



# **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

## **ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**

Interacción de un Diramrólípido Biotensioactivo  
con Membranas Fosfolípídicas Modelo  
y Membranas Biológicas

**D. Alfonso Oliva Marín**

**2022**





# UNIVERSIDAD DE MURCIA

## ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Interacción de un diramnlípido biotensioactivo con  
membranas fosfolipídicas modelo y membranas  
biológicas.

D. Alfonso Oliva Marín

Director

Dr. Antonio Ortiz López



## **PUBLICACIONES ORIGINALES QUE CONFORMAN LA TESIS DOCTORAL**

La presente tesis doctoral con título "Interacción de un dirhamnolípido biotensioactivo con membranas fosfolipídicas modelo y membranas biológicas" se presenta como un compendio de tres artículos de investigación publicados, con el acuerdo del director de la tesis doctoral y la Comisión Académica responsable del programa de doctorado en Biología Molecular y Biotecnología.

Las referencias de los artículos que componen esta tesis doctoral se encuentran recogidas en el epígrafe 6, y se detallan también a continuación:

1. Julia Ortiz, Alfonso Oliva, José A. Teruel, Francisco J. Aranda, Antonio Ortiz, Effect of pH and temperature on the aggregation behaviour of dirhamnolipid biosurfactant. An experimental and molecular dynamics study, *Journal of Colloid and Interface Science*, Volume 597, 2021, Pages 160-170. DOI: 10.1016/j.jcis.2021.03.177
2. Alfonso Oliva, José A. Teruel, Francisco J. Aranda, Antonio Ortiz, Effects of a dirhamnolipid biosurfactant on the structure and phase behaviour of dimyristoylphosphatidylserine model membranes, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Volume 185, 2020. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.110576
3. Alfonso Oliva, Scheherezade García-Carrillo, Antonio Ortiz, Francisco J. Aranda, José A. Teruel, Interaction of a dirhamnolipid biosurfactant with sarcoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA1a), *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Volume 699, 2021. DOI: 10.1016/j.abb.2021.108764



## **Agradecimientos**

*Me gustaría dedicar unas palabras a las personas que han hecho posible esta tesis doctoral.*

*Agradecer a mis abuelos, mi hermano y mis padres, mi verdadera familia, por su apoyo incondicional, su cariño y comprensión, gracias por acompañarme a lo largo de este camino y haberme ayudado a ser la persona que soy hoy.*

*A mis amigos, que con paciencia han escuchado una y otra vez explicaciones de una tesis que por fin verá la luz del día. A Xavi, por tantos años de amistad, a las Tortugas, Alberto, Javi y Josemi por acompañarme en mil y una locuras, y a mis compañeros doctores, Adrián, FJ y Leopoldo, por las horas de llamadas, repasos y ánimos, que lo que unió la universidad no lo separe la vida.*

*A Don Jesús Villalgordo, profesor y maestro, gracias por creer en mí cuando yo aún era demasiado joven para poder hacerlo.*

*A mis primeros tutores, José Cansado y Marisa Madrid, que me iniciaron en el mundo de la investigación y me enseñaron a “ser un hombre” de ciencia.*

*A todos mis compañeros de departamento, Alessio, M<sup>a</sup> Dolores, Tere, David, Emilio y Jesús, gracias por vuestra amistad y compañerismo, os deseo una maravillosa carrera en la ciencia y en la vida.*

*A Francisco José Aranda y Jose Antonio Teruel, gracias por acogerme en vuestro grupo de investigación, y las largas horas de atención, escucha y enseñanza.*

*Y finalmente a mi tutor, director y maestro en todo el sentido de la palabra, Antonio Ortiz López, por valorarme, enseñarme y formarme a lo largo de todos estos años, gracias por tu paciencia, apoyo y sabiduría durante todo este camino y por haberme formado como científico y como persona.*





# ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. Acrónimos y abreviaturas.....	1
2. Resumen / Abstract.....	2
3. Introducción general.....	6
3.1. Tensioactivos.....	6
3.1.1. Definición y clasificaciones.....	6
3.1.2. Propiedades fisicoquímicas de los tensioactivos.....	7
3.1.2.1. Actividad superficial y estructuras de autoensamblaje.....	8
3.1.2.2. Micelas, estructuras de autoensamblaje y propiedades asociadas.....	9
3.1.2.3. Otras propiedades de los tensioactivos.....	10
3.2. BIOTENSIOACTIVOS.....	11
3.2.1. Definición y clasificación de los biotensioactivos.....	11
3.2.2. Propiedades características de los biotensioactivos.....	16
3.2.2.1. Agregación de los biotensioactivos: autoensamblaje .....	17
3.2.2.2. Parámetros que influyen en el autoensamblaje .....	18
3.2.2.3. Autoensamblaje en el seno de la disolución .....	18
3.2.2.4. Autoensamblaje en las interfases.....	19
3.2.3. Aplicaciones de los biotensioactivos .....	19
3.3. RAMNOLÍPIDOS.....	21
3.3.1. Biosíntesis de los ramnolípidos.....	21
3.3.2. Propiedades y ventajas del uso de los ramnolípidos.....	22
3.3.2.1. Propiedades fisicoquímicas de los ramnolípidos.....	23
3.3.2.2. Aplicaciones industriales de los ramnolípidos.....	25
4. Bibliografía.....	27

5. Justificación y Objetivos.....	33
6. Publicaciones originales que conforman esta tesis doctoral.....	35
1. Effect of pH and temperature on the aggregation behaviour of a dirhamnolipid biosurfactant. An experimental and molecular dynamics study.....	36
2. Effect of a dirhamnolipid biosurfactant on the structure and phase behaviour of dimyristoilphosphatidylserine model membranes.....	38
3. Interaction of a dirhamnolipid biosurfactant with sarcoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA1a).....	40
7. Conclusiones.....	42
7.1. Conclusiones específicas.....	42
7.2. Conclusiones generales.....	43

## **1. Acrónimos y Abreviaturas**

ACP: Proteína transportadora de grupos acilo

CMC: Concentración Micelar Crítica

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

diRL: Diramnlípido.

DMPS: 1,2-Dimiristil-sn-glicero-3-fosfoserina

GUV: Vesículas unilamelares gigantes

HAA: 3-(3-hidroxialcanoiloxi)alcanoato

HMW: Alto peso molecular

LMW: Bajo peso molecular

LUV: Vesículas unilamelares grandes

MEL: Lípidos de manosileritritol

MLV: Vesículas Multilamelares

$\gamma_{TS}$ : Tensión superficial

SERCA1a: Calcio ATPasa de retículo sarco/endoplásmico 1a

SUV: Vesículas unilamelares pequeñas

## 2. RESUMEN

Los ramnolípidos son glicolípidos producidos por la bacteria Gram negativa *Pseudomonas aeruginosa* formados por la unión de uno o dos anillos de ramnosa a una región hidrofóbica con una o dos cadenas de ácidos grasos, denominándose monoramnolípidos o diramnolípidos (diRL), respectivamente. Estas moléculas son biotensioactivos, compuestos de origen microbiano con estructura anfipática responsable de su actividad superficial sobre las interfases. Los tensioactivos se distinguen por su capacidad de formar diferentes agregados estructurales cuando su concentración en un medio acuoso es elevada, permitiéndoles solubilizar compuestos insolubles. Otras propiedades como su acción emulsionante, estabilizante o antioxidante les otorgan una gran relevancia en diferentes aplicaciones biotecnológicas.

Los ramnolípidos son unos de los glicolípidos más estudiados, destacando por presentar actividades biológicas muy interesantes, como su capacidad para inhibir el crecimiento de *Bacillus subtilis*, eliminar las esporas de varias especies de tres géneros de patógenos de plantas o su capacidad para la inhibir del crecimiento del hongo dimórfico *Mucor circinelloides*. Con el objetivo de caracterizar los procesos fisicoquímicos responsables de estas actividades diversos estudios han abordado el estudio de la interacción entre ramnolípidos y diferentes membranas biológicas y membranas modelo, proteínas, el remodelado lipídico de la membrana, la permeabilización de membranas, o la formación de liposomas dependientes de pH, entre otros. Por otro lado, varios trabajos han estudiado previamente el comportamiento agregacional de los ramnolípidos en agua, describiendo numerosas estructuras entre las que se incluyen micelas, y varios tipos de vesículas o membranas empaquetadas, indicando que los ramnolípidos pueden formar agregados lamelares, vesiculares o micelares en una forma pH-dependiente.

Dada la experiencia de nuestro grupo de investigación en la caracterización de la interacción de ramnolípidos con fosfolípidos de membrana y proteínas, así como en el estudio del comportamiento agregacional de los ramnolípidos en medio acuoso, nos planteamos realizar un trabajo enfocado a ampliar el conocimiento en estas líneas de investigación.

En el primer trabajo, se ha caracterizado el comportamiento de fases de mezclas de una especie sintética de fosfatidilserina, 1,2-dimiristil fosfatidilserina (DMPS) con un diramnolípidos biotensioactivo producido por *P. aeruginosa*. Se ha observado que concentraciones crecientes de diRL provocan un incremento progresivo en la temperatura de la transición de fase de gel a líquido-cristalino, así como la separación de fases a concentraciones elevadas del biotensioactivo. Por otra parte, el estudio de los principales grupos funcionales ha revelado un aumento tanto en el desorden de las cadenas acílicas como en la hidratación de las cabezas polares del fosfolípido. Esta sobrehidratación observada en ambas fases, gel y líquido-cristalina, es consecuencia de un

cambio conformacional que causa un aumento de la exposición de estas regiones a la capa de agua intermembrana.

Posteriormente, se abordó el estudio de la interacción entre diRL y la proteína transmembrana  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de retículo sarco/endoplásmico (SERCA1a), una proteína transportadora de iones presente en las membranas de los almacenes celulares de calcio. A raíz de este trabajo hemos demostrado que la interacción con diRL provoca cambios conformacionales que inestabilizan a la enzima facilitando su desnaturalización térmica, inhibiendo también su actividad ATPasa a concentraciones por debajo del límite de solubilización de membrana. La interacción diRL-SERCA no está relacionada con su actividad superficial sino con las propiedades fisicoquímicas de esta molécula.

Finalmente, se estudió el efecto de distintas condiciones de pH y temperatura sobre la estabilidad de los diferentes agregados estructurales supramoleculares del diRL. Entre los resultados de este trabajo cabe resaltar que el diRL adopta estructuras multilamelares organizadas a pH y temperaturas bajas que se ven alteradas al aumentar cualquiera de estos parámetros. Así mismo se describe una transición termotrópica endotérmica en torno a 34°C de los agregados de diRL protonado.

En su conjunto, esta tesis doctoral aporta nueva información sobre las propiedades fisicoquímicas del diRL en medio acuoso y su interacción con membranas fosfolípicas modelo. Cada publicación, individualmente, es una contribución relevante para desvelar el complejo mecanismo por el que este biotensioactivo interacciona con las membranas biológicas a través de sus diferentes componentes estructurales.

## 2. ABSTRACT

Rhamnolipids are glycolipids produced by the Gram-negative bacteria *Pseudomonas aeruginosa* formed through the linkage of one or two rhamnose rings to a hydrophobic region composed by one or two fatty acids, being called monorhamnolipids and dirhamnolipids (diRL) respectively. These molecules are biosurfactants, compounds produced by microorganisms with an amphipathic structure responsible for its surface activity over the interfaces. Surfactants are distinguished by their capacity to form structural aggregates when its concentration in an aqueous medium is high, which enables them to solubilize insoluble compounds. Other properties, such as their emulsifying, stabilizing or antioxidative actions, grants them a great relevance on biotechnological applications.

Rhamnolipids are some of the most studied glycolipids, being highlighted by its very interesting biological activities, namely, their capacity to inhibit the growth of *Bacillus subtilis*, eliminate spores of several species among three genera of plant pathogens, or by their capability to inhibit the growth of the dimorphic fungus *Mucor circinelloides*. To characterize the physicochemical processes responsible for these activities many researchers have focused on the study of the interaction between rhamnolipids and different biological and model membranes, proteins, lipid membrane remodeling, permeabilization of membranes or the formation of pH-dependent liposomes, among others. On the other hand, several works have previously studied the aggregation behavior of rhamnolipids in water, describing numerous structures which include micelles, and several types of vesicles or stacked membranes, indicating that rhamnolipids can form lamellar, vesicular, or micellar aggregates in a pH-dependent fashion.

On the basis of the previous experience of our research group on the characterization of the interaction between rhamnolipids and membrane phospholipids and proteins, as well as on the study of the aggregation behavior of rhamnolipids in aqueous medium, it was considered to carry out a work focused on expanding knowledge within these lines of research.

In the first study, the phase behavior of mixtures of a synthetic species of phosphatidylserine, 1,2-dimyristoylphosphatidylserine, with a diRL fraction produced by *P. aeruginosa*, was characterized. We have observed that increasing concentrations of diRL caused a progressive rise in the temperature of the gel to liquid-crystalline phase transition, as well as phase separation at high concentrations of biosurfactant. On the other hand, the study of the main functional groups unveiled an increase of both acyl chain disorder and the hydration of the polar head groups of the phospholipid. This increased hydration observed in both gel and liquid-crystalline phases, is due to a conformational change that leads to an augmented exposition of these regions to the water layer.

Secondly, the interaction between diRL and the transmembrane model protein sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA1a), an ion transport protein present in the membranes of intracellular calcium storages, was studied. As a result of this work, we demonstrated that the interaction with diRL causes conformational changes that make the enzyme unstable, facilitating its thermal denaturation, and inhibiting its ATPase activity at concentrations below the membrane solubilization threshold.

Finally, the effect of various pH and temperature values on the stability of the different aggregation structures of the diRL was studied. Among the many results, it should be noted that diRL adopts fairly organized multilayered structures at low pH and temperature, which become highly disordered upon increasing any of these parameters. In addition, an endothermic thermotropic transition around 34°C for the diRL aggregates formed by the protonated diRL is described.

As a whole, this thesis provides new information on the physicochemical properties of the diRL in water, and its interactions with phospholipid model membranes. Each publication, taken individually, provides individual and necessary contributions to unveil the complex mechanism by which this biosurfactant affects biological membranes through its interaction with their different components.

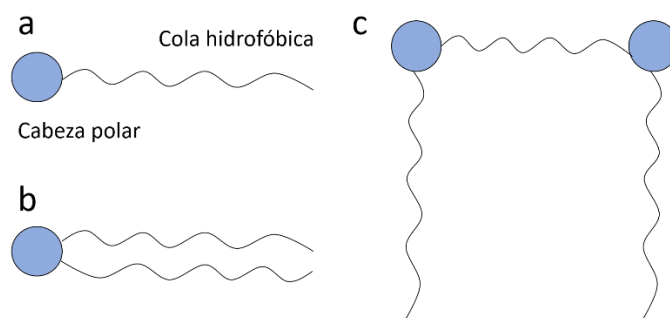
### 3. INTRODUCCIÓN GENERAL

#### 3.1. TENSIOACTIVOS

##### 3.1.1. DEFINICIÓN Y CLASIFICACIONES

El término tensioactivo abarca un amplio grupo de compuestos que va desde moléculas biológicas como los fosfolípidos componentes de las membranas celulares, hasta una gran variedad de productos biológicos derivados y producidos químicamente incluyendo jabones, aceites de motor o fármacos.

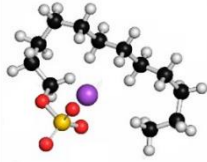
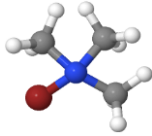
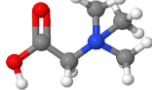

Los tensioactivos son compuestos con actividad superficial, al incorporarse en un medio líquido tienen la capacidad de adsorberse en las interfases alterando sus propiedades. Esta actividad se debe principalmente a la presencia de dos regiones diferenciadas en su estructura, una fracción polar, afín a disolventes polares como el agua, y una fracción apolar, afín a disolventes no polares como el hexano u otros disolventes orgánicos típicos (Figura 1), son por tanto moléculas anfipáticas. La región apolar o cola hidrofóbica suele estar compuesta por una o dos cadenas hidrocarbonadas largas unidas covalentemente a una cabeza o región polar cuya composición determina la naturaleza iónica del tensioactivo (Tabla 1).



**Figura 1.** Estructura esquemática de distintos tensioactivos: (a) Tensioactivo simple con una sola cadena hidrofóbica. (b) Tensioactivo con doble cadena hidrofóbica, (c) tensioactivo dimérico o gémínico compuesto por dos unidades unidas por un espaciador.



Tabla 1. Clasificación de los tensioactivos según su naturaleza iónica.

<b>Tensioactivos aniónicos</b>	<b>Dodecilsulfato de sodio (SDS)</b>
La cabeza hidrófila contiene grupos aniónicos como sulfonato ( $\text{RSO}_3^-$ ), sulfato ( $\text{ROSO}_3^-$ ), carboxilato ( $\text{RCOO}^-$ ) fosfato ( $\text{ROPO}_3^-$ ), que hacen que sean moléculas muy polares. Se incluyen detergentes comunes como el jabón ( $\text{RCOO}^-\text{Na}^+$ ) o dodecilsulfato de sodio (SDS).	
<b>Tensioactivos catiónicos</b>	<b>Bromuro de tetrametilamonio</b>
La región hidrófila se compone de grupos catiónicos, normalmente son aminas cuaternarias con una cadena hidrocarbonada larga ( $\text{R}_4\text{N}^+\text{X}^-$ ) o sus sales. Ejemplos son desinfectantes como el cloruro de benzalconio (ADBAC) o el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB).	
<b>Tensioactivos anfóteros o zwitterónicos</b>	<b>N,N,N-trimetilglicina</b>
La región hidrófila contiene grupos catiónicos y aniónicos, su naturaleza iónica depende del pH del medio. En este grupo se incluyen por ejemplo las betaínas ( $\text{RN}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{COO}^-$ ).	
<b>Tensioactivos no iónicos</b>	<b>Alcohol de polioxietileno</b>
La cabeza polar no posee grupos ionizables, presenta grupos alcohol ( $\text{ROH}$ ) o éter ( $\text{ROR}$ ), por lo que el carácter hidrofílico depende de la presencia de grupos como el polioxietileno (etoxilatos) o polioliol en su estructura.	

### 3.1.2. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS TENSIOACTIVOS

Los tensioactivos son moléculas orgánicas capaces de adsorberse y localizarse en las interfases provocando la alteración de sus propiedades físicas, interacción que se relaciona directamente con la estructura del tensioactivo y la naturaleza del medio. Se conoce como interfase a las zonas de contacto o fronteras entre sistemas líquido/líquido, sólido/líquido y gas/líquido, también conocida como superficie.

La propiedad característica de estos compuestos es su capacidad de formar distintas estructuras de autoensamblaje en disolución. Cuando se introducen monómeros de tensioactivo en una disolución acuosa éstos se distribuyen tanto en el seno de la disolución como en la interfase, dónde forman capas monomoleculares (monocapas) a bajas concentraciones. Conforme la concentración de tensioactivo aumenta hasta saturar el medio, los tensioactivos empezarán a asociarse formando estructuras de autoensamblaje más complejas como las micelas (monocapas cerradas) o vesículas (bicapas cerradas). Entre las propiedades asociadas a la actividad superficial y la

capacidad de autoensamblaje de los tensioactivos destacan su capacidad de reducir la tensión superficial, capacidad emulsionante, poder espumante, solubilización, detergencia, y aumento de la humectabilidad en superficies hidrofóbicas.

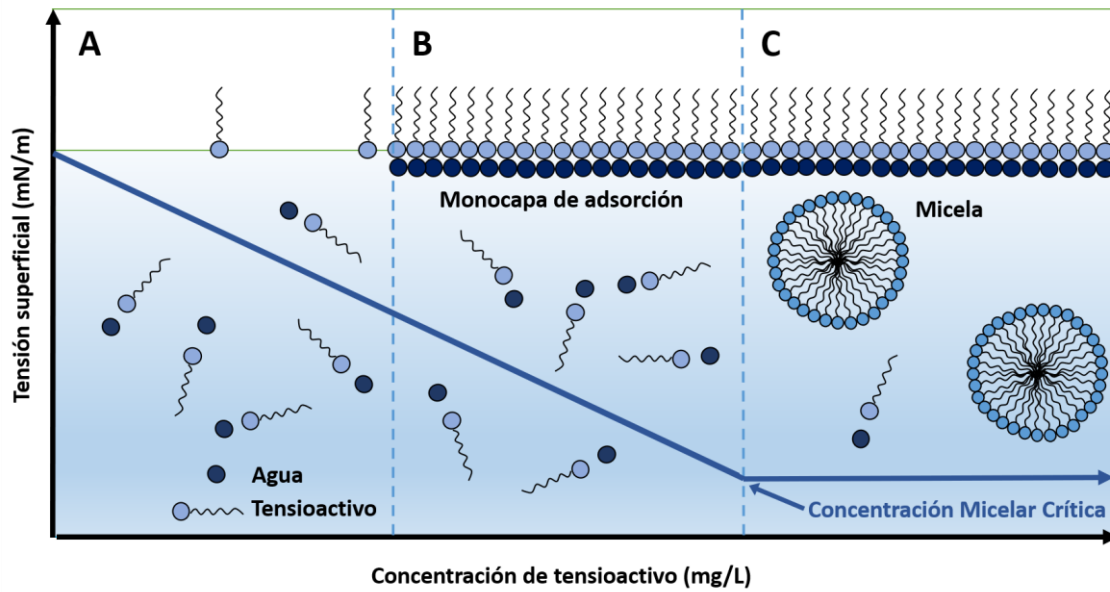
### *3.1.2.1. Actividad superficial y estructuras de autoensamblaje.*

Como ya comentamos anteriormente, los tensioactivos tienen la capacidad de reducir la tensión superficial de un disolvente, es decir, poseen actividad superficial. Mientras que en el seno de un líquido las fuerzas de atracción entre las diferentes moléculas se anulan entre sí, en la superficie existe una fuerza neta hacia el interior; el trabajo necesario para hacer frente a dicha fuerza es proporcional a la energía necesaria para aumentar la superficie por unidad de área, ó tensión superficial ( $\gamma_{TS}$ ).

La distribución de los motivos hidrofílicos e hidrofóbicos en la monocapa de adsorción depende de la estructura del tensioactivo y la naturaleza del medio. En el agua las cabezas polares quedarán orientadas al interior y las colas hidrofóbicas al exterior, evitándose así interacciones débiles entre moléculas con baja afinidad (cadenas alquilo-agua) reduciendo la energía libre del sistema y la tensión superficial.

Cada molécula de tensioactivo tiene asociado un valor de  $\gamma_{TS}$ , el cual disminuirá de manera proporcional conforme aumente la concentración de tensioactivo, alcanzando un valor mínimo cuando el medio se satura. Este valor crítico de la concentración de tensioactivo es conocido como Concentración Micelar Crítica o CMC (Figura 2).

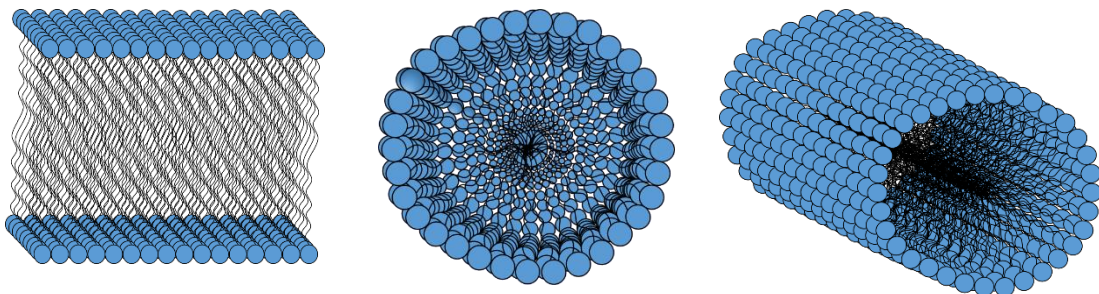
En este punto, los nuevos monómeros de tensioactivo no permanecen libres en la disolución, sino que comienzan a autoasociarse formando micelas, con las cadenas hidrocarbonadas en el interior de la estructura formando un núcleo hidrofóbico recubierto por una superficie de cabezas polares, al minimizar los contactos alquilo-agua se compensa la pérdida de entropía causada por la formación de micelas.



**Figura 2.** Tensión superficial en función de la concentración de tensioactivo: (A) distribución de los primeros monómeros de tensioactivo; (B) formación de la monocapa de adsorción en la interfase; (C) concentración micelar crítica: formación de micelas.

### 3.1.2.2. Micelas, estructuras de autoensamblaje y propiedades asociadas.

Los tensioactivos tienen la capacidad de autoasociarse formando diversas estructuras de autoensamblaje, que van desde las micelas (para las cuales se ha descrito una gran variedad de tipos) hasta asociaciones supramoleculares mayores como las bicapas y otras estructuras no lamelares (Figura 3).



**Figura 3.** Representación esquemática de varios modelos de estructuras de autoensamblaje: (a) configuración lamelar; (b) micela esférica; (c) micela cilíndrica.

Como ya se comentó anteriormente, al incrementar la concentración de tensioactivos en un medio, pueden agregarse formando otros tipos de asociaciones supramoleculares distintas. Las vesículas se forman por la asociación de bicapas y presentan formas variadas, generalmente esféricas y tubulares, y también bicapas apiladas, y al igual que las micelas son estructuras dinámicas que intercambian monómeros de tensioactivo con la disolución circundante.

La morfología de estos agregados se ve afectada por factores tales como la concentración de tensioactivo (número de monómeros en su estructura o número de agregación), su estructura, pH, temperatura, contracción, fuerza iónica, así como la presencia de cosolutos o contaminantes en el medio circundante (como podría ser la presencia de compuestos orgánicos en un medio acuoso).

A la hora de investigar las propiedades fisicoquímicas de estos compuestos se recurre a la preparación de liposomas. Los liposomas están formados por bicapas lipídicas cerradas de morfología esférica que contienen un volumen en su interior. Dependiendo de su tamaño se diferencia entre vesículas unilamelares pequeñas o SUV ('Small Unilamellar Vesicles') con 25-40 nm de diámetro, vesículas unilamelares grandes o LUV ('Large Unilamellar Vesicles') con 50-200 nm de diámetro y vesículas unilamelares gigantes o GUV ('Giant Unilamellar Vesicles') de entre 10 y 100  $\mu\text{m}$  de diámetro (Peetla *y col.*, 2009; Mouritsen *y col.*, 2011). Las vesículas multilamelares o MLV ('Multilamellar Vesicles') son estructuras de morfología oval o esférica con una estructura en bicapas concéntricas, que presentan un diámetro de entre 0.5-1.0  $\mu\text{m}$ .

### *3.1.2.3. Otras propiedades de los tensioactivos*

La estructura anfipática de los tensioactivos y su capacidad de autoasociarse en micelas les permite solubilizar compuestos insolubles o poco solubles en disolventes polares como el agua. Gracias a esta capacidad es posible solubilizar dentro del núcleo hidrofóbico de las micelas compuestos hidrofóbicos tales como grasas, moléculas aromáticas y fármacos, que quedarán unidos mediante enlaces alquilo-alquilo dando lugar a sistemas solubilizados.

Otro factor importante sobre las capacidades de los tensioactivos es la orientación de los monómeros en las interfases:

- Al situarse en la superficie de partículas en suspensión impiden su agregación debido a la repulsión que se produce entre las cabezas polares (capacidad dispersante).
- Su adsorción sobre superficies sólidas hidrofóbicas permite la formación de una capa de agua (acción humectante).
- Recubren cada espacio ocupado por aire en la formación de la espuma (acción espumante).
- Dependiendo del tensioactivo su localización en interfases agua-aceite o interfases aceite-agua da lugar a microemulsiones (acción emulsionante), estabilizando la mezcla de dos líquidos inmiscibles constituida por gotas de un líquido disperso en otro.

## **3.2. BIOTENSIOACTIVOS**

### **3.2.1. DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LOS BIOTENSIOACTIVOS**

Los biotensioactivos son tensioactivos de origen microbiano, generalmente producidos por bacterias, y en menor medida por levaduras y hongos. Pueden localizarse en la superficie celular microbiana, ser almacenados en el interior celular, o excretarse al exterior de la célula. A diferencia de los tensioactivos químicos sintéticos clasificados por la naturaleza iónica de su cabeza polar (Tabla 1), estos compuestos se clasifican generalmente por su composición química, su origen microbiológico y su peso molecular (Jahan *y col.*, 2020) (Tabla 2).

Los microorganismos dan lugar a un inmenso espectro de biotensioactivos con diferentes estructuras químicas de carácter anfifílico similar al de sus congéneres químicos. Estructuralmente, la región hidrofóbica es la más conservada, con cadenas hidrocarbonadas formadas por ácidos grasos, hidroxiácidos grasos o sus ésteres (saturados o insaturados), de entre 8 y 22 átomos de carbono. La región hidrofílica presenta una diversidad química mayor y su composición (azúcares, aminoácidos, péptidos, proteínas o grupos polares como los grupos carboxílicos, hidroxilo o fosfato) permite clasificar los biotensioactivos en glicolípidos, lipopéptidos, lipoproteínas, fosfolípidos y ácidos grasos, o biotensioactivos poliméricos.

Tabla 2. Clasificación general de los biotensioactivos

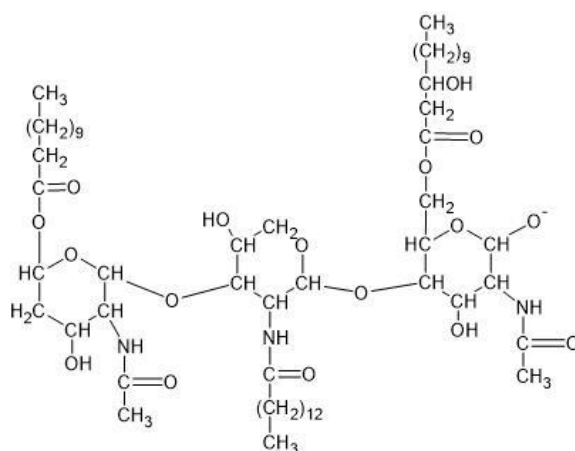
Clase	Biotensioactivos	Microorganismos
Bajo peso molecular	<b>Glicolípidos</b>	
	Ramnolípidos	<i>Pseudomonas aeruginosa, Burkholderia mallei, T. aquaticus, Melothermus rubber, Thermus sp.</i>
	Trealosalípidos	<i>Rhodococcus erythropolis, Arthrobacter paraffineus, Nocardia, Mycobacterium, Gordonia sp</i>
	Soforolípidos	<i>Candida lipolitica, Starmerella bombicola</i>
	Celobiolípidos	<i>Ustilago spp.</i>
	Manosileritritol lípidos	<i>Candida antarctica, Pseudozyma spp.</i>
	Glucolípidos	<i>Tsakamurella sp., Alcanivorax borkumensis, Alcaligenes sp.</i>
	<b>Lipopéptidos/lipoproteínas</b>	
	Surfactina, Subtilisina	<i>Bacillus subtilis, Bacillus pumilus</i>
	Iturina A, Fengicina	<i>Bacillus subtilis, Bacillus pumilus</i>
	Polimixinas	<i>Bacillus polymyxa, Paenibacillus polymyxa</i>
	Daptomicina	<i>Streptomyces roseosporus</i>
	Liquenisina	<i>Bacillus licheniformis</i>
	Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	Serrawitina	<i>Serratia marcesens</i>
	Ornitina-lípidos	<i>Gluconobacter sp., Agrobacterium sp., Pseudomonas sp., Thiobacillus sp.</i>
	<b>Ácidos Grasos</b>	<i>Nocardia erythropolis, Arthrobacter parateneus, Corynebacterium lepus, Penicilium spiculisporum</i>
<b>Fosfolípidos</b>	<i>Acinetobacter sp., Thiobacillus thiooxidans</i>	
Alto peso molecular	<b>Biotensioactivos poliméricos</b>	
	Emulsan, Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus RAG-1 &amp; KA53</i>
	Alasan	<i>Acinetobacter calcoaceticus BD413</i>
	Liposan	<i>Candida lypholitica</i>
	Lipomanan	<i>Candida tropicalis</i>
	Azúcar-proteína-lípido	<i>Pseudomonas fluorescens, P. náutica, Yamowia lypholitica</i>
	Polisacárido sulfatado	<i>Halomonas aurihalina</i>
Acetil heteropolisacárido	<i>Sphingomona spaucimobilis</i>	

En cuanto a la filogenia de microorganismos productores de biotensioactivos, encontramos organismos eucariotas como levaduras del género *Candida* y hongos del

género *Ustilagus*, así como procariotas representadas por 3 grupos: *Flavobacterium*, las bacterias grampositivas del género *Bacillus*, actinomicetos y géneros relacionados (*Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*) y gramnegativas entre las que destacan las bacterias del género *Pseudomonas* (Bodour y col., 2003).

La clasificación de los biotensioactivos en base a su peso molecular permite distinguir entre compuestos de alto y bajo peso molecular (Ron y Rosenberg, 2001; Jimoh y Jin, 2019):

- Los biotensioactivos de alto peso molecular (HMW) son conocidos como bioemulsionantes, actúan como agentes emulsionantes estabilizando mezclas de agua e hidrocarburos líquidos y, aunque tienen actividad superficial, no disminuyen esencialmente la tensión superficial. Este grupo se encuentra constituido por moléculas poliméricas con una vasta diversidad estructural incluyendo polisacáridos, proteínas, lipopolisacáridos, lipoproteínas o mezclas complejas de estos compuestos llamadas lipoheteropolisacáridos (Camacho-Chab y col., 2013). El HMW más conocido es un heteropolisacárido sintetizado por la bacteria *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 denominado Emulsan (Rosenberg y Ron, 1997). Su componente principal es un esqueleto heteropolisacárido formado por la repetición de unidades de un trisacárido de N-acetil-D-galactosamina, ácido N-acetilgalactosaminurónico y di-amino-6-deoxi-D-glucosa unidas covalentemente a una porción de ácidos grasos a través de enlaces N-acil y O-éster (Figura 4).



**Figura 4.** Estructura química del biotensioactivo polimérico Emulsan.

- En la categoría de biotensioactivos de bajo peso molecular (LMW) se incluyen ácidos grasos, fosfolípidos y aminoácidos unidos a lípidos, así como lipopéptidos y glicolípidos, siendo estos últimos los dos grupos principales dentro de esta clasificación. Los LMW se caracterizan por su capacidad de reducir la tensión superficial en medios acuosos e interfases y por presentar una estructura anfipática con una región polar y una región hidrofóbica bien definidas.

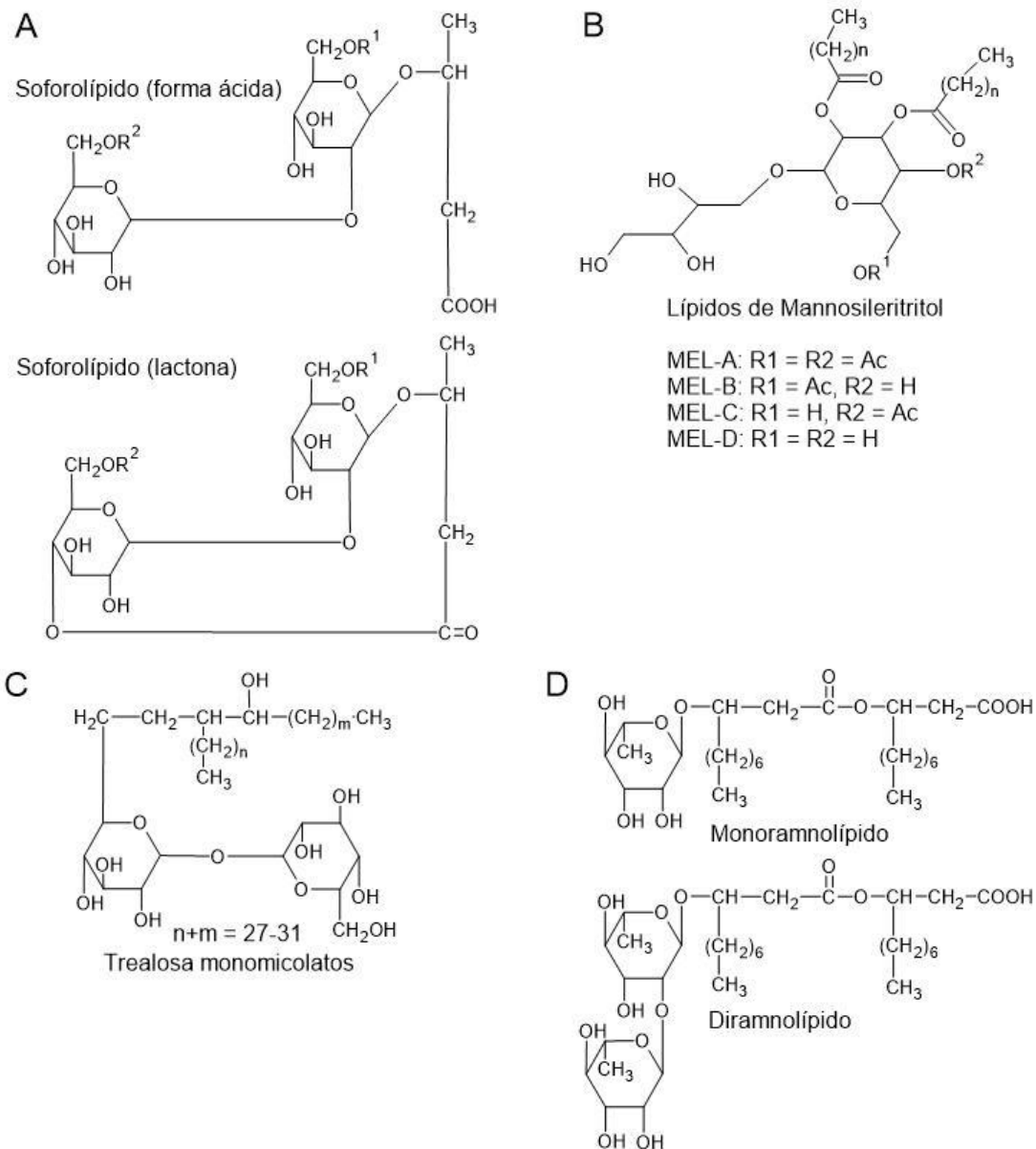
Los ácidos grasos y fosfolípidos pueden actuar como compuestos de actividad superficial. Son ejemplos destacables los ácidos corinomicólicos (C<sub>12</sub>-C<sub>14</sub>) capaces de reducir de forma significativa la tensión superficial o en las interfases (Fujii y *col.* 1999), o el complejo fosfolípido/proteína en humanos (surfactante pulmonar), cuya deficiencia es una de las mayores causas de fallo respiratorio en recién nacidos prematuros (Gautam y Tyagi, 2006).

La unión de ácidos grasos a aminoácidos proteinogénicos o no proteinogénicos da lugar a los llamados biotensioactivos lipoaminoacídicos, por ejemplo, lípidos de ornitina o lisina. Por su parte, los lipopéptidos son compuestos formados por la unión de un lípido a una cadena polipeptídica (Ron y Rosenberg, 1999) y forman la segunda categoría más grande dentro de los LMW. Destacan depsipéptidos cíclicos con actividad antibiótica como la daptomicina de *Streptomyces roseosporus* (Tally y *col.*, 2000), la polimixina B de *Paenibacillus polymixa* (Trimble y *col.*, 2016) o la surfactina producida por distintas especies del género *Bacillus* (Figura 6). La surfactina está formada por un anillo peptídico de 7 aminoácidos y una cola hidrofóbica compuesta por ácidos grasos, las variaciones en la longitud de la cadena hidrofóbica o en los aminoácidos componentes alteran sus propiedades fisicoquímicas (Desai y *col.*, 1997; Kowall y *col.*, 1998). Se trata de un biotensioactivo destacado por presentar una CMC y CMI (concentración mínima inhibitoria) muy baja, siendo capaz de reducir la tensión superficial en interfases aire/agua de 72.5 mN/m hasta 27 mN/m (Jacques y *col.*, 2011).

Los glicolípidos son la clase principal de biotensioactivos LMW, estando formados por la unión de un motivo lipídico a un núcleo hidrofílico con uno (mono-) o varios glúcidos (oligosacáridos) como glucosa, manosa, ácido glucurónico, trehalosa, soforosa, celobiosa, manosileritritol, ramnosa, etc. Los glicolípidos más estudiados son los soforolípidos, lípidos de manosileritritol, trealosalípidos y los ramnolípidos (Figura 5). A continuación, se describe brevemente cada una de estas clases.



**Soforolípidos:** glicolípidos formados por la unión del disacárido soforosa a una cadena larga de 16-18 átomos de carbono mediante un enlace glicosídico, y están producidos por hongos y levaduras, entre las que destaca *Starmerella bombicola* (Roelants y col., 2016). Pueden presentarse como lactonas o en su forma ácida (anillo abierto), aunque su forma lactona es la preferente para muchas aplicaciones (Hu y Ju, 2001).



**Figura 5.** Estructura química simplificada de (a) las formas ácida y lactónica de los soforolípidos, (b) lípidos de manosileritritol, (c) trealosalípido monomicolato y (d) mono- y diramnolípidos.

Los **manosileritritolípidos** (MELs) están formados por un motivo glucídico de 4-O- $\beta$ -D-manosil-piranosil-D-eritritol, cuyo grado de acetilación en los C4' y C6' determina su clasificación en MEL-A, B, C o D (Rau y col., 2005), unido a ácidos grasos de distinta longitud de cadena. Estos compuestos son sintetizados por hongos como *Candida antarctica* o *Pseudozyma* sp.

Los **trealosalípidos** son metabolitos de actinomicetos del género *Mycobacterium*, *Arthrobacter* y *Rhodococcus* y están formados por la acetilación del disacárido trehalosa con un ácido graso de cadena larga.

Los **ramnolípidos** conforman el grupo de glicolípidos más estudiado. Su estructura comprende la unión de una o dos unidades de  $\alpha$ -L-ramnosa (mono- o diramnolípidos) a dos moléculas de ácido 3-hidroxiálcanoico de entre 8 y 16 carbonos. Se los conoce principalmente como metabolitos de la bacteria patógena *Pseudomonas aeruginosa*, aunque también se han detectado en otros organismos como *Burkholderia mallei* o en bacterias termófilas del género *Thermus* entre otros (Rezanka y col., 2011).

### 3.2.2. PROPIEDADES CARACTERÍSTICAS DE LOS BIOTENSIOACTIVOS

Teniendo en cuenta su origen microbiológico, los biotensioactivos presentan diferentes características ventajosas frente a los tensioactivos químicos:

- Biocompatibilidad. Se trata de compuestos biocompatibles lo que posibilita su uso en diferentes aplicaciones relacionadas con su uso como productos tópicos en cosmética, industria alimentaria o farmacéutica, entre otros.
- Su capacidad de biodegradación y baja toxicidad, que hacen que resulten altamente ventajosos frente a los tensioactivos químicos tradicionales, conocidos por su elevada toxicidad y resistencia a la degradación por los microorganismos.
- Biodiversidad. Existe una infinidad de estructuras de carácter biotensioactivo resultado del proceso evolutivo de los microorganismos productores de estos compuestos. Esto implica la existencia de numerosas moléculas con actividad superficial asociadas a actividades muy específicas (generación de biofilms, competencia por nutrientes, patogénesis, etc).

- La mayoría de biotensioactivos presentan una baja CMC y elevada actividad superficial, por lo que su actividad resulta similar, y en ocasiones superior, a la de los tensioactivos químicos.
- Estabilidad: estos compuestos mantienen su efectividad en valores de pH, temperatura, fuerza iónica y presión extremos, e incluso en presencia de disolventes orgánicos.
- Formación de distintos tipos de estructuras de empaquetamiento y autoensamblaje (monocapas, bicapas, micelas, vesículas, cristales líquidos), que los hacen adecuados para una variedad de aplicaciones.

De esta forma, dependiendo de la industria o aplicación en cuestión, será recomendable la selección de diferentes tipos de biotensioactivos en base tanto a sus propiedades estructurales como a su actividad. Ejemplos de ello son el uso del biotensioactivo polimérico Emulsan (Figura 4) por su capacidad bioemulsionante o el potencial uso, asociado a sus propiedades superficiales, del lipopéptido surfactina en industria farmacéutica, cosmética y alimentaria.

Es necesario señalar que aún existen ciertos inconvenientes que impiden la completa implementación de los biotensioactivos en la industria actual, principalmente los altos costes de producción unidos a los bajos rendimientos de especies microbianas. No obstante, los avances en biotecnología en los últimos años, con el desarrollo de sistemas de producción heteróloga en microorganismos no patógenos y el uso de subproductos de diferentes industrias como fuentes de carbono para reducir los costes de producción, están mejorando de modo gradual la implementación aún más exhaustiva de estos compuestos en la industria (Geys *et al.*, 2014).

### *3.2.2.1. Agregación de los biotensioactivos: autoensamblaje*

Como ya se mencionó en el apartado 3.1.2., los tensioactivos destacan no solo por tener la capacidad de disminuir la tensión superficial en una disolución mediante su adsorción en la interfase, sino también por su capacidad de formar diferentes estructuras de autoensamblaje cuando su concentración en el medio aumenta. La agregación de los tensioactivos da lugar a diferentes tipos de agregados y estructuras coloidales ordenadas a través de puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals

(Kitamoto y *col.*, 2009; Raza y *col.*, 2010). Estas estructuras pueden ser de tamaño limitado (micelas, liposomas y gotas de microemulsiones) o grandes con conectividad en una, dos o tres dimensiones, también conocidos como cristales líquidos (Rodrigues, 2015). Los biotensioactivos no son una excepción en este sentido.

Las propiedades de autoensamblaje de los glicolipídicos se encuentran muy influenciadas por la estereoquímica de los grupos glucídicos de sus cabezas polares (Kitamoto y *col.*, 2005). Algunos glicolípidos poseen cabezas polares relativamente grandes en comparación con su región hidrofóbica, formando generalmente micelas en disoluciones acuosas. Además de las micelas esféricas, estos tensioactivos también pueden formar estructuras en forma de disco y de varilla (Söderman y Johansson, 1999). Al aumentar la concentración de tensioactivo, los sistemas glicolípido-agua adquieren la capacidad de formar una amplia gama de fases cristalinas líquidas. En particular, los biotensioactivos glicolipídicos se autoensamblan espontáneamente en estructuras bien definidas, destacando las configuraciones de esponja ( $L_3$ ), cúbica ( $V_2$ ), hexagonal ( $H_{II}$ ) o lamelar ( $L_\alpha$ ).

#### *3.2.2.2. Parámetros que influyen en el autoensamblaje*

De manera similar a su adsorción en las interfases, el autoensamblaje de los tensioactivos es principalmente una consecuencia del efecto hidrofóbico, aunque también se encuentra influenciado por otros muchos factores, incluyendo las interacciones repulsivas entre cabezas polares. La estructura y dinámica del autoensamblaje de los tensioactivos puede diferir ampliamente, dependiendo no solo de la estructura química de estos compuestos sino también de otras variables como es el caso de su composición y de la temperatura. Así, los parámetros externos que influyen en el tipo de estructuras de autoensamblaje que puedan formarse incluyen la temperatura, presencia de sales, co-tensioactivos, y concentración del tensioactivo (Marques y Silva, 2013).

#### *3.2.2.3. Autoensamblaje en el seno de la disolución*

Dependiendo de las estructuras moleculares de los tensioactivos estas se clasifican, conforme a sus fases, en sistemas homogéneos o monofásicos, y heterogéneos o multifásicos (Evans y Wennerstrom, 1999; Tiddy, 1980).

Los sistemas homogéneos pueden dividirse en: (a) disoluciones (fase micelar); (b) fase líquido-cristalina (fase lamelar); y (c) fases cristalinas. En las disoluciones las moléculas se encuentran libres, naturalmente desordenadas tanto a pequeña como gran escala, los agregados micelares se consideran una excepción al aportar un cierto grado de organización molecular en el conjunto. Asimismo, existe una estructura residual líquida debido a las correlaciones espaciales entre agregados. Las fases líquido-cristalinas están desordenadas a pequeña escala, pero presentan cierto tipo de orientación ordenada y cierto grado de orden en su orientación, y un orden traslacional distintivo a gran escala. Las fases cristalinas presentan orden tanto a pequeña como gran escala. Los sistemas heterogéneos, como su nombre indica, incluyen varias fases asociadas a los diferentes componentes, y engloban a las emulsiones, espumas, geles y películas de adsorción.

#### *3.2.2.4. Autoensamblaje en las interfases*

El autoensamblaje de los tensioactivos no ocurre solamente en el seno de la disolución, también tiene lugar en las interfases (Figura 2; Apartado 3.1.2.1), tales como la interfase gas-líquido o superficie, y la interfase sólido líquido. Los ácidos grasos de cadena larga y los tensioactivos, compuestos insolubles en agua, pueden repartirse en un disolvente orgánico o una disolución acuosa para formar películas monomoleculares adsorbidas en la interfase gas-líquido, llamadas monocapas. Dependiendo de las fuerzas laterales en el sistema, las moléculas en las monocapas pueden autoorganizarse de diferentes formas, en particular cuando están muy empaquetadas. Asimismo, es posible producir multicapas mediante el depósito sucesivo de películas monolamelares en un sustrato sólido; este tipo de películas se denominan películas de Langmuir-Blodgett y presentan una gran relevancia en numerosas aplicaciones, entre ellas su uso en biosensores (Rodrigues, 2015).

### 3.2.3. APLICACIONES DE LOS BIOTENSIOACTIVOS

Durante los últimos años ha habido un aumento significativo en el número de estudios relacionados con la aplicación de los biotensioactivos en diferentes industrias.

**Tabla 3. Aplicaciones industriales de los biotensioactivos**

Industria	Aplicaciones
Industria alimentaria	Agricultura: protección contra fitopatógenos, mejora del suelo.
	Equipo de producción: su capacidad antimicrobiana y antiadhesiva facilita la desinfección de los equipos de producción.
	Producción: Uso como emulsionantes y estabilizantes (mejora de la textura y reología de los productos), acción antiadhesiva (prevención de biofilms), antioxidante y antimicrobiana (incremento en la vida media de los productos).
Industria cosmética	Acción emulsionante, solubilizante, humectante, espumante y dispersante (solubilización y distribución de ingredientes hidrofóbicos a través de la barrera dérmica).
Medicina e industria farmacéutica	Uso como agentes, antimicrobianos, antifúngicos, antivirales, inmunomoduladores, potencial uso como agentes antitumorales e antiinflamatorios, tratamiento de quemaduras. Capacidad de encapsulación y transporte de fármacos hidrofóbicos.
Biorremediación	Biodegradación de hidrocarburos (aumento de la biodisponibilidad de sustratos hidrofóbicos para los microorganismos del medio o el aumento de la hidrofobicidad de las paredes bacterianas). Aplicaciones en procesos como la limpieza de derrames de petróleo, eliminación de metales pesados o tratamiento de aguas residuales y suelos contaminados.
Industria petrolera	Mejora en la recuperación de crudo, aumento de la movilidad de los hidrocarburos facilitando su eliminación de entornos contaminados, así como la recuperación terciaria del crudo.
Otros procesos industriales	Prevención de aglomeración de mezclas agua-hielo en sistemas eco-ice, aplicación en procesos de refrigeración, almacenamiento refrigerado y sistemas de aire acondicionado.
	Industria textil, papelera y pintura: acción humectante, dispersante, emulsionante, espesante, fijación de tintes, etc.

Entre las diferentes industrias y usos comerciales de los biotensioactivos se incluyen desde diferentes campos del sector alimentario (agricultura, procesado de alimentos, producción y seguridad alimentaria), industria química (mejora en el proceso de recuperación del petróleo y biorremediación, desarrollo de fármacos, bioprocesado industrial), así como su uso en el desarrollo de productos cosméticos, farmacéuticos, hasta su uso en nanotecnología (Jimoh y Jin, 2019; Vijayakumar y Saravanan, 2015; Ribeiro y *col.*, 2020; Jahan y *col.* 2020; Naughton y *col.*, 2019) (Tabla 3).

### **3.3. RAMNOLÍPIDOS**

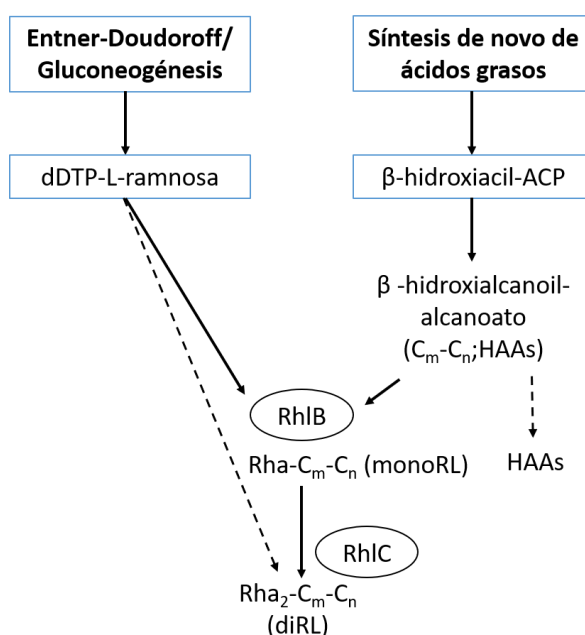
Los ramnolípidos constituyen un grupo destacado dentro de los biotensioactivos en general, y en particular dentro de los glicolípidicos. Su estructura consiste en una región hidrofílica con una o dos unidades de  $\alpha$ -L-ramnosa (mono- y diramnolípidos, respectivamente), unidas mediante un enlace  $\beta$ -glicosídico a una o dos moléculas de un 3-hidroxiácido de entre 8 y 16 átomos de carbono (Apartado 3.2.1, Figura 5D).

Los ramnolípidos se detectaron por primera vez como productos excretados en cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* (Jarvis y Johnson, 1949), una bacteria gramnegativa muy conocida por su papel como patógeno oportunista y la principal especie bacteriana productora de ramnolípidos, con rendimientos superiores a 100 g/L (Wullbrant, 1998). Entre otros microorganismos productores de estos biotensioactivos se incluyen especies del género *Pseudomonas* (Giani y *col.*, 1997) y *Burkholderia* (Hörmany *col.*, 2010), así como bacterias termófilas del género *Thermus* (Rezanka y *col.*, 2011).

#### **3.3.1. BIOSÍNTESIS DE LOS RAMNOLÍPIDOS**

La biosíntesis de los ramnolípidos depende de dos rutas biosintéticas implicadas en la producción de los precursores de las porciones hidrofílica e hidrofóbica, a saber, deoxitimidina-difosfo-L-ramnosa (dTDP-L-Ramnosa) procedente de la gluconeogénesis, y  $\beta$ -hidroxiácidos de la síntesis *de novo* de ácidos grasos, respectivamente. La síntesis de estos biotensioactivos tiene lugar a través de 3 reacciones enzimáticas principales (Geys y *col.*, 2014) (Figura 6):

- Rhl A ( $\beta$ -hidroxidecanoil-  $\beta$ -hidroxidecanoatosintasa) cataliza la dimerización de grupos  $\beta$ -hidroxiacilo asociados a la proteína transportadora de grupos acilo (ACP) en  $\beta$ -hidroxiacil- $\beta$ -alcanoatos (HAAs).
- La ramnosiltransferasa 1 (Rhl B) transfiere los HAAs a la molécula precursora dTDP-L-ramnosa, formando como producto el monoramnolípido.
- La segunda ramnosiltransferasa (Rhl C) cataliza la glicosilación del monoramnolípido con una segunda molécula del precursor dDTP-L-ramnosa, dando lugar al diramnolípido.



**Figura 6.** Representación esquemática de la ruta de biosíntesis de mono- y diramnolípidos.

En *Pseudomonas aeruginosa* el proceso de síntesis de ramnolípidos se encuentra regulado por factores directos e indirectos incluyendo un sistema sensor de *quorum*, el estado nutricional de la bacteria o la influencia de la respuesta a estrés (Reis y col., 2011).

### 3.3.2. PROPIEDADES Y VENTAJAS DEL USO DE LOS RAMNOLÍPIDOS

Los ramnolípidos son la clase de biotensioactivos glicolipídicos más estudiada hasta la fecha, con el descubrimiento y caracterización de numerosos homólogos o congéneres en los últimos años, encontrando más de 100 congéneres ramnolipídicos en 2017 (Chen y col., 2017). Entre las características que resaltan el interés en estos compuestos se incluyen:



- Múltiples funciones fisiológicas, entre las que cabe destacar su capacidad de aumentar la hidrofobicidad celular, su actividad antibacteriana, antizoonocida, antifúngica y antiviral, su papel biológico en la formación de biofilms y movimiento bacteriano, así como diversas acciones biológicas en eucariotas superiores asociadas con su papel como factor de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* como patógenos de plantas, y su acción inmunoestimuladora en animales (Ozten, 2017; Müller y col., 2012; Desai y col., 1997).
- La obtención de rendimientos de producción elevados en comparación con otros biotensioactivos llegando a obtener hasta 152 g/L con una ratio de conversión del 84.7% en fermentadores alimentados de forma secuencial (He y col., 2017).
- La posibilidad de emplear materiales residuales de la industria alimentaria como fuentes de carbono para su producción, como son el uso de residuos de glicerol, múltiples azúcares y aceites orgánicos (Chong y Li, 2017).

#### 3.3.2.1. Propiedades fisicoquímicas de los ramnolípidos

Las propiedades de estos biotensioactivos dependen del tipo y la proporción de homólogos ramnolipídicos constituyentes (una o dos ramnosas) del sistema en estudio, por tanto, varían según la cepa bacteriana, las condiciones de cultivo, la estrategia del proceso y la composición del medio, siendo particularmente relevante la fuente de carbono empleada. Las propiedades fisicoquímicas más relevantes de los ramnolípidos incluyen sus propiedades superficiales, caracterizadas por su CMC, y su capacidad de autoensamblaje.

La CMC de los ramnolípidos depende de la composición química de las diversas especies, observándose mayores valores de CMC en especies ramnolipídicas más hidrófilas (Mata-Sandoval y col., 1999), y de las condiciones del sistema bajo estudio (pH, temperatura, fuerza iónica, fuente de carbono empleada, etc.), oscilando entre 1 y 200 mg/L (Aranda y col., 2007; Guo y col., 2009; Nitschke y col., 2011; Manko y col., 2014).

A concentraciones por encima de la CMC, los ramnolípidos forman micelas, vesículas o estructuras lamelares, dependiendo del pH de la disolución, concentración y de la presencia de electrolitos (Nitschke y col., 2011; Lebron-Paler y col., 2006; Sánchez y col., 2007). Al incrementar la concentración de ramnolípidos en el medio se ha observado que

el tamaño nanoestructural mejora significativamente, acompañado de una transición micela-vesícula (Guo y *col.*, 2009).

Diferentes estudios han demostrado que la fuente de carbono empleada tiene el efecto más significativo en la CMC y que la pureza del tensioactivo también es un factor a tener en consideración, observándose valores del doble de CMC en un extracto de ramnolípido no purificado frente al mismo extracto purificado (Klosowska-Chomiczewska y *col.*, 2017). Asimismo, estudios previos confirmaron que el valor de CMC de los diramnolípidos resulta ser un 36% superior al de los monoramnolípidos (Raza y *col.*, 2010).

El comportamiento de autoensamblaje de los ramnolípidos se encuentra modulado por la fuerza iónica y el pH del medio (Bai y *col.*, 1998; Helvaci y *col.*, 2004; Zhong y *col.*, 2015; Sánchez y *col.*, 2007), así como por la presencia de iones metálicos (Raza y *col.*, 2009; Abassi y *col.*, 2013). Este comportamiento se debe a la presencia de grupos carboxílicos ionizables en la cabeza polar de estos biotensioactivos, siendo posible realizar cambios reversibles en el autoensamblaje alterando el pH del medio (Kitamoto y *col.*, 2009):

- A  $\text{pH} \leq 5$  el grupo carboxílico se encuentra mayoritariamente protonado, y la molécula se comporta como un tensioactivo no iónico en medio acuoso, presentando una menor repulsión entre las cabezas polares ramnolípídicas y, como consecuencia, un mayor empaquetamiento de la estructura.
- A  $\text{pH} > 5$ , el tamaño y forma del ramnolípido cambia debido a la presencia de cargas negativas en sus cabezas polares (tensioactivo aniónico). En esta situación, el incremento en las fuerzas repulsivas entre los grupos polares ramnosilo adyacentes lleva a formar vesículas esféricas de pequeño y gran tamaño (Raza y *col.*, 2010; Abassi y *col.*, 2013; Sánchez y *col.*, 2007).

La dependencia con el pH del grado de protonación del grupo carboxilo también debe considerarse al evaluar los efectos de la fuerza iónica. Se ha determinado (Jahan y *col.*, 2020) el impacto de la adición de NaCl sobre la CMC de un monoramnolípido a  $\text{pH} > 5$ ; debido a que el grupo carboxílico se encuentra disociado se produce un incremento en la repulsión entre las cabezas polares, correspondiente con el incremento significativo de los valores en la CMC a concentraciones bajas de NaCl (Raza y *col.*, 2009).

### 3.3.2.2. Aplicaciones industriales de los ramnolípidos.

En la actualidad, existen más de 14000 patentes publicadas con respecto a la producción y aplicación de ramnolípidos, con más de 3500 concedidas (patents.google.com, 2022). Gracias a sus excelentes propiedades y biológicas estos compuestos representan una alternativa sostenible a los biotensioactivos químicos en múltiples campos industriales, principalmente en los campos de alimentación, agricultura, biorremediación y medicina:

- Alimentación: presentan aplicaciones en diferentes procesos de industria alimentaria, donde la adición de ramnolípidos da lugar a mejoras en la masa, textura, volumen y conservación de productos de panadería (Giri y col., 2017), propiedades de crema batida, croissants y pastas (Mnif y Ghribi, 2016) o puede ser empleado como precursor de saborizantes (Vijayakumar y Saravanan, 2015).
- Agricultura: destacando por su capacidad de control de plagas gracias a sus actividades fungicida (Sha y col., 2012), zoosporicida (Stanghellini y Miller, 1997; Soltani y col., 2016) y antimicrobiana (Chen y col., 2017).
- Biorremediación: los ramnolípidos tienen la capacidad de solubilizar y aumentar la biodisponibilidad de los hidrocarburos en mezclas petroquímicas, así como de estimular el crecimiento de microorganismos autóctonos facilitando el proceso de biorremediación de vertidos de crudo (Whang y col., 2008). Asimismo, diversos estudios han comprobado su eficiencia en la eliminación de metales pesados en suelos contaminados (Mulligan y Wang, 2006; Wen y col., 2009; Lászlóvá y col., 2018; Meenakshisundaram y Pramila, 2017).
- Medicina: existe un potencial uso de estos biotensioactivos en la industria farmacéutica, debido a la actividad antimicrobiana, inmunomoduladora así como su potencial uso como anticancerígenos fundamentado por numerosos estudios *in vitro* (Chen y col., 2017; Naughton y col., 2020; Nitschke y Marangon, 2021).

Información sobre estas y otras aplicaciones de estos compuestos en diferentes industrias, siendo otros ejemplos la industria cosmética, textil o la producción de detergentes entre otros, puede encontrarse desarrollada en múltiples revisiones bibliográficas (Jimoh y col., 2020; Naughton y col., 2020; Chong y col., 2017; Chen y col., 2017; Crouzet y col., 2020),



## 4. Bibliografía

- Abbasi, H., Noghabi, K. A., Hamed, M. M., Zahiri, H. S., Moosavi-Movahedi, A. A., Amanlou, M., Teruel, J.A., & Ortiz, A. (2013). Physicochemical characterization of a monorhamnolipid secreted by *Pseudomonas aeruginosa* MA01 in aqueous media. An experimental and molecular dynamics study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *101*, 256-265.
- Aranda, F. J., Espuny, M. J., Marqués, A., Teruel, J. A., Manresa, Á., & Ortiz, A. (2007). Thermodynamics of the interaction of a dirhamnolipid biosurfactant secreted by *Pseudomonas aeruginosa* with phospholipid membranes. *Langmuir*, *23*(5), 2700-2705.
- Bai, G., Brusseau, M. L., & Miller, R. M. (1998). Influence of cation type, ionic strength, and pH on solubilization and mobilization of residual hydrocarbon by a biosurfactant. *Journal of Contaminant Hydrology*, *30*(3-4), 265-279.
- Bodour, A. A., Drees, K. P., & Maier, R. M. (2003). Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. *Applied and environmental microbiology*, *69*(6), 3280-3287.
- Camacho-Chab, J. C., Guézennec, J., Chan-Bacab, M. J., Ríos-Leal, E., Siquin, C., Muñoz-Salazar, R., De la Rosa-García, S., Reyes-Estebanez, M., & Ortega-Morales, B. O. (2013). Emulsifying activity and stability of a non-toxic bioemulsifier synthesized by *Microbacterium* sp. MC3B-10. *International journal of molecular sciences*, *14*(9), 18959-18972.
- Chen, J., Wu, Q., Hua, Y., Chen, J., Zhang, H., & Wang, H. (2017). Potential applications of biosurfactant rhamnolipids in agriculture and biomedicine. *Applied microbiology and biotechnology*, *101*(23), 8309-8319.
- Chong, H. & Li, Q. (2017). Microbial production of rhamnolipids: opportunities, challenges and strategies. *Microbial cell factories*, *16*(1), 1-12.
- Desai, J. D., & Banat, I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular biology reviews*, *61*(1), 47-64.
- Evans, D. F., & Wennerström, H. (1999). The colloidal domain: where physics, chemistry, biology, and technology meet.
- Fujii, T., Yuasa, R., & Kawase, T. (1999). Biodetergent IV. Monolayers of corynomycolic acids at the air-water interface. *Colloid and Polymer Science*, *277*(4), 334-339.
- Gautam, K. K., & Tyagi, V. K. (2006). Microbial surfactants: a review. *Journal of Oleo Science*, *55*(4), 155-166.
- Geys, R., Soetaert, W., & Van Bogaert, I. (2014). Biotechnological opportunities in biosurfactant production. *Current opinion in biotechnology*, *30*, 66-72.
- Giani, C., Wullbrandt, D., Rothert, R., & Meiwes, J. (1997). *U.S. Patent No. 5,658,793*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

- Giri, S. S., Sen, S. S., Jun, J. W., Sukumaran, V., & Park, S. C. (2017). Role of *Bacillus licheniformis* VS16-derived biosurfactant in mediating immune responses in Carp Rohu and its application to the food industry. *Frontiers in Microbiology*, 8, 514.
- He, N., Wu, T., Jiang, J., Long, X., Shao, B., & Meng, Q. (2017). Toward high-efficiency production of biosurfactant rhamnolipids using sequential fed-batch fermentation based on a fill-and-draw strategy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 157, 317-324.
- Guo, Y. P., Hu, Y. Y., Gu, R. R., & Lin, H. (2009). Characterization and micellization of rhamnolipidic fractions and crude extracts produced by *Pseudomonas aeruginosa* mutant MIG-N146. *Journal of colloid and interface science*, 331(2), 356-363.
- Helvacı, Ş. Ş., Peker, S., & Özdemir, G. (2004). Effect of electrolytes on the surface behavior of rhamnolipids R1 and R2. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 35(3-4), 225-233.
- Hörmann, B., Müller, M. M., Syldatk, C., & Hausmann, R. (2010). Rhamnolipid production by *Burkholderia plantarii* DSM 9509T. *European journal of lipid science and technology*, 112(6), 674-680.
- Hu, Y., & Ju, L. K. (2001). Sophorolipid production from different lipid precursors observed with LC-MS. *Enzyme and Microbial Technology*, 29(10), 593-601.
- Jacques, P. (2011). Surfactin and other lipopeptides from *Bacillus spp.* In *Biosurfactants* (pp. 57-91). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Jahan, R., Bodratti, A. M., Tsianou, M., & Alexandridis, P. (2020). Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: physicochemical properties and applications. *Advances in colloid and interface science*, 275, 102061.
- Jimoh, A. A., & Lin, J. (2019). Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental sustainability. *Ecotoxicology and Environmental safety*, 184, 109607.
- Kitamoto, D., Toma, K., & Hato, M. (2005). "Glycolipid based Bionanomaterials Handbook of Nanostructured Biomaterials and Their Applications in Nanotechnology." Vol. 1.
- Kitamoto, D., Morita, T., Fukuoka, T., Konishi, M. A., & Imura, T. (2009). Self-assembling properties of glycolipid biosurfactants and their potential applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 14(5), 315-328.
- Kłosowska-Chomiczewska, I. E., Mędrzycka, K., Hallmann, E., Karpenko, E., Pokynbroda, T., Macierzanka, A., & Jungnickel, C. (2017). Rhamnolipid CMC prediction. *Journal of colloid and interface science*, 488, 10-19.
- Kowall, M., Vater, J., Kluge, B., Stein, T., Franke, P., & Ziessow, D. (1998). Separation and characterization of Surfactin isoforms produced by *Bacillus subtilis* OKB 105. *Journal of colloid and interface science*, 204(1), 1-8.
- Lászlóvá, K., Dudášová, H., Olejníková, P., Horváthová, G., Velická, Z., Horváthová, H., & Dercová, K. (2018). The application of biosurfactants in bioremediation of the aged

sediment contaminated with polychlorinated biphenyls. *Water, Air, & Soil Pollution*, 229(7), 1-18.

Lebrón-Paler, A., Pemberton, J. E., Becker, B. A., Otto, W. H., Larive, C. K., & Maier, R. M. (2006). Determination of the acid dissociation constant of the biosurfactant monorhamnolipid in aqueous solution by potentiometric and spectroscopic methods. *Analytical chemistry*, 78(22), 7649-7658.

Mańko, D., Zdziennicka, A., & Jańczuk, B. (2014). Thermodynamic properties of rhamnolipid micellization and adsorption. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 119, 22-29.

Marques E.F., Silva B.B. *Encyclopedia of Colloid and Interface Science*, Springer, 2013.

Mata-Sandoval, J. C., Karns, J., & Torrents, A. (1999). High-performance liquid chromatography method for the characterization of rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil. *Journal of Chromatography A*, 864(2), 211-220.

Meenakshisundaram, M., & Pramila, M. (2017). Detoxification of heavy metals using microbial biosurfactant. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(3), 402-411.

Mnif, I., & Ghribi, D. (2016). Glycolipid biosurfactants: main properties and potential applications in agriculture and food industry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(13), 4310-4320.

Müller, M. M., Kügler, J. H., Henkel, M., Gerlitzki, M., Hörmann, B., Pöhnlein, M., Syldatk, C., & Hausmann, R. (2012). Rhamnolipids—next generation surfactants? *Journal of biotechnology*, 162(4), 366-380.

Mulligan, C. N., & Wang, S. (2006). Remediation of a heavy metal-contaminated soil by a rhamnolipid foam. *Engineering Geology*, 85(1-2), 75-81.

Naughton, P. J., Marchant, R., Naughton, V., & Banat, I. M. (2019). Microbial biosurfactants: current trends and applications in agricultural and biomedical industries. *Journal of applied microbiology*, 127(1), 12-28.

Nitschke, M., Costa, S. G., & Contiero, J. (2011). Rhamnolipids and PHAs: Recent reports on *Pseudomonas*-derived molecules of increasing industrial interest. *Process Biochemistry*, 46(3), 621-630.

Ortiz, A., Teruel, J. A., Espuny, M. J., Marqués, A., Manresa, Á., & Aranda, F. J. (2006). Effects of dirhamnolipid on the structural properties of phosphatidylcholine membranes. *International journal of pharmaceutics*, 325(1-2), 99-107.

Rau, U., Nguyen, L. A., Roeper, H., Koch, H., & Lang, S. (2005). Fed-batch bioreactor production of mannosylerythritol lipids secreted by *Pseudozyma aphidis*. *Applied microbiology and biotechnology*, 68(5), 607-613.

Raza, Z. A., Khalid, Z. M., & Banat, I. M. (2009). Characterization of rhamnolipids produced by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant strain grown on waste oils. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 44(13), 1367-1373.

- Raza, Z. A., Khalid, Z. M., Khan, M. S., Banat, I. M., Rehman, A., Naeem, A., & Saddique, M. T. (2010). Surface properties and sub-surface aggregate assimilation of rhamnolipid surfactants in different aqueous systems. *Biotechnology letters*, *32*(6), 811-816.
- Reis, R. S., Pereira, A. G., Neves, B. C., & Freire, D. M. (2011). Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa*—a review. *Bioresource technology*, *102*(11), 6377-6384.
- Řezanka, T., Siristova, L., & Sigler, K. (2011). Rhamnolipid-producing thermophilic bacteria of species *Thermus* and *Meiothermus*. *Extremophiles*, *15*(6), 697-709.
- Rodrigues, L. R. (2015). Microbial surfactants: fundamentals and applicability in the formulation of nano-sized drug delivery vectors. *Journal of colloid and interface science*, *449*, 304-316.
- Ribeiro, B. G., Guerra, J. M., & Sarubbo, L. A. (2020). Biosurfactants: Production and application prospects in the food industry. *Biotechnology progress*, *36*(5), e3030.
- Roelants, S. L., Ciesielska, K., De Maeseneire, S. L., Moens, H., Everaert, B., Verweire, S., Denon, Q., Vanlerberghe, B., Van Bogaert, I.N.A., Van der Meeren, P., Devreese, B., & Soetaert, W. (2016). Towards the industrialization of new biosurfactants: biotechnological opportunities for the lactone esterase gene from *Starmarella bombicola*. *Biotechnology and bioengineering*, *113*(3), 550-559.
- Ron, E. Z., & Rosenberg, E. (2001). Natural roles of biosurfactants: Minireview. *Environmental microbiology*, *3*(4), 229-236.
- Rosenberg, E., & Ron, E. Z. (1997). Bioemulsans: microbial polymeric emulsifiers. *Current opinion in biotechnology*, *8*(3), 313-316.
- Sánchez, M., Teruel, J. A., Espuny, M. J., Marqués, A., Aranda, F. J., Manresa, Á., & Ortiz, A. (2006). Modulation of the physical properties of dielaidoylphosphatidylethanolamine membranes by a dirhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemistry and physics of lipids*, *142*(1-2), 118-127.
- Sánchez, M., Aranda, F. J., Espuny, M. J., Marqués, A., Teruel, J. A., Manresa, Á., & Ortiz, A. (2007). Aggregation behaviour of a dirhamnolipid biosurfactant secreted by *Pseudomonas aeruginosa* in aqueous media. *Journal of colloid and interface science*, *307*(1), 246-253.
- Sánchez, M., Aranda, F. J., Espuny, M. J., Marqués, A., Teruel, J. A., Manresa, Á., & Ortiz, A. (2008). Thermodynamic and structural changes associated with the interaction of a dirhamnolipid biosurfactant with bovine serum albumin. *Langmuir*, *24*(13), 6487-6495.
- Sánchez, M., Aranda, F. J., Teruel, J. A., & Ortiz, A. (2009). Interaction of a bacterial dirhamnolipid with phosphatidylcholine membranes: a biophysical study. *Chemistry and physics of lipids*, *161*(1), 51-55.



- Sha, R., Jiang, L., Meng, Q., Zhang, G., & Song, Z. (2012). Producing cell-free culture broth of rhamnolipids as a cost-effective fungicide against plant pathogens. *Journal of basic microbiology*, 52(4), 458-466.
- Söderman, O., & Johansson, I. (1999). Polyhydroxyl-based surfactants and their physico-chemical properties and applications. *Current opinion in colloid & interface science*, 4(6), 391-401.
- Soltani Dashtbozorg, S., Miao, S., & Ju, L. K. (2016). Rhamnolipids as environmentally friendly biopesticide against plant pathogen *Phytophthora sojae*. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 35(1), 169-173.
- Stanghellini, M. E., & Miller, R. M. (1997). Biosurfactants: their identity and potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. *Plant disease*, 81(1), 4-12.
- Tally, F. P., & DeBruin, M. F. (2000). Development of daptomycin for gram-positive infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46(4), 523-526.
- Trimble, M. J., Mlynářčik, P., Kolář, M., & Hancock, R. E. (2016). Polymyxin: alternative mechanisms of action and resistance. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(10), a025288.
- Tiddy, G. J. (1980). Surfactant-water liquid crystal phases. *Physics reports*, 57(1), 1-46.
- Vijayakumar, S., & Saravanan, V. (2015). Biosurfactants-types, sources and applications. *Research Journal of Microbiology*, 10(5), 181.
- Wen, J., Stacey, S. P., McLaughlin, M. J., & Kirby, J. K. (2009). Biodegradation of rhamnolipid, EDTA and citric acid in cadmium and zinc contaminated soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(10), 2214-2221.
- Whang, L. M., Liu, P. W. G., Ma, C. C., & Cheng, S. S. (2008). Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *Journal of hazardous materials*, 151(1), 155-163.
- Wullbrandt, D. (1998). Biotechnische Herstellung von L-Rhamnose. *Biokonversion nachwachsender Rohstoffe, Tagungsband. (Schriftenreihe Nachwachsende Rohstoffe, Band 10)*, LV-Druck, Landwirtschaftsverlag, Münster, 164-172.
- Zhong, H., Yang, L., Yang, X., Zeng, G., Liu, Z., Liu, Y., & Yuan, X. (2015). Aggregation of low-concentration dirhamnolipid biosurfactant in electrolyte solution. *RSC advances*, 5(108), 88578-88582.



## **5. Justificación y objetivos**

La presente Tesis doctoral se centra en el estudio del comportamiento de agregación de un diramnlípido microbiano en medio acuoso, y de su interacción con membranas fosfolipídicas modelo y la enzima  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa.

El descubrimiento y descripción de interacciones moleculares implicadas en las actividades biológicas de los biotensioactivos resulta de gran interés para el desarrollo de posibles aplicaciones industriales de estos compuestos. Los ramnlípidos presentan diversas actividades biológicas mediadas por su interacción con los componentes de las membranas celulares, por lo que la caracterización de las contribuciones individuales de las interacciones con los componentes lipídicos y proteicos de la membrana resulta de gran interés. Asimismo, el estudio de la influencia de posibles cambios en las condiciones fisicoquímicas del medio (pH, temperatura) sobre las propiedades bioquímicas y fisicoquímicas de estos compuestos aporta a su vez información necesaria para comprender aún más los detalles moleculares de estos mecanismos.

Teniendo en cuenta los precedentes descritos se planteó la realización de un trabajo de investigación de acuerdo con los siguientes objetivos:

1. Estudiar el comportamiento de agregación en medio acuoso de un diramnlípido microbiano, así como las posibles transiciones de fase y/o reorganizaciones estructurales que pudieran tener lugar en respuesta a cambios de pH y/o temperatura.

Los resultados obtenidos tras el desarrollo de este objetivo han sido publicados en el artículo: *J. Ortiz, A. Oliva, J.A. Teruel, F.J. Aranda, A. Ortiz, Effect of pH and temperature on the aggregation behaviour of dirhamnlipid biosurfactant. An experimental and molecular dynamics study (2021), Journal of Colloid and Interface Science 597: 160-170. (Factor de impacto 7.489)*

2. Caracterizar la interacción de un diramnolípido microbiano con membranas modelo formadas por una especie sintética de fosfatidilserina, 1,2-dimiristil-*sn*-glycero-3-fosfoserina, a través de la evaluación de posibles cambios en la transición de fase de gel a líquido-cristalino, interacción con grupos funcionales específicos, y la fluidez de la membrana.

Las evidencias obtenidas tras el desarrollo de este objetivo han sido publicadas en el artículo: A. Oliva, J.A. Teruel, F.J. Aranda, A. Ortiz, *Effect of a dirhamnolipid biosurfactant on the structure and phase behaviour of dimyristoylphosphatidylserine model membranes* (2019), *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 185., 110576. (Factor de impacto 4.389)

3. Estudiar el efecto de la interacción de un diramnolípido microbiano sobre la estructura y actividad enzimática de la enzima  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de retículo sarco/endoplásmico (SERCA1a).

Los resultados obtenidos tras el desarrollo de este objetivo han sido publicados en el artículo: A. Oliva, S. García-Carrillo, A. Ortiz, F.J. Aranda, J.A. Teruel, *Interaction of a dirhamnolipid biosurfactant with sarcoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA1a)* (2021), *Archives of Biochemistry and Biophysics* 699, 108764. (Factor de impacto 4.097)

# **6. Publicaciones originales que conforman la tesis doctoral**

# Publicación 1

*Effect of pH and temperature  
on the aggregation behaviour of  
a dirhamnolipid biosurfactant.  
An experimental and molecular  
dynamics study*

Julia Ortiz, Alfonso Oliva, José A. Teruel,  
Francisco J. Aranda, Antonio Ortiz.

Abril 2021

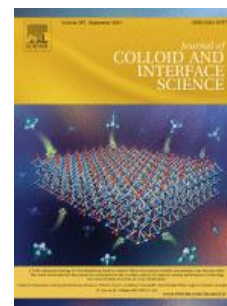
Journal of Colloid and Interface Science,  
DOI:10.1016/j.jcis.2021.03.177

**Revista:** *Journal of Colloid and Interface Science*

**Factor de impacto (JCR; 2020):** 7.489

**Ámbito:** Colloid and Surface Chemistry

**Rango:** 3/17 (Q1)



**Título:** Effect of pH and temperature on the aggregation behaviour of dirhamnolipid biosurfactant. An experimental and molecular dynamics study

**Autores:** Ortiz, J., Oliva, A., Teruel, J.A. Aranda, F.J., Ortiz, A.

**Resumen:**

Hypothesis: *Pseudomonas aeruginosa* dirhamnolipid (diRL) has been shown to form aggregates of different size and structure, under various conditions. Due to the presence of a carboxyl group in the molecule, it is expected that pH would strongly affect this aggregation behaviour. In addition, preliminary observations of temperature-induced changes in the states of aggregation of diRL supported the need of further investigation. Experiments: A systematic experimental study, using differential scanning calorimetry (DSC), small-angle Xray diffraction (SAXD), and Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), has been carried out to characterize pH and temperature driven changes in the aggregation behavior of diRL biosurfactant. Molecular dynamics (MD) simulations, supported by the experimental results, allowed depicting molecular details on formation of diRL membranes and other aggregated structures under various physicochemical conditions. Findings: DiRL could adopt fairly organized multilayered structures (membranes) at low pH and temperature, which became highly disordered upon increasing either of these parameters. The effect of pH on the gauche/all-trans conformer ratio of the diRL acyl chains was not of significance, whereas temperature-induced effects were observed. For the first time it is described that diRL underwent an endothermic thermotropic transition with  $T_c = 34\text{ C}$  as observed by DSC, at pH 4.5 (protonated diRL), but not at pH 7.4 (unprotonated diRL). FTIR confirmed these findings, showing a significant additional disordering of the all-trans acyl chains upon increasing temperature around that same value in the protonated form, an effect not observed for the dissociated form of the biosurfactant. In addition, at pH 7.4, changing temperature did not modify the hydration state of the polar moiety of diRL, whereas at pH 4.5 a significant decrease in the hydration state around  $34\text{ C}$  took place. SAXD data showed that protonated diRL formed multilayered structures at  $20\text{ C}$ , which converted into poorly correlated layers at  $50\text{ C}$ . MD simulations supported these findings, showing that the membrane-like structures formed by protonated diRL at  $20\text{ C}$  became unstable at higher temperatures, tending to form other structures, which could be micelles or other type of layered structures, whereas the negatively charged form of diRL organized in micelle-type aggregates in the whole range of temperature under study.

**DOI/URL:** <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.03.177>

## Publicación 2

*Effect of a dirhamnolipid  
biosurfactant on the structure  
and phase behaviour of  
dimyristoilphosphatidylserine  
model membranes*

Alfonso Oliva, José A. Teruel, Francisco J. Aranda, Antonio Ortiz.

Octubre 2019

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,  
DOI:10.1016/j.colsurfb.2019.110576



**Revista:** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*

**Factor de impacto (JCR; 2019):** 4.389

**Ámbito:** Surfaces and Interfaces

**Rango:** 7/54 (Q1)



**Título:** Effect of a dirhamnolipid biosurfactant on the structure and phase behaviour of dimyristoylphosphatidylserine model membranes.

**Autores:** Oliva, A., Teruel, J.A. Aranda, F.J., Ortiz, A.

**Resumen:**

Rhamnolipids are bacterial biosurfactants containing one or two rhamnose rings and a hydrophobic hydrocarbon portion. These compounds are mainly isolated from *Pseudomonas spp* culture media, and have been shown to present outstanding biological activities. A number of experimental works have shown that the interaction of rhamnolipids with target membranes could play a role in these actions. Therefore the study of the interaction of purified rhamnolipids with the various phospholipid components of biological membranes is of great interest. This paper shows the phase behaviour of mixtures of 1,2-dimyristoylphosphatidylserine (DMPS) with a dirhamnolipid (diRL) fraction produced by *P. aeruginosa*. This experimental approach has been based on the use of physical techniques such as Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). DSC indicated that the presence of increasing concentrations of diRL in the bilayer resulted in a progressive broadening of the gel to liquid-crystalline phase transition of DMPS. In addition a complex thermal behaviour was observed, with the presence of more than one transition at higher concentrations of the biosurfactant, indicating phase separation. FTIR showed that diRL increased the proportion of gauche rotamers of DMPS, thus affecting acyl chain order. The change in the frequency of the carboxylate stretching band of DMPS observed upon interaction with diRL pointed toward changes in the local environment of the polar headgroup of the phospholipid, resulting in a modification of its conformation or insertion within the bilayer. This result was corroborated by the effect of diRL on the carbonyl and phosphate stretching bands of DMPS, showing an increase of the hydration both in the gel and in the liquid-crystalline phase. Molecular Dynamics (MD) simulations gave further support to the experimental results, showing diRL cluster formation as well as an augmented exposition of DMPS to the water layer in the presence of the biosurfactant.

**DOI/URL:** <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110576>

## Publicación 3

*Interaction of a dirhamnolipid  
biosurfactant with sarcoplasmic  
reticulum calcium ATPase  
(SERCA1a)*

Alfonso Oliva, José A. Teruel, Francisco J.  
Aranda, Antonio Ortiz.

Enero 2021

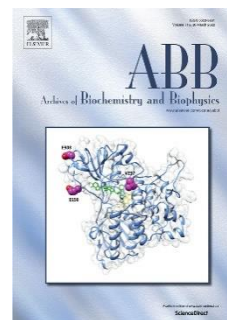
Archives of Biochemistry and Biophysics,  
DOI:10.1016/j.abb.2021.108764

**Revista:** *Archives of Biochemistry and Biophysics*

**Factor de impacto (JCR; 2020):** 4.097

**Ámbito:** Biophysics

**Rango:** 24/131 (Q1)



**Título:** Interaction of a dirhamnolipid biosurfactant with sarcoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA1a)

**Autores:** Oliva, A., García-Carrillo, S., Ortiz A., Aranda, F.J., Teruel, J.A.

**Resumen:**

The interaction of a dirhamnolipid biosurfactant secreted by *Pseudomonas aeruginosa* with calcium ATPase from sarcoplasmic reticulum (SR) was studied by means of different approaches, such as enzyme activity, fluorescence spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), differential scanning calorimetry (DSC), and molecular docking simulations. The ATP hydrolysis activity was fully inhibited by incubation with dirhamnolipid (diRL) up to 0.1 mM concentration, corresponding to a surfactant concentration below membrane solubilization threshold. Surfactant-protein interaction induced conformational changes in the protein observed by an increase in the accessibility of tryptophan residues to the aqueous phase and by changes in the secondary structure of the protein as seen by fluorescence and FTIR spectroscopy. As a consequence, the protein become more unstable and denatured at lower temperatures, as seen by enzyme activity and DSC studies. Finally, these results were explained at molecular level throughout molecular docking simulations. It is concluded that there is a specific dirhamnolipid-protein interaction not related to the surface activity of the surfactant but to the particular physicochemical properties of the biosurfactant molecule.

**DOI/URL:** <https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.108764>

## 7. CONCLUSIONES

### 7.1. Conclusiones específicas

Los resultados obtenidos tras el desarrollo de la presente Tesis han permitido extraer las siguientes conclusiones generales y específicas, presentadas en función de los objetivos propuestos.

Siendo el objetivo 1 el estudio del comportamiento de agregación en medio acuoso y posibles cambios en la transición de fase de gel a líquido-cristalino de una muestra de diramnlípido purificado bajo condiciones particulares de pH y temperatura, se obtuvieron las siguientes conclusiones específicas:

1. La ionización del grupo carboxilo del diRL provoca una elevada desorganización estructural en las membranas multilamelares formadas por el diRL protonado, probablemente dando lugar a estructuras de tipo micelar.
2. Los estudios de dinámica molecular mostraron que la forma protonada e ionizada de los grupos carboxilo del biotensioactivo no se encuentran en el interior de la membrana del diRL, pudiendo explicar esta deslocalización el diferente comportamiento agregacional observado.

Por otro lado, el objetivo 2 se basó en la caracterización de la interacción de diversas concentraciones de diramnlípido sobre membranas modelo formadas por una especie sintética de fosfatidilserina, 1,2-dimiristil-sn-glicero-3-fosfoserina (DMPS).

1. La incorporación de un diRL secretado por *P. aeruginosa* perturba la estructura y la transición de fase en membranas modelo de DMPS.
2. El diRL causa alteraciones en la región de las cadenas acilo del fosfolípido, modificando la ratio de conformeros *gauche/trans*, y actúa provocando un aumento significativo en el grado de hidratación en su región polar reflejado en el análisis mediante espectroscopía infrarroja de los grupos funcionales de dicha región (carbonilo, carboxilato y fosfato).

3. La inserción de diRL en las membranas de DMPS da lugar a una separación lateral de fase, es decir, la formación de dominios enriquecidos en el biotensioactivo, este proceso podría resultar biológicamente relevante.
4. Los estudios de dinámica molecular confirmaron y mostraron la formación de este cluster de diRL, así como el incremento de enlaces de hidrógeno de DMPS, debido a que la región polar de este lípido se encuentra más expuesta a la fase acuosa en presencia del biotensioactivo. Asimismo, estos ensayos sugieren que los clusters de diRL cruzan toda la membrana localizándose en ambas monocapas.

Para finalizar nuestro tercer objetivo se centró en el estudio del efecto de la interacción del diramnolípido sobre la estructura y actividad enzimática de la proteína transmembrana modelo Calcio ATPasa de retículo sarco/endoplásmico (SERCA1a).

1. A través de simulaciones de acoplamiento molecular pudimos caracterizar 3 posibles sitios de unión del diRL a SERCA compatibles con nuestros resultados experimentales. La unión de diRL a SERCA en cualquiera estos sitios inducen un cambio conformacional que afecta al entorno de los residuos de Trp como el Trp50 en la hélice M1, la amortiguación de la fluorescencia intrínseca de SERCA. Teniendo en cuenta que la hélice M1 se encuentra unida a un dominio rico en láminas- $\beta$ , el dominio A, los cambios conformacionales provocados por la interacción del diRL podrían alcanzar a dicho dominio induciendo la inhibición del mecanismo de transporte de calcio y la actividad ATPasa de la enzima.
2. La interacción diRL-SERCA podría debilitar las interacciones moleculares de SERCA dando lugar a una estructura enzimática más inestable.

## 7.2. Conclusiones generales

Teniendo todo lo anterior en mente, podemos resaltar las siguientes conclusiones generales:

1. Dada la importancia de la fosfatidilserina como principal componente fosfolipídico de carga negativa en la membrana celular, la información de este estudio en conjunto con los resultados previamente publicados sobre

fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina nos otorga una visión general de las interacciones moleculares del diRL con los principales componentes de las membranas biológicas.

2. Las formas protonada e ionizada del diRL podrían presentar un papel biológico como barreras de protones, mecanismo similar al que presentan ciertas bacterias reemplazando, hasta cierto punto, los glicerofosfolípidos de sus membranas por glicolípidos sin fósforo facilitando su supervivencia frente a condiciones extremas. Esta hipótesis se vería apoyada por la existencia de muchos enlaces de hidrógeno entre glicolípidos, por tanto, la presencia de estos compuestos en las membranas les otorgaría una mayor resistencia al pH y temperatura frente a las formadas por fosfolípidos.
  
3. La inhibición de SERCA mediada por el del diRL no se encuentra relacionada con la actividad superficial del biotensioactivo, sino que se vería específicamente causada por las propiedades moleculares particulares de estos compuestos. Serán necesarios estudios adicionales para determinar el efecto del diRL sobre el mecanismo cinético de la actividad enzimática de SERCA.