L., Banat, I.M., Teixeira, J. y Oliveira, R. (2006). Biosurfactants: potential applications in medicine. *J Antimicrob Chemother* 57, 609-618.

Rodrigues, L.R., Banat, I.M., Van der Mei, H.C., Teixeira, J.A. y Oliveira, R. (2006). Interference in adhesion of bacteria and yeasts isolated from explanted voice prostheses to silicone rubber by rhamnolipid biosurfactants. *J Appl Microbiol* 100, 470-480.

Ron, E.Z. y Rosenberg, E. (2001). Natural roles of biosurfactants. *Environ Microbiol* 3, 229-236.

Rosen, M.J. (2004). *Surfactants and Interfacial Phenomena*, 3rd ed. Edited by John Wiley and Sons, Inc., New York. pp. 1-10.

Rosenberg, E. y Ron, E.Z. (1999). High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol* 52, 154-162.

Rosenberg, E., Schwartz, Z., Tenenbaum, A., Rubinovitz, C., Legmann, R. y Ron, E. Z. (1989). A microbial polymer that changes the surface properties of limestone: Effect of biodispersant in grinding limestone and making paper. *J Disper Sci Technol* 10, 241-250.

Sadurní Gràcia, N. (2007). Estudi de la formació de nano-emulsions de fase externa aquosa i solubilització de fàrmacs lipòfils. <http://hdl.handle.net/10803/1610>

Sánchez Molina, L. (2006). Influencia del contraíón en las propiedades biológicas de tensioactivos aniónicos derivados de N-alfa, N-epsilon-dioctanoillisina: citotoxicidad y ecotoxicidad "in vitro". <http://hdl.handle.net/10803/1832>

Satpute, S.K., Banpurkar, A.G., Dhakephalkar, P.K., Banat, I.M. y Chopade, B.A. (2010). Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Crit Rev Biotechnol* 30, 127-144.

Seydlova, G. y Svobodova, J. (2008). Development of membrane lipids in the surfactin producer *Bacillus subtilis*. *Folia Microbiol* 53, 303-307.

Singh, A., Van Hamme, J.D. y Ward, O.P. (2007). Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnol Adv* 25, 99-121.

Sánchez-Martínez, M. (2010). Propiedades bioquímicas y biofísicas de ramnolipidos biotensioactivos. Tesis doctoral, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Murcia. <http://hdl.handle.net/10803/10733>

Salager, J.L. (2002). Surfactantes tipos y usos, Cuaderno FIRP 300, Laboratorio FIRP, Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela.

Salager J.L. y Fernández A. (1993). Surfactantes en solución acuosa. Cuaderno FIRP 201A, Laboratorio FIRP, Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela.

Salager J.L. y Fernández A. (2004). Surfactantes-Parte 3. Aniónicos. Cuaderno FIRP S302PP, Laboratorio FIRP, Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela.

Soberón-Chávez, G. y Maier, R.M. (2011). Biosurfactants: a General Overview. En Biosurfactants. *Microbiology Monographs* 20, pp. 1-11. Soberón-Chávez, G. editor. Springer-Verlag, Berlin, Alemania.

Tindall, B.J., Rosselló-Móra, R., Busse, H.J., Ludwig, W. y Kämpfer, P. (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int J Syst Evol Microbiol* 60, 249-266.

Uphues, G. (1998). Chemistry of amphoteric surfactants. *Lipid/Fett* 100, 490-497.

Van Bogaert, I., Saerens, K., de Muyck, C., Develter, D., Soetaert, W. y Vandamme, E.J. (2007) Microbial production and application of sophorolipids. *Appl Microbiol Biotechnol* 76, 23-34.

Van Hamme, J.D., Singh, A. y Ward, O.P. (2006). Physiological aspects. Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnol Adv* 24, 604-620.

van-Haesendonck, I.P.H. y Vanzeveren, E.C. (2004). Rhamnolipids in bakery products. EEUU patente EP20020447207

Walter, V., Syldatk, C. y Hausmann, R., (2000). Screening Concepts for the Isolation of Biosurfactant Producing Microorganisms. En: Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6189/>

Woese, C.R. (1997). Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51(2), 221-271.

Zeng, G., Zhong, H., Huang, G. y Fu, H. (2005). Physicochemical and microbiological effects of biosurfactant on the remediation of HOC-contaminated soil. *Prog Nat Sci* 15, 577-585.

Anexo 1

ANEXO 1

A.1 Caracterización química de la fracción B

A.1.1 Materiales y métodos

A.1.1.1 Cromatografía en capa fina (TLC)

La preparación de la fase móvil y reveladores utilizados para caracterizar esta fracción, se realizó siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.5.1 de materiales y métodos del artículo 1 (Burgos-Díaz *et al* 2011). Página 196.

A.1.1.2 Purificación de los compuestos de la fracción B mediante una TLC-preparativa

La purificación de los compuestos de la fracción B se realizó siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.5.1 de materiales y métodos del artículo 1 (Burgos-Díaz, *et al* 2011). Página 197.

A.1.1.3 Espectrometría de infrarrojos por transformada de Fourier (FT-IR)

Este análisis se realizó siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.5.3 de materiales y métodos del artículo 1 (Burgos-Díaz, *et al* 2011). Página 197.

A.1.1.4 Determinación de los ácidos grasos de la fracción B.

Este análisis se realizó siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.5.4 de materiales y métodos del artículo 1 (Burgos-Díaz, *et al* 2011). Página 197.

A.1.1.5 Hidrólisis acida de la fracción B

Para realizar la hidrólisis de la fracción B se pesaron 10 mg de extracto de la fracción B y se depositaron en un tubo pirex diseñado para este tipo de ensayo. Luego se adicionó 1 mL de agua y 1 mL de HCl concentrado (1:1). Posteriormente se tapó el tubo y se calentó la muestra a 120°C durante 2 horas. Transcurrido el tratamiento térmico de la muestra, ésta se dejó enfriar a temperatura ambiente y se realizó una extracción orgánica adicionando 2mL de cloroformo. Se agitó con la ayuda de un vortex durante un minuto y finalmente se dejó reposar hasta la separación de las fases. La fase superior correspondió a la fase orgánica y la fase inferior corresponde a la fase acuosa de la fracción B.

A.1.1.6 Espectrometría por Ionización por Electropray (ESI)

Para identificar los compuestos de la fracción B se utilizó la técnica cromatográfica ESI-MS (Ionización por Electropray - Espectrometría de Masas). Las muestras purificadas (B1, B2, B3), se prepararon a una concentración de 10 mg/ml en metanol grado HPLC y fueron analizadas mediante un espectrofotómetro de masas

AGILENT® LC/MSD-TOF. Para ello se inyectó 1 ml de cada muestra (B1, B2, B3) a la fuente de ionización a través de un sistema de bomba HPLC Agilent 1100, a un flujo de 200 µl/minuto. Las condiciones cromatográficas utilizadas para este análisis fueron las siguientes: temperatura del gas a 325°C, introducción al capilar a un flujo de 7 de L/minutos y a una presión de 15 psi. Para el análisis en modo positivo (ESI (+)) se adicionó un 1% de ácido fórmico a las muestra. El voltaje del capilar en modo positivo fue de 4 KV y el del fragmentador es 175 V. Por otro lado, para el análisis en modo negativo (ESI (-)) el voltaje del capilar fue de 3,5 KV y un igual voltaje del fragmentador. El rastreo de masas se realizó en un rango de masas comprendidas entre 100 a 1500 m/z.

A.1.1.7 Analisis por MALDI TOF/TOF

Para el análisis de MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight), la muestra fue disuelta en metanol a una concentración de 10 mg/ml. Posteriormente se depositaron 10µl de la muestra (extracto orgánico de la fracción B) y 10 µl de la matriz DHB (2,5-dihydroxybenzoic acid) sobre la placa de MALDI-TOF. Las muestras fueron analizadas mediante un espectrofotómetro 4800 *Plus* MALDI TOF/TOF (ABSciex – 2010). Las condiciones experimentales empleadas fueron las siguientes: la fuente de ionización fue MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) y con un láser de estado sólido (Nd:YAG) (355nm, frecuencia 200Hz, pulso de 3-7ns), el analizador, TOF/TOF (Time of Flight) fue utilizado en modo reflector para moléculas hasta 7000Da o lineal para pesos moleculares menores a 5000Da. La lectura de iones se realizó en modo positivo y negativo.

A.1.1.8 Hidrólisis y análisis de aminoácidos

La determinación de la composición del péptido se realiza por la hidrólisis total de la muestra en presencia de HCl 6N, calentando a 100 °C durante 10-24h, y en tubo al que se le ha hecho el vacío. Tras el proceso se utiliza un sistema cromatográfico que permita separar y determinar cuántos y cuáles son los aminoácidos que forman la cadena.

A.2 Resultados de la caracterización química de la fracción B

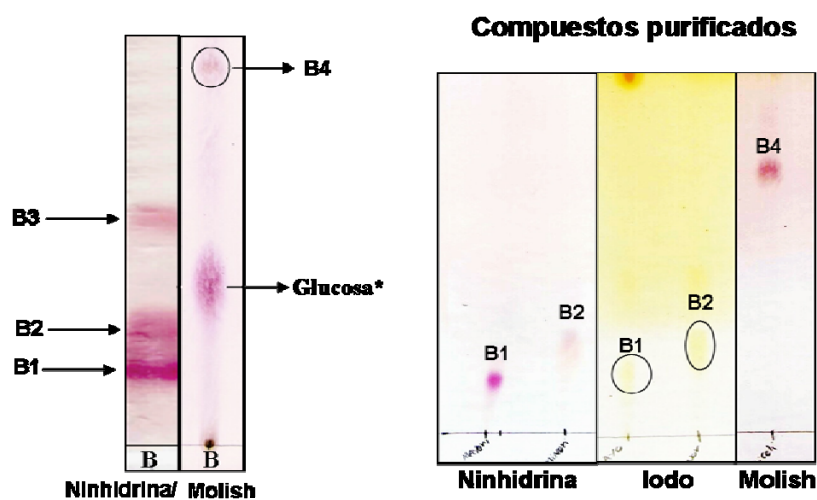


Figura 1: Cromatografía en capa fina (TLC) revelada con diferentes reveladores ninhidrina, reactivo de Molish y vapores de yodo. a) Fracción B completa y b) TLC tras la purificación por preparativa.

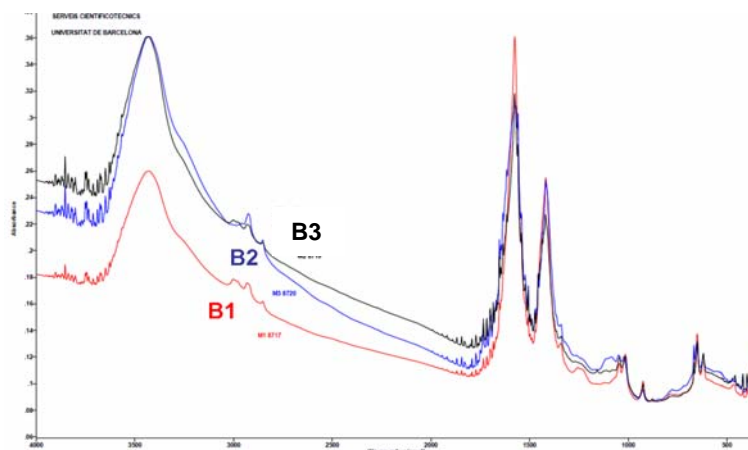


Figura 2: Espectro IR realizado con los tres compuestos purificados de la fracción B (B1, B2, B3)

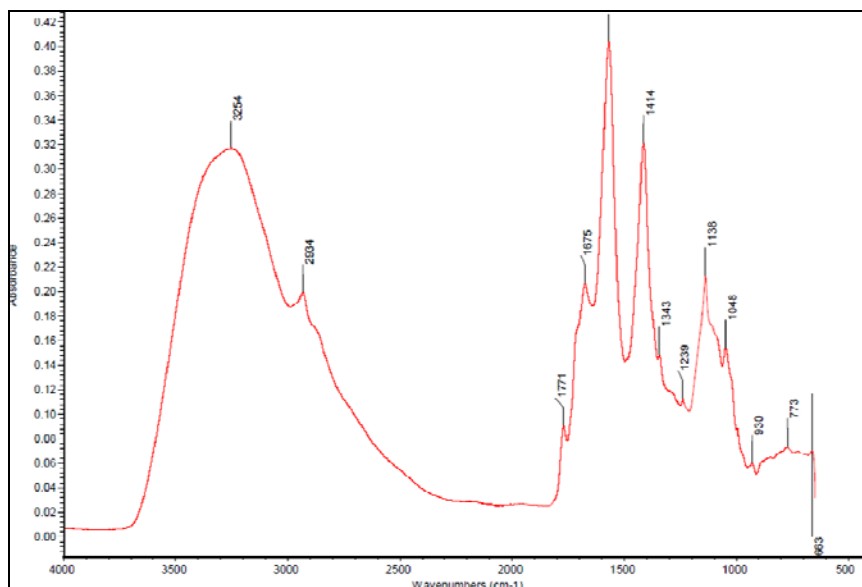


Figura 3: Espectro IR realizado a la fracción B completa sin hidrolizar.

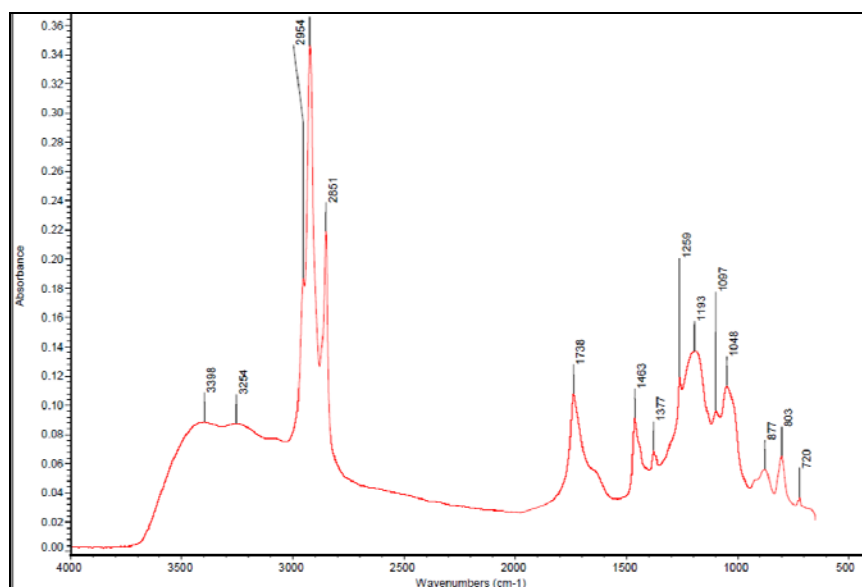


Figura 4: Espectro IR realizado a la fase orgánica de fracción B (cola apolar) después de hidrolizar la muestra (Fracción B completa).

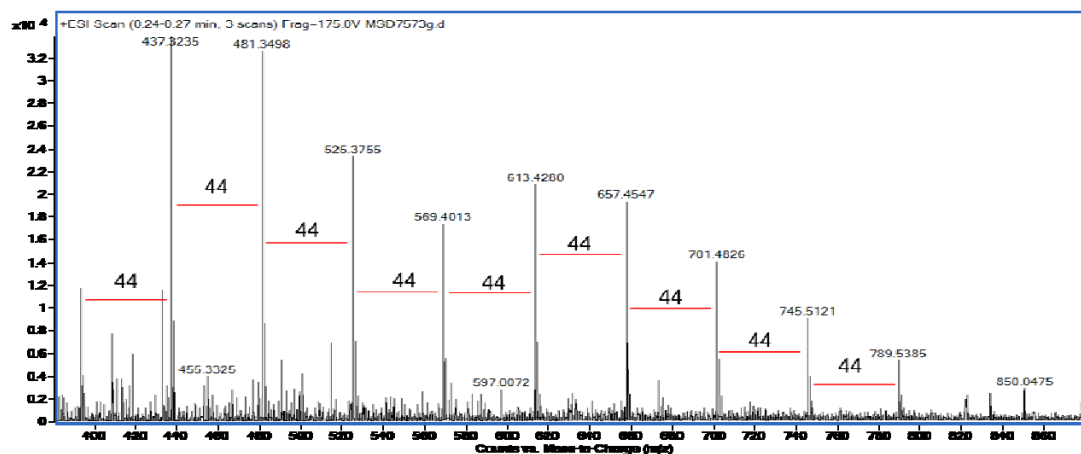


Figura 5: Espectro de electrospray (ESI) realizado a la fracción B completa.

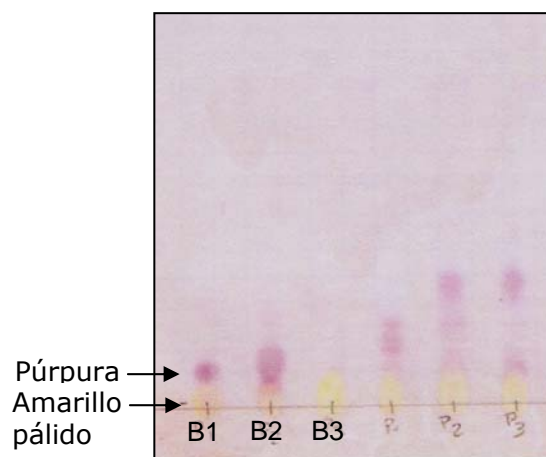


Figura 6: cromatografía en capa fina (TLC) de los compuestos purificados (B1, B2, B3) revelado con ninhidrina, donde se puede observar aminas primarias (púrpura) y aminas secundarias (amarillo).

Anexo 2



Transworld Research Network
37/661 (2), Fort P.O.
Trivandrum-695 023
Kerala, India

Recent Advances in Pharmaceutical Sciences II, 2012: 151-167 ISBN: 978-81-7895-569-8
Editors: Diego Muñoz-Torrero, Diego Haro and Joan Vallès

9. Advances in the research of new biosurfactants and their potential use in the biomedical and pharmaceutical industry

César Burgos-Díaz¹, Núria Piqué^{1,2}, Ángeles Manresa¹ and Ana M^a Marqués¹

¹*Department of Sanitary Microbiology and Parasitology, University of Barcelona, Barcelona, Spain*

²*Department of Basic Sciences. International University of Catalunya, Barcelona, Spain*

Abstract. Biosurfactants (BS) are a structurally diverse group of surface-active substances produced by microorganisms. Interest in BS production has markedly increased during the past decade, although large-scale production has not been possible because of low production yields and high total costs. At present, BS have gained importance in environmental applications, while new applications in the pharmaceutical, biomedical, cosmetic and food industry, with a high added value, are still developing. This article describes classical and new BS producer bacteria together with their new BS applications. With these specialized and cost-effective applications, BS can be considered as an interesting option for the near future.

1. Introduction

Surfactants are amphipathic molecules that accumulate at interfaces, decrease interfacial tensions and form aggregate structures such as micelles [1]. Surface active agents or surfactants are an integral part of our everyday life and are products with a worldwide production. The enormous market

Correspondence/Reprint request: Dr. Ana M^a Marqués, Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain. E-mail: ammarques@ub.edu

demand for surfactants is currently met by numerous synthetic, mainly petroleum-based, chemical surfactants. About 54% of the total surfactant output is utilized in household/laundry detergents, with only 32% destined for industrial use [2]. Chemical surfactants are available in many forms, and are generally classified based on charge as anionic, non-ionic, cationic and amphoteric. Cationic surfactants are the most toxic and have historically been used as antimicrobials, while anionics are less toxic and are more active against Gram positive than Gram negative bacteria, and non-ionics are often considered non-toxic. Important surfactants include linear alkylbenzene sulfonates (LAS), fatty alcohol ethoxylates (FAEO) and lauryl ether sulfate (LES) [3].

The growing awareness towards the use of renewable-based products and “green products” has stimulated the development of alternatives to these chemical surfactants. Biosurfactants (BS) are an example of such environmental friendly options [4]. BS can be obtained either by chemical synthesis from renewable resources, by microbial fermentation processes or by enzymatic syntheses [5].

The amphiphilic nature of BS allows the partition at water/air, oil/air or the oil/water interfaces where it lowers surface and/or interfacial tension. Such characteristics enable emulsifying, foaming, detergency and dispersing properties [6]. One important feature of BS is that they have very low critical micelle concentrations (CMC). This means that BS are effective at low concentrations, lower than many chemically made surfactants. The fact that only small amounts of BS are needed to reduce surface tension coupled with their known biodegradability makes them excellent candidates for “green” detergents and surfactants.

Comparing with chemical surfactants, BS have several advantages such as lower toxicity, higher biodegradability and diversity, effectiveness at extreme temperatures or pH values and widespread applicability. Additionally, their unique structures provide new properties that classical surfactants may lack. BS occur naturally in soil, which makes them acceptable from a social and ecological point of view [2].

The most remarkable difficulty for BS commercial application is the BS production at low concentrations, which makes product recovery difficult and expensive. In order to reduce their production costs and increase their competitiveness, various researches have been working in the development of new and cheaper processes and/or in the use of low-cost raw materials [4].

2. Natural Roles of Biosurfactant

Recent research indicates that there are a number of reasons why microorganisms make BS; mainly these reasons relate to the need to change

surface or interfacial properties of the cell or local environment. Prokaryotic cells communicate with the environment through their envelopes. Smaller cells have a higher surface/volume ratio, and thus can have a more efficient exchange of nutrients with their surrounding than larger cells. To have an effective relationship with the environment, microorganisms need surfactants [7]. When considering the natural roles of BS, it is important to emphasize that they are produced by a wide variety of diverse microorganisms and have very different chemical structures and surface properties. This diversity makes difficult to generalize about the natural role of BS [8]. Nevertheless, BS appear to play a role whenever a microbe encounters an interface.

BS regulate the attachment-detachment of microorganisms to and from surfaces. If a BS is excreted, it can modify the interface and enable or inhibit bacterial attachment. BS that low interfacial tension are particularly effective in mobilizing bound hydrophobic molecules and making them available for biodegradation [1,8]. BS may be used as carbon and energy storage molecules, as a protective mechanism against high ionic strength, and may simply be byproducts released in response to environmental change such as extracellular coverings [1]. Surface or interfacial tension changes are needed in the complex social responses that control cell development.

BS are important for motility (gliding and swarming motility as well as de-adhesion from surfaces) and cell-cell interactions (biofilm formation, maintenance and maturation, quorum sensing, amensalism and pathogenicity). In response to certain environmental signals, bacteria will differentiate from an independent free-living or to an interdependent surface attached mode of live. Surfactants such as rhamnolipids may be able to maintain open channels in biofilm formations by affecting cell-cell interactions and the attachment of bacterial cells to surfaces. Rhamnolipid synthesis is an active mechanism whereby the bacteria exploit intracellular interaction and communication to actively maintain these channels [9]. Rhamnolipid production not only guarantees the structure, and therefore the nutritional balance of the biofilm, but these surfactants also prevent outside invading bacteria from colonizing the open spaces in the resident biofilm [10].

Much research has been directed towards determining how microorganisms can enhance access to poorly soluble substrates prior to either passive or active uptake into the cell. BS may play a role mediating interactions between the hydrophobicity of the cell surface and the substrate surface. It is known that exogenously added BS can increase the apparent water solubility of organic compounds and alter its bioavailability. BS are used to complex with heavy metals. Rhamnolipid eliminated cadmium toxicity when added to the medium by a combination of metal complexation and rhamnolipid interaction with the cell surface to alter cadmium uptake [8,11,12]. It has been described

that di-rhamnolipid removed from artificial contaminated soil, not only the leachable or available fraction of Cd and Pb but also the bound metals. Additionally, the microbial population of the contaminated soil was increased after removal of metals, indicating the decrease of toxicity of heavy metals to soil microflora. Heavy metals removal from sediments in a continuous flow configuration also was possible with rhamnolipids [13].

3. Biosurfactant Classification

BS are classified based on their chemical structure. A typical BS is composed of a hydrophilic component (mainly amino acids, peptides or proteins, mono/disaccharides, polysaccharides) and a hydrophobic component (mainly saturated or unsaturated fatty acids, hydroxyl fatty acids or fatty alcohols) [6]. BS molecular masses generally range from 500 to 1500 Da and their CMC values range from 1 to 200 mg/L [1].

BS are structurally diverse and can have various chemical structures mainly consisting of glycolipids, lipopeptides, phospholipids, neutral lipids, polymeric surfactants and particulate BS, depending on the producing microorganism, raw matter and process conditions [5,6]. Low molecular weight BS are able to reduce the surface tension of water to 25-30 mN/m. The main property of high molecular weight BS (polymeric and particulate) is their ability to stabilize oil/water emulsions and they are therefore called bioemulsifiers [8,14]. A brief description about each class of BS is given below.

Glycolipids: Most known BS are glycolipids. They are commonly mono or disaccharides acylated with long chain fatty acids or hydroxyl fatty acids. Among them, rhamnolipids, trehalose lipids and sophorolipids are the best studied. Cellobioselipids and mannosyl erythritol lipids are also included in this group.

- Rhamnolipids are exoproducts of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* and were described as a mixture of four congeners. Naturally produced rhamnolipids are always found as mixtures of different congeners, as observed with various strains of *P. aeruginosa* [15,16,17]. The development of more sensitive analytical techniques has led to the further discovery of a wide diversity of rhamnolipid congeners and homologues that are produced at different concentrations by various *Pseudomonas* species. Recently, bacteria belonging to other families, classes or even phyla have been isolated and described as rhamnolipid producers [18].
- Different trehalose containing glycolipids are known to be produced by several microorganisms belonging to mycolates group, such as *Mycobacteria*, *Corynebacteria*, *Arthrobacter*, *Nocardia*, *Gordonia*

and specially *Rhodococcus*. Most of the trehalose lipids synthesized by this group are bound to the cell envelope and are produced mainly when microorganisms are grown on hydrocarbons probably as strategy to overcome the low solubility of hydrocarbons and enhance their transport. Microbial commercial success of trehalose lipids is scarce because its high cost of production related to the fact that are bound to the cellular envelope and requires non-renewable *n*-alkane carbon sources [14].

- Sophorolipids are produced by various yeast species, the most intensively studied being *Candida bombicola*. There are generally considered as the most promising glycolipids, because the producing microorganism is non-pathogenic and because of the high substrate conversion, high productivity and product recovery [3].

Lipopeptides: Several types of cyclic lipopeptides with surface active properties are produced mainly by members of the *Bacillus* sp. Up to now, lipopeptides are the most effective surfactants with high efficiency, that is, low BS concentration produces significant reduction of surface tension. Antimicrobial activity is a frequent property present in this group.

- *Bacillus subtilis* produces a cyclic lipopeptid called surfactin, which has been reported to be one of the most active BS that has been discovered to date [8].
- *Bacillus licheniformis* produced lichenysin, a lipopeptide (1006 to 1034 Da) with a lipid moiety mixture of 14 linear and branched beta-hydroxy fatty acids (C₁₂-C₁₇) and aminoacids such as glutamic acid, asparagine, valine, leucine and isoleucine. This BS is a powerful surface active agent (surface tension: 28 mN/m; CMC: 12 mg/L) and presents good antibacterial activity [19].
- The polymyxins are a group of lipopeptides produced by *Bacillus polymixa* and related bacilli. Polimixin B is a decapeptide in which amino acids 3-10 form a cyclic octapeptide with a branched-chain fatty acid connected to the terminal 2,4-diaminobutyric acid (DAB). The hydrophobic side-chain of the fatty acid together with the cationic γ -amino groups of the DAB residues give these antibiotics the surface-active properties of a cationic detergent [8].

Phospholipids: Kretschmer *et al.* [20] described in 1982 the lipophilic compounds with surfactant properties of the culture suspension containing *Rhodococcus erythropolis*. Thirteen major lipids from organic crude extract were isolated. Non polar and polar lipids from which nonionic triglycerides

and α,α -trehalose corynomycolates were the most abundant lipids. From components described, phosphatidylethanolamines (PE) acted as the most powerful surfactants reducing the interfacial tension below 1mN/m.

Neutral lipids: The report of the production of surface active bile acids by *Myroides* SM1 bacterial strains was performed by Maneerat *et al* (2005) [21]. These compounds are composed of cholic acid, deoxycholic acid and their glycine conjugates.

The biosphere offers a vast natural resource of BS. Sampling and isolation of bacteria are the basis for screening of BS producing microbe. Hydrocarbon-contaminated sites are promising for the isolation of BS producing microbes. Mercadé *et al.* (1996) [22] isolated 5 BS producing strains from petroleum-contaminated soil samples by using waste lubricating oil as the sole carbon source being *Pseudomonas* sp. the most frequent isolate, followed by *Rhodococcus* sp. Espuny *et al.* (1995) [23] and Abalos *et al.* (2001) [15] also described the isolation BS producing strains from vegetal oil-contaminated soil sample. Nevertheless, undisturbed soils also can have BS producing bacteria. Strain 6.2S, isolated from volcanic soil and identified as *Sphingobacterium* sp., was recently reported as a new BS producer [7].

The exploration of the marine habitat which has been underexplored has brought about new microorganisms. This represents a great opportunity to discover new bioactive compounds (new functional products). Up to now, more than 10,000 metabolites with biological activities have been isolated from marine microorganisms, meeting the needs of the industry in the new era of the white biotechnology, the “green chemistry”. Beside the well known soil microorganisms, BS-yielding marine microbes emerge as a wide source of BS producers.

A number of new BS has been recently described and accelerated advances in molecular and cellular biology are expected to expand our insight into the diversity of structures and applications of BS. Inside of glycolipid class, of special interest are the first *Ochrobactrum* sp. (α -Proteobacteria) and *Brevibacterium* sp. (Actinobacteria) isolates which produce a glycolipid with surface activity [24]. Some marine γ -proteobacteria as *Pseudomonas fluorescens*, produced a complex BS composed of trehaloselipids link to diacyl-monoglyceride-protein [25]. This complex renders the cell capable of degrading hydrocarbons. New *Halomonas* sp. glycoprotein has been described with a high emulsifying activity. Other strain of *Halomonas* sp. accumulated glycolipids (oligosaccharide-lipids) and a noteworthy sulfated heteropolysaccharie was produced by *Halomonas eurithalina* [26]. *Alcanivorax borkumensis*, besides to be a good polyhydroxy-alkanoate producer, produces an anionic glycolipid containing glycine for the uptake of hydrophobic substrates [27]. Other bacteria belonging to the β -proteobacteria

such as *Alcaligenes* sp. [28] produces glycolipids, or *Arthrobacter* sp. which produces a trehalose-lipid, very effective BS [29]. Recently, a marine *Azotobacter chroococum* has been described as a BS producer [30].

From the phylum of the *Bacteroidetes*, the genus *Myriodes* (formerly *Flavobacterium*), commonly found in marine habitat especially after oil-spills, produced ornithine-lipids often cell associated, which allow the cell to degrade hydrocarbons, however, surface active properties diminished in extreme conditions [31]. In the genus *Myriodes*, recently *Myriodes odoratus* has been reported to produce bile acids [21]. *Corynebacterium kutscher*, a glycopeptide-lipid producer, is a new BS producer from sea belonging to phylum *Actinobacteria* [32].

The family of the lipopeptides, a highly effective BS group, has been expanded with the description of *Bacillus circulans* as a new species producing a lipopeptide with low toxicity [33] and by a new type of lichenysin, produced by *B. licheniformis*, whose most novel characteristic is that the alkyl-chain size ranges between C₁₂ to C₁₇ [33]. Another lipopeptide type surfactant is produced by *Azotobacter chroococum* growing in motor lubricant oil. A sponge-associate *Actinomyces* has been recently reported. It is noteworthy to mention that a glycopeptide surfactant has been detected in a strain of *Bacillus megaterium* [34].

The diversity of BS is limited only by biological evolution and suggests that only a tiny fraction of BS has been characterized to date. New BS discoveries have relied on the employment of advanced analytical methods and, often, significant screening efforts [1]. Although the improvements obtained from these strategies to successfully compete with synthetic surfactants, novel microorganisms must be designed. Data on the genes involved on the production of BS are critical to designing organisms with improved features and new properties [36].

4. *Sphingobacterium* sp., a New Biosurfactant Producer Bacterium

Recently, the isolation of a new BS-producing bacterium was carried out on a soil sample of the Azores islands. From 10 volcanic earth samples 54 different isolate colonies were obtained and strain 6.2S was selected on the basis of its capacity to decrease surface and interfacial tension. Strain 6.2S was identified as a *Sphingobacterium* sp. and is the first strain in this genus to be reported as a BS producer.

After 48 h culture of *Sphingobacterium* sp. 6.2S in G-Mineral Salts Medium (G-MSM), of 3.8 mg/mL of protein and 190 mg/L crude extract were obtained. Compositional analysis revealed that the crude extract consisted primarily of

lipids (71.6%) and a minor fraction of carbohydrate (5.6%) and protein (4.4%). When *Sphingobacterium* sp. grew on G-MSM with n-alkenes the surface tension was reduced from 55 mN/m to 32mN/m. The crude extract (BS mixture) strongly reduced surface tension (22 mN/m at 10 g/L), producing one of the lowest values recorded for a microorganism-produced surfactant [7].

To purify crude extract, a modification of the method described by van Echten-Deckert (2000) [37] was used, and two fractions, fraction A and fraction B, were obtained (Figure 1), both with superficial activity [7].

Fraction A (28.7%, w/w of the total extract) decreased surface tension of distilled water to 33.0 mN/m, and presented a CMC of 180 mg/L. Three majority spots were visualized in thin layer chromatography with ninhydrin (amine group determination) and molybdenum blue (phospholipid determination) (Figure 1). These results indicated that the analyzed compounds belong to the family of phospholipids and some of them had in their structures nitrogen groups. An analysis of each spot with two dimensional-TLC using different standard phospholipids showed that fraction A was a mixture of phospholipids, being phosphatidyletanolamine the most abundant. Finally, these results were assessed

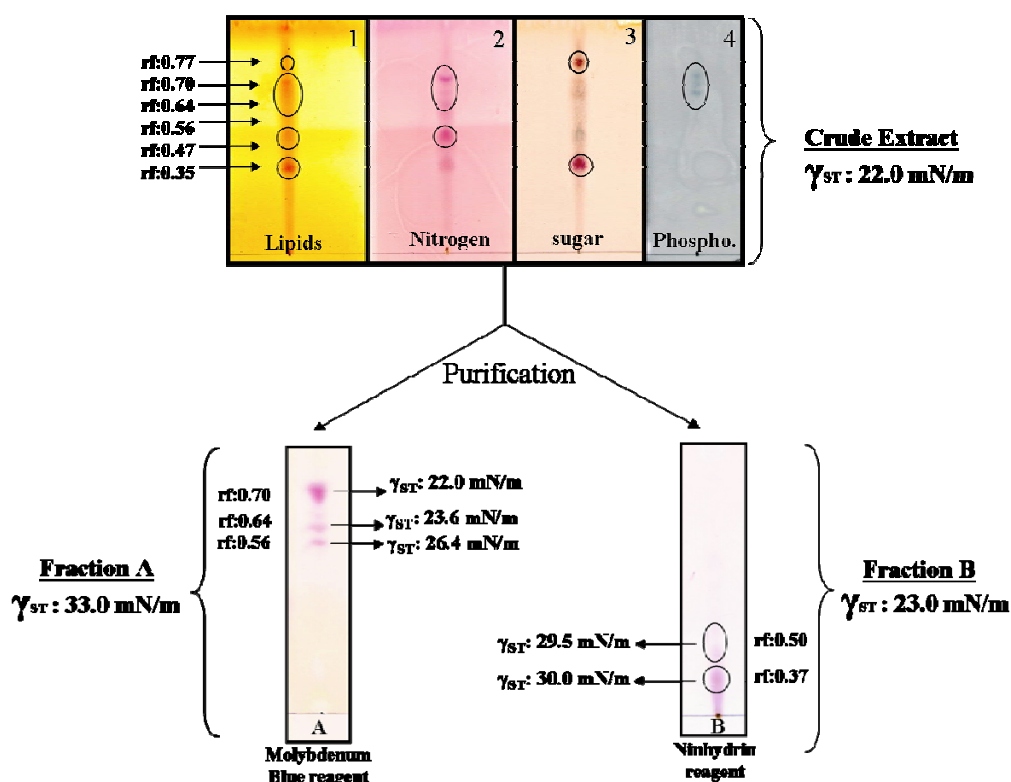


Figure 1. Analysis of the extract produced by *Sphingobacterium* sp. 6.2S. Crude extract developed by iodine vapours (lipids), ninhydrin (nitrogen), molish (sugar) and molybdenum blue (phospholipids). Fraction A: TLC obtained after purification and developed with Ninhydrin. Fraction B: TLC obtained after purification and developed with ninhydrin [7].

with a FTIR analysis, confirming the presence of the functional groups characteristic of phospholipids.

Further analysis of fraction B (61.3%, w/w of the total extract) revealed that it was a mixture of lipopeptides and at least one glycolipid. The surface tension-concentration curve showed two plateaux, the first of which can be attributed to a critical aggregation concentration of the BS with a protein (2.7 g/L) and the second to the true CMC in water (6.3 g/L) [7].

Emulsion capacity of supernatant produced by *Sphingobacterium* sp. was studied. At 25° C and pH 5, 70-65% of emulsion was measured and it was maintained during 5 days, and only a small decrease was observed (60-65% emulsion) after one month. A criterion used to identify bioemulsifiers is their ability to maintain at least 50% of the original emulsion volume after 24 h formation; therefore, 6.2S BS can be included in this family of compounds.

A thermal stability analysis was carried out between 0°C and 100°C and at pH 5, revealing that surfactant properties were maintained with the temperature increase and only a small decrease in interfacial and surface tension was observed after a thermal treatment of 121°C. Nevertheless, it was found that after thermal treatment at 121°C, the emulsification capacity of 6.2S BS decreased markedly from 65% to 25% (Figure 2). The surface activity was affected by pH. At acidic pH (1–5), surface and interfacial tension were lower (37 and 10 mN/m, respectively). At pH 7 an increase in surface tension and interface tension was observed. This change can be related to the pKa, indicating that the ionic form of the surfactant had lower surface activity. If developed to higher yields, BS from *Sphingobacterium* sp. 6.2S will lead to interesting applications.

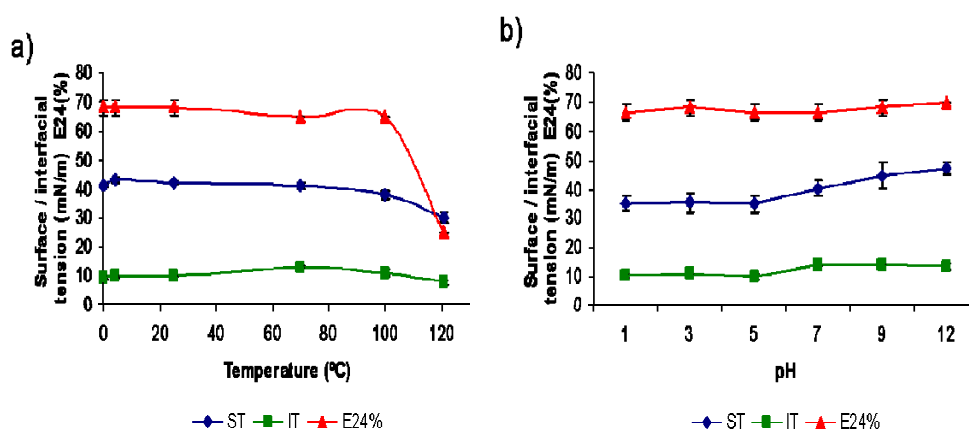


Figure 2. (a) Effect of temperature treatment on the stability of BS produced by *Sphingobacterium* sp., 6.2S grown on G-MSM. (b) Effect of pH on the stability of BS. Measurements were conducted on crude supernatant with unknown concentrations of BS at 25°C [7].

5. Applications of Biosurfactants

Surfactants are an important class of chemical products with a high volume of use in a great variety of household and industrial applications. Most of these surfactants are petroleum based and are chemically synthesized [6]. BS are the natural choice because they are obtained by environmental friendly technologies and they possess many advantages over synthetic surfactants, such as lower toxicity, effectiveness at a wide range of physical conditions, but they are special as consequence of their biodegradability [6]. BS are more effective and efficient than many existing synthetic surfactants and they may provide new properties that the classical chemical surfactants lack [38,39].

BS find applications in an extremely wide variety of industrial processes that involve emulsification, foaming, detergency, wetting, dispersion and solubilization of hydrophobic compounds [19,40] and, in fact, the demand of BS is increasing worldwide in recent years [14,19,39,40,41,42]. At present, the main applications are the hydrocarbon bioremediation and oil and petroleum industry, in particular for microbial enhanced oil recovery (MEOR) due to their biodegradability avoiding environmental accumulation and toxicity [14]. In spite of their numerous advantages over the synthetic chemical surfactants the problem related with the large scale and cheap production still exists and is a major hurdle in economic competitiveness [6].

According to Syldatk and Hausmann (2010) [5] and Makkar *et al.* (2011) [6], the reasons for limited use of microbial surfactants in industry are the use of expensive substrates, limited product concentrations, low yields and formation of product mixtures rather than pure compounds. Nevertheless, their higher price is largely compensated by their environmental profile and performance benefits. In this regard, discovery of potent BS producing microorganisms would enhance their use and hence reduce total dependence towards the chemical synthetic surfactant industry [19].

The positive economical outlook can be enhanced by increasing their high throughput values or by harnessing other important properties such as pharmacological, antifungal and antiviral capabilities. Several BS have recently been used or anticipated to use in cost-effective applications in medicine, food and cosmetic industries [6]. BS have also potential applications as additives for agricultural use, food industry, mining and manufacturing processes, pulp and paper industries and as detergents or cosmetics [2,14,19,42,43].

6. Medical and Healthcare Applications

The biomedical and cosmetics area, in which low amount of high value BS is required in a high added value product, opens a large field where the

research seems to be at its infancy for new applications. Next, possible applications of BS in these areas are described. The use of BS in medical applications has been proposed, due to several biological properties such as antimicrobial ones [14,42]. BS also have potential for use in vaccines and gene therapy [42,44]. A judicious and effective combination of these strategies might, in the future, lead the way towards large-scale profitable production of BS [42].

Due to their biological origin, BS are generally considered safer than synthetic pharmaceuticals, although, to date there have been very few studies carried out to confirm their lack of toxicity [14,36]. In a study of the skin potential irritation of trehalose lipids produced by *Rhodococcus erythropolis* 51T7 in mouse fibroblast and human keratinocyte lines, results indicated that the BS was less irritating than SDS, and could be therefore used in cosmetic preparations [39].

Trehalose-6,6'-dimycolate (TDM), or cord factor, has exhibited a number of different biological activities, including antitumor and immunomodulating functions [14], although Mycobacterial TDM use is limited by the relatively high toxicity of the molecule and the potential pathogenicity of producer strains. TDM produced by *Rhodococcus* sp. 4306 was demonstrated to exhibit lower toxicity, both *in vivo* and *in vitro*, than mycobacterial TDM [14].

Sophorolipids are other promising modulators of the immune response, being able to decrease sepsis related mortality *in vivo*, adhesion molecules levels, cytokine production and IgE levels [42]. Sophorolipids in lactone form have also been proposed as anti-ageing agents due to their capacity to stimulate skin dermal fibroblast cell metabolism and, more particularly, collagen neosynthesis [42].

Several BS exhibit antibacterial, antifungal and antiviral activities, which make them relevant molecules for applications in combating many diseases and infections. BS with known antimicrobial activity include surfactin and iturin produced by *Bacillus subtilis* strains, mannosylerythritol lipids from *Candida antarctica*, and BS isolated from *Streptococcus thermophilus* A and *Lactococcus lactis* [45]. Cyclic lipopeptides are often found to be antimicrobial. For example, the cyclic lipopeptide antibiotic surfactin has antibiotic, anticlotting, haemolytic and antiviral properties. In vesicle studies, surfactin was found to incorporate into membranes at low concentrations and induce slow leakage due to changes in membrane ultrastructure [1,46,47]. Two cyclic lipodepsipeptides isolated from *Pseudomonas fluorescens* have also shown antifungal and anti-weed activities [1]. A rhamnolipid mixture obtained from *P. aeruginosa* AT10 has exhibited inhibitory activity against the bacteria *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Alcaligenes faecalis*,

Serratia marcescens, *Mycobacterium phlei* and *Staphylococcus epidermidis* and excellent antifungal properties against *Aspergillus niger*, *Chaetium globosum*, *Penicillium chrysogenum*, *Aureobasidium pullulans* and the phytopathogenic *Botrytis cinerea* and *Rhizoctonia solani* [15]. *Pseudomonas aeruginosa* 47T2, growing with waste frying oil as a carbon source produces a mixture of rhamnolipids with wide antimicrobial activity [48]. Rhamnolipids are also able to inhibit the growth of harmful bloom algae species, *Heterosigma akashivo* and *Protocentrum dentatum*. The mannosylerythritol lipid (MEL), a glycolipid surfactant from *Candida antarctica*, has demonstrated antimicrobial activity particularly against Gram-positive bacteria [42].

Infections resulting from microbial adhesion to biomaterial surfaces have been observed on nearly all medical devices with severe economic and medical consequences. Biofilm infections pose a number of challenges. BS have been studied as antiadhesive agents in surgicals, representing an interesting approach because it may be possible to modify the surface properties to make it simultaneously anti-adhesive and give it antimicrobial activity [36, 42]. *Lactobacillus paracasei* sp. *paracasei* BS showed anti-adhesive activity against *Streptococcus sanguis* (72.9%), *Staphylococcus aureus* (76.8%), *Staphylococcus epidermidis* (72.9%) and *Streptococcus agalactiae* (66.6%). This finding is promising to control infections in the urinary, vaginal and gastrointestinal tracts, and in the skin [45].

Concerning the antiviral properties of BS, inhibition of growth of HIV in leukocytes by BS has been cited in the literature [49]. The sophorolipid produced by *Candida bombicola* and its structural analogues have been studied for their spermicidal, anti-HIV and cytotoxic activities [42].

The succinoyl-trehalose lipid of *Rhodococcus erythropolis* has been reported to inhibit herpes simplex virus and influenza virus and a 1% emulsion of rhamnolipids has been shown to be effective for the treatment of leaves of *Nicotiana glutinosa* infected with tobacco mosaic virus and for the control of potato virus-x disease [14,40,49].

Moreover, a trehalose lipid BS produced by *Rhodococcus* spp. has been shown to cause hemolysis of human erythrocytes through a colloidosmotic mechanism. This pore-type behavior can be explained by the formation of enhanced permeability domains in the erythrocyte membrane, as observed in model membranes [50,51].

Concerning the potential antitumoural activity of BS, first evidences of growth arrest, apoptosis and differentiation induced by glycolipids in different cancer cell line have been reported [14,42].

Another interesting application of BS could be as pulmonary surfactant in cases of deficiency. The isolation of genes for protein molecules of this surfactant and cloning in bacteria has made possible its fermentative production for medical applications [40,42,49].

BS are also very attractive in the health care and cosmetic industries. A large number of compounds for cosmetic applications are prepared by enzymatic conversion of hydrophobic molecules by various lipases and whole cells. The cosmetic industry demands surfactants with a minimum shelf life of three years. Therefore, saturated acyl groups are preferred over the unsaturated compounds. Monoglycerides, one of the widely used surfactant in the cosmetic industry, has been reported to be produced from glycerol-tallow by using *Pseudomonas fluorescens* lipase treatment [40,49].

Finally, BS have several promising applications in the food industry as food additives. Bioemulsifiers may stabilize oil-in-water (O/W) and water-in-oil (W/O) emulsions. The type of emulsion formed by the water and oil depends primarily on the nature of the emulsifying agent and, to a certain extent, on the process used in preparing the emulsion and the relative proportions of oil and water present. Lecithin and its derivatives, fatty acid esters containing glycerol, sorbitano, or ethylene glycol, and ethoxylated derivatives of monoglycerides are currently in use as emulsifiers in the food industries worldwide [40, 49]. A novel bioemulsifier from *Candida utilis* has shown potential use in salad dressing [49]. Haba et al. [17] tested the ability of rhamnolipids to emulsify different oils used in a number of industries forming a stable emulsion with liseed oil. Trealose tetraester (THL) produced by *Rhodococcus erythropolis* 51T7, revealed effective emulsification with water and paraffin or isopropyl myristate. The composition of 11.3-7.5-81.8 (isopropyl myristate-THL-W) was stable for at least 3 months. To examine the solubilization behaviour of isopropyl myristate and paraffin oil in the multicomponent BS solutions, two-phase diagrams of the ternary system water–surfactant–oil were developed. Figure 3 shows the zone of 100% emulsion phase (shaded area) obtained after mixing different quantities of components. When paraffin was used as the oil phase, the diagram revealed a wide zone of total emulsion. Out of the shaded area, partial emulsion zones with different texture and aspect were observed.

Due to its more hydrophilic character, when isopropyl myristate was used as the hydrophobic component, the total emulsion zone moved to the left vertex, which is the area of higher water proportion. THL proved to be an effective emulsifier when there was a low amount of myristate oil in the mixture [52]. Apart from their obvious role as emulsifying agents, BS can have several other functions in food. For example, to control the agglomeration of fat globules, stabilize aerated systems, improve texture and

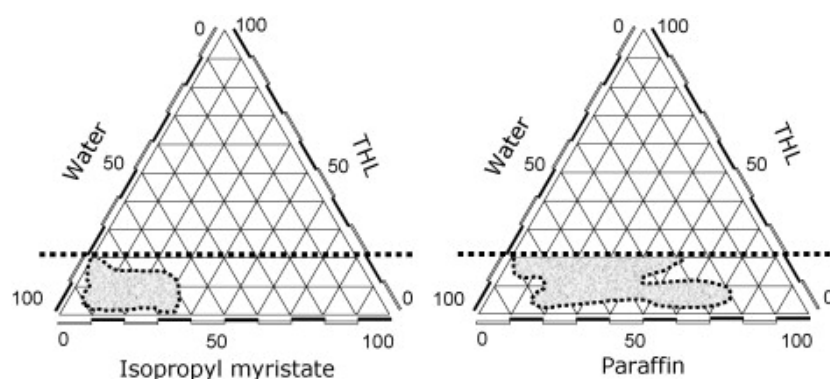


Figure 3. Phase diagram illustrating the emulsion area with isopropyl myristate (left) and paraffin (right) [39].

shelf-life of starch-containing products, modify rheological properties of wheat dough and improve consistency and texture of fat-based products. They are also utilized as fat stabilizers and antispattering agents during cooking of oil and fats. Improvement in dough stability, texture, volume and conservation of bakery products is obtained by the addition of rhamnolipid surfactants [42].

The involvement of BS in microbial adhesion and detachment from surfaces has also been investigated for food industry application. A surfactant released by *Streptococcus thermophilus* has been used for fouling control of heat-exchanger plates in pasteurizers, as it retards the colonization of other thermophilic strains of *Streptococcus* responsible for fouling. The preconditioning of stainless steel surfaces with a BS obtained from *Pseudomonas fluorescens* is able to inhibit the adhesion of *Listeria monocytogenes* L028 strain [42]. It is evident that the anti-adherent property of BS is very interesting in medicine. The use of plastic material (catheter, sondes, etc) is a challenge consequence of bacterial adhesion. A BS pre-treatment on this material can confer anti-adherent and antimicrobial properties.

7. Conclusions

Surfactants are an important class of chemical products in view of the volumes sold and their great variety of applications. During the last decades, a wide variety of microorganisms have been reported to produce numerous types of BS. Their biodegradability and lower toxicity give them an advantage over their chemical counterparts. The most important factor limiting BS use is the production cost, however, the small amounts of product required and the special properties described makes BS high valuable molecules. Application of BS as food additives, specialty chemicals,

biocontrol agents and as a new generation molecules for health and beauty care permits to think in these compounds as the molecules of the future.

Acknowledgements

The authors thank the Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain for funding this research with grant CTQ2010-2183-01/PPQ, and Generalitat de Catalunya for grant 2009SGR 819. CB-D acknowledges the grant funded by CONICYT (Chile).

References

1. Van Hamme, J.D., Singh, A., Ward, O.P. 2006, *Biotechnol. Adv.*, 24, 604.
2. Banat, I.M., Makkar, R.S., Cameotra, S.S. 2000, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53, 495.
3. Develter, D.W.G., Laurysen, L.M.L. 2010, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 112, 62.
4. Vaz, D. A., Gudiña, E.J., Alameda, E.J., Teixeira, J.A., Rodrigues, L.R. 2012, *Colloid. Surf. B Biointerf.*, 89, 167.
5. Syldatk, C., Hausmann, R. 2010, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 112, 615.
6. Makkar, R.S., Cameotra, S.S., Banat, I.M. 2011, *AMB Express*, 1,5.
7. Burgos-Díaz, C., Pons, R., Espuny, M.J., Aranda, F.J., Teruel, J.A., Manresa, A., Ortiz, A., Marqués, A.M, 2011, *J. Colloid Interface Sci.*, 361, 195.
8. Ron, E.Z., Rosenberg, E. 2001, *Environ. Microbiol.*, 3, 229.
9. Davey, M.E., Caiazza, N.C., O'Toole, G.A. 2003, *J. Bacteriol.*, 185, 1027.
10. Espinosa-Urgel, M. 2003, *J. Bacteriol.*, 185, 699.
11. Sandrin, T.R., Chech, A.M., Maier, R.M. 2000, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 4585.
12. Juwarkar, A.A., Nair, A., Dubey, K.V., Singh, S.K., Devotta, S. 2007, *Chemosphere*, 68, 1996.
13. Dahrazma, B., Mulligan, C.N. 2007, *Chemosphere* 69, 705.
14. Francetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Smyth, T.J.P. Banat, I.M. 2010, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 112, 617.
15. Ábalos, A. Pinazo, A., Infante, M.R., Casals, M., García, F., Manresa, A. 2001, *Langmuir*, 17, 1367.
16. Benincasa, M., Ábalos, A., Oliveira, I., Manresa, A. 2004, *Antonie van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol Microbiol.*, 85, 1.
17. Haba, E., Pinazo, A., Jauregui, O., Espuny, M.J., Infante, M.R., Manresa, A., 2003, *Biotechnol. Bioengineer.*, 81, 3.
18. Abdel-Mawgoud, A.M., Lépine, F., Déziel, E. 2010. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 1323.
19. Satpute, S.K., Banat, I.M., Dhakephalkar, P.K., Banpurkar, A.G., Chopade, B.A. 2010, *Biotechnol. Adv.*, 28, 436.
20. Kretschmer, A., Bock, H., Wagner, F. 1982, *Appl. Environ. Microbiol.*, 44, 864.
21. Maneerat, S, Nitoda, T, Kanzaki, H, Kawai, F. 2005, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 67, 679.

22. Mercadé, M.E., Monleón, L., Andrés, C., Rodón, I., Martínez, E., Espuny, M.J., Manresa, A. 1996, *J. Appl. Microbiol.*, 81, 161.
23. Espuny, M.J., Egido, S., Mercadé, M.E., Manresa, A. 1995, *Toxicol. Environ. Chem.*, 48, 1-6.
24. Ferhata, S., Mnifb, S., Badisa, A., Eddouaoudaa, K., Alouaouic R., Boucherita, A., Mhirib, N., Moulai-Mostefac, N., Sayadib, S. 2011, *Internat. Biodeterior. Biodegrad.*, 65, 1182.
25. Desai, A.J., Patel, K.M., Desai, J.D. 1988, *Curr. Sci.*, 57, 500.
26. Gutiérrez, T., Mulloy, B., Bavington, C., Black, K., Green, D.H. 2007, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 76, 1017.
27. Abraham, W.R., Meyerm H., Yakimov, M. 1998, *Biochem. Biophys. Acta*, 1393, 57.
28. Poremba, K., Gunkel, W., Lang, S., Wagner, F. 1991, *Environ. Toxicol. Water Qual.*, 6, 157.
29. Schulz, D., Passeri, A., Schmidt, M., Lang, S., Wagner, F., Wray, V., *et al.* 1991, *Z. Naturforsch. C.*, 46, 197.
30. Thavasi, V.R.M., Nambaru, S., Jayalakshmi, S., Balasubramanian, T., Banat, I.M. 2009, *Mar. Biotechnol.*, 11, 551.
31. Maneerat, S., Bamba, T., Harada, K., Kobayashi, A., Yamada, H., Kawai, F. 2006, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 70, 254.
32. Thavasi, R., Jayalakshmi, S., Balasubramanian, T., Banat, I.M. 2007, *Lett. Appl. Microbiol.*, 45, 686.
33. Das, P., Mukherjee, S., Sen, R. 2008, *J. Appl. Microbiol.*, 4, 675.
34. Yakimov, M.M., Golyshim P,N., Langm S., Moorem E,R,B., Abraham W,F., Lünsdorf H., *et al.* 1998, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48, 339.
35. Thavasi, R., Jayalakshmi, S., Balasubramanian, T., Banat, I.M. 2008, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 917.
36. Rodrigues, L.R. 2011, *J. Biotechnol. Biomaterial.*, 1, 1.
37. Van Echten-Deckert, G. 2000, *Method. Enzymol.*, 312, 64.
38. Cameotra, S.S, Makkar, R.S. 2004, *Curr. Opin. Microbiol.*, 7, 262.
39. Marqués, A.M., Pinazo, A., Farfan, M., Aranda, F.J., Teruel, J.A., Ortiz, A., Manresa, A., Espuny, M.J. 2009, *Chem. Phys. Lipids.*, 158, 110.
40. Gautam, K.K., Tyagi, V.K. 2006, *J. Oleo Sci.*, 55, 155.
41. Lang, S., Philp, J.C. 1998, *Antonie Van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 74, 59.
42. Muthusamy, K., Gopalakrishnan, S., Ravi, T.K., Panchaksharam, S. 2008, *Curr. Sci.*, 94, 6.
43. Ortiz, A., Teruel, J.A., Manresa, A., Espuny, M.J., Marques, A., Aranda, F.J. 2011, *Biochem. Biophys. Acta*, 1808, 2067.
44. Singh, A, Van Hamme, J.D., Ward, O.P. 2007, *Biotechnol. Adv.*, 25, 99.
45. Gudiña, E.J., Rocha, V., Teixeira, J.A., Rodrigues, L.R., 2010, *Lett. Appl. Microbiol.*, 50, 419.
46. Carrillo, C, Teruel, J.A., Aranda, F.J., Ortiz, A. 2003, *Biochim. Biophys. Acta*, 1611, 91.
47. Christofi, N, Ivshina, I.B. 2002, *J. Appl. Microbiol.*, 93, 915.

48. Haba, E., Pinazo, A., Jauregui, O., Espuny, M.J., Infante, M.R., Manresa, A. 2003, *Bitechnol. Bioengin.*, 81, 316.
49. Desai, J.D., Banat, I.M. 1997, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 61, 47.
50. Zaragoza, A, Aranda, F.J., Espuny, M.J., Teruel, J.A., Marqués, A., Manresa, A, Ortiz, A. 2009, *Langmuir*, 21, 7892.
51. Zaragoza, A, Aranda, F.J, Espuny, M.J., Teruel, J.A., Marqués, A, Manresa, A, Ortiz, A. 2010, *Langmuir*, 26, 8567.
52. Marqués, A.M., Pinazo, A., Farfan, M., Aranda, F.J., Teruel, J.A., Ortiz A., Manresa, A., Espuny, M.J. 2009, *Chem. Phys. Lipids*, 158, 110.