

Obtenció i caracterització de mutants PHA-negatius en soques de *Pseudomonas* per la producció de compostos d'interès

Noelia Torrego Solana

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.

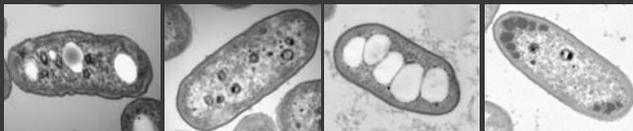
ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en 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.

Les soques *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 i 47T2, aïllades a partir de mostres d'aigües i sorres contaminades amb residus oliosos respectivament, van ser seleccionades per la seva capacitat de produir diversos productes lipídics, entre ells els polihidroxicanoats (PHAs), productes d'elevat interès biotecnològic per les seves propietats com a plàstics biodegradables. A més a més, *P. aeruginosa* 47T2, com és característic de *Pseudomonas aeruginosa*, té la capacitat de produir ramnolípid (Rhls), productes amb propietats tensioactives i antimicrobianes i/o antifúngiques, també d'interès biotecnològic. *P. aeruginosa* 42A2 no produeix Rhls, però és capaç de transformar els olis residuals en àcids grassos hidroxilats (mono-, di- i trihidroxilats) i polimeritzar-los a estòlids, compostos amb possibles aplicacions com a emulsionants, gràcies a la seva activitat lipolítica.

Donat que es detecten diferències a nivell del metabolisme lipídic entre aquests aïllats naturals, s'ha estudiat el seu sistema lipolític per comparació amb el de la soca tipus *Pseudomonas aeruginosa* PA01. Prenent com a referència els productes del metabolisme comuns i diferents entre els aïllats, i tenint en compte que comparteixen intermediaris a les seves rutes biosintètiques, s'han generat mutants negatius per la producció de PHAs per tal d'estudiar el flux de carboni en cada un d'ells.

Una vegada obtinguts els mutants s'ha estudiat l'efecte d'aquesta mutació sobre la producció d'altres metabòlits. En la soca *P. aeruginosa* 47T2, es fa un estudi quantitatiu i qualitatiu dels Rhls produïts a partir d'olis residuals. La caracterització dels biotensioactius és interessant per les possibilitats a nivell d'aplicacions biotecnològiques dels Rhls. I pel que fa a la soca *P. aeruginosa* 42A2, els mutants obtinguts s'utilitzaran en el futur per fer el mateix tipus d'estudi, en aquest cas referit als estòlids.



Micrografies (MET) de talls primis de cèl·lules de *P. aeruginosa*. D'esquerra a dreta: detall de cèl·lules individuals de *P. aeruginosa* 47T2, *P. aeruginosa* 47T2 ΔAD, *P. aeruginosa* 42A2 i *P. aeruginosa* 42A2 ΔAD.

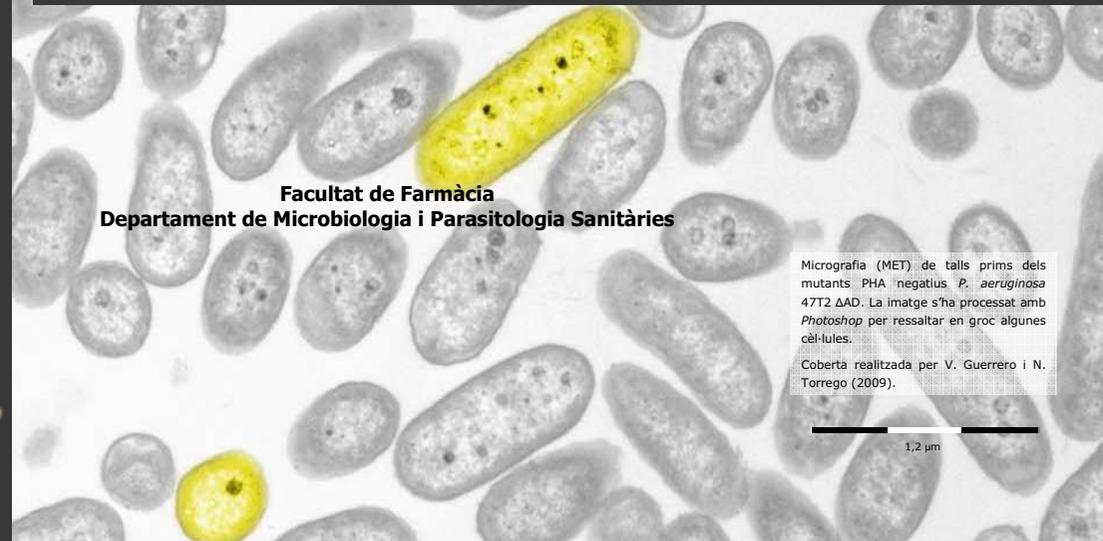
Obtenció i caracterització de mutants PHA-negatius en soques de *Pseudomonas* per la producció de compostos d'interès industrial

Noelia Torrego Solana



Noelia Torrego Solana

Obtenció i caracterització de mutants PHA-negatius en soques de *Pseudomonas* per la producció de compostos d'interès industrial



Facultat de Farmàcia
Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries

Micrografia (MET) de talls primis dels mutants PHA negatius *P. aeruginosa* 47T2 ΔAD. La imatge s'ha processat amb Photoshop per ressaltar en groc algunes cèl·lules.

Coberta realitzada per V. Guerrero i N. Torrego (2009).

1,2 μm



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Facultat de Farmàcia

Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries

**Obtenció i caracterització de mutants
PHA-negatius en soques de *Pseudomonas* per
la producció de compostos d'interès industrial**

Noelia Torrego Solana 2009



UNIVERSITAT DE BARCELONA



**Facultat de Farmàcia
Departament de Microbiologia i Parasitologia Sannitàries**

**Facultat de Biologia
Departament de Microbiologia**

**Programa: Microbiologia Ambiental i Biotecnologia
(Facultat de Biologia)
Bienni: 2004-2006**

**Obtenció i caracterització de mutants
PHA-negatius en soques de *Pseudomonas*
per la producció de compostos d'interès**

Memòria presentada per **Noelia Torrego Solana** per optar al títol de doctor per la Universitat de Barcelona.

Dirigida per:

Dra. Àngels Manresa i Presas

Professora titular

Dpt. de Micobiologia i Parasitologia Sanitàries

Facultat de Farmàcia (UB)

Dra. Pilar Diaz Lucea

Professora titular

Dpt. de Microbiologia

Facultat de Biologia (UB)

Noelia Torrego Solana 2009

Aquesta tesi ha estat finançada per la Universitat de Barcelona a través d'una beca BRD a la doctoranda i pel Ministerio de Educación y Ciencia a través del projecte "Biocatalizadores para la producción de emulsionantes poliméricos: optimización del sistema y desarrollo de nuevos productos, CTQ 2007-60749/PPQ".

Queda prohibido

¿Qué es lo verdaderamente importante?
busco en mi interior la respuesta,
y me es tan difícil de encontrar.

Falsas ideas invaden mi mente,
acostumbrada a enmascarar lo que no entiende,
aturdida en un mundo de irreales ilusiones,
donde la vanidad, el miedo, la riqueza,
la violencia, el odio, la indiferencia,
se convierten en adorados héroes,
y no me extraña que exista tanta confusión,
tanta lejanía de todo, tanta desilusión!
Me preguntas cómo se puede ser feliz,
cómo entre tanta mentira puede uno convivir,
cada cual es quien se tiene que responder,
aunque para mí, aquí, ahora y para siempre:

Queda prohibido llorar sin aprender,
levantarme un día sin saber qué hacer,
tener miedo a mis recuerdos,
sentirme sólo alguna vez.

Queda prohibido no sonreír a los problemas,
no luchar por lo que quiero,
abandonarlo todo por tener miedo,
no convertir en realidad mis sueños.

Queda prohibido no demostrarte mi amor,
hacer que pagues mis dudas y mi mal humor,
inventarme cosas que nunca ocurrieron,
recordarte sólo cuando no te tengo.

Queda prohibido dejar a mis amigos,
no intentar comprender lo que vivimos,
llamarles sólo cuando los necesito,
no ver que también nosotros somos distintos.

Queda prohibido no ser yo ante la gente,
fingir ante las personas que no me importan,
hacerme el gracioso con tal de que me recuerden,
olvidar a todos aquellos que me quieren.

Queda prohibido no hacer las cosas por mí mismo,
no creer en mi dios y hallar mi destino,
tener miedo a la vida y a sus castigos,
no vivir cada día como si fuera un último suspiro.

Queda prohibido echarte de menos sin alegrarme,
odiar los momentos que me hicieron quererte,
todo porque nuestros caminos han dejado de abrazarse,
olvidar nuestro pasado y pagarlo con nuestro presente.

Queda prohibido no intentar comprender a las personas,
pensar que sus vidas valen más que la mía,
no saber que cada uno tiene su camino y su dicha,
sentir que con su falta el mundo se termina.

Queda prohibido no crear mi historia,
dejar de dar las gracias a mi familia por mi vida,
no tener un momento para la gente que me necesita,
no comprender que lo que la vida nos da, también nos lo quita.

Alfredo Cuervo Barrero

A Victor, el motor de mi vida, porque "sin ti no entiendo el despertar" (Serrat).
A todos los que me quieren y quiero, en especial a mis padres y mi hermano
que me lo han dado TODO.



Agraïments

Per fi!!! Sabia que seria dur, però la veritat és que no imaginava que ho pogués ser tant. Per fi hi he arribat, després de mesos i mesos sense veure el final del camí. I és que el més difícil d'aquesta tesi han estat aquestes darreres setmanes escrivint, *buff*, això de fer una tesi doctoral és quelcom difícil i mira que ja m'ho havien avisat! Però ha estat una feina motivant i maca alhora, i la recompensa és la satisfacció personal d'haver sabut arribar a la meta sense perdre'm, tot i que el mèrit no és tot meu. És per això que vull agrair a tots aquells que m'han acompanyat durant aquest camí el seu recolzament, la seva ajuda incondicional i el no deixar-me sola, GRÀCIES.

Potser primer començar per les meves directores de tesi, la Dra. Àngels Manresa i la Dra. Pilar Diaz, per les experiències i coneixements compartits, per tot el que m'han ensenyat, per les seves exigències i seu estímul constant, i sobretot per confiar en que el mutant havia d'arribar fins i tot quan jo ja no hi confiava, gràcies a les dues.

En segon lloc, agrair al Dr. Miquel Regué, Director del departament, i al Dr. Javier Pastor, Coordinador del programa de doctorat Microbiologia Ambiental i Biotecnologia, el seu suport durant el meu període formatiu. En especial al Javier, que ha estat molt més que un coordinador durant la meva estada a Biologia. Ell ho sap però ho havia de dir.

Agrair també, al Dr. Jaume Comes, del servei de citometria del Parc Científic de Barcelona, la seva amabilitat i paciència, així com a la Dra. Olga Jauregui i a l'Eli pel seu temps i la seva ajuda davant de l'HPLC/EM. Gràcies també al grup del Dr. Olivier Epaulard del *Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble* per enviar-me els plasmidis pel mutant (pEx100Tlink, pUCGmlox, pCm157), *merci*.

No em puc deixar a la Dra. Espuny: Josele gràcies per tot, per la teva amistat, per les xerradetes, per preocupar-te, i perquè et fas estimar. Gràcies a la resta de membres del departament, per no deixar-me ningú. Especialment a la Dra. Núria Rius, per portar-me al departament quan era alumna seva, a la Dra. Ana Marqués per la seva ajuda amb els biotensioactius, a la Dra. Merche Berlanga, que ha estat primer professora i ara amiga, per les seves xerrades científiques i no tan científiques. A la Dra. M^a Jesús Montes, tècnic del departament, pel seu ajut tècnic i els seus somriures, a l'Ajo per tenir sempre una paraula amable i a la Lucía Muñoz, la secretaria del departament, per estar sempre disposada a ajudar-me (no només amb la "burrocràcia") i sempre de bon humor (fan falta més "secres" com tu a la UB).

Per arribar al final del camí he hagut de seguir dues dreceres que en algun moment, no sé com, s'han creuat i ara van de la mà. Vaig aterrar al departament de micro de Farmàcia una mica per casualitat i de mica en mica em vaig anar engrescant. Qui vaig conèixer primer van ser els tres veterans del grup. L'Éscar i el Jaume, companys i amics, llàstima no haver pogut compartir més hores de labo, i la Mònica. Potser al començament va costar però després l'acollida va ser estupenda, amb tu "Monic" sí que hem compartit més que grans *gatsbies*. Gràcies per l'ajuda, pels consells, per acompanyar-me, per estar sempre, perquè encara que ja faci uns anys que ja faci uns anys que voltes per Alemanya, sempre puc comptar amb tu.

Al poc d'arribar jo, al nostre cau es va incorporar l'Albert. Junts hem patit totes les etapes de la tesi i ens hem aguantat l'un a l'altre *en lo bueno y en lo malo ...* Tens raó que no s'han de confondre els companys de feina amb els amics "Abbettico", però és que amb tu no hi veig la diferència i sé que m'emporto un bon amic. Després va tornar de la UAB l'alcoià, el Dr. David Minyana, el meu "becari", el "Minyins". Gràcies per compartir amb mi el *loft*, per ajudar-me sempre desinteressadament i per aguantar les meves bogeries, sobretot al final de l'escriptura. Amb la Monic, l'Abbettico i el Minyins les llargues jornades de feina no ho han semblat tant.

A la darrera etapa de la tesi hem tingut dos bons fitxatges al grup tensis, el Nacho i el César. ¿Que os va a decir la fierecilla? Que me lo he pasado genial con vosotros, regañando a "Naxete" para picarle un poco y riendo con las historias inverosímiles de "Cesario". Gracias por los muchos favores en el curro, por las risas, por lo bien que lo hemos pasado juntos y lo seguiremos pasando espero (¿Y eso?). I no em vull deixar a tots els que han anat passant i han deixat empremta, el Frank, la Maria, la Rosa Maria, l'Aintzane, la Eleonora, l'Eriel, la Tereza, la Silvana,...gràcies a tots pels bons moments compartits.

L'altra dreuera em va portar al departament de Microbiologia de Biologia, allà també he tingut molta sort amb la gent que he trobat. Va començar com un curs de doctorat que gaudíem a Mallorca amb la Iulia i la Cristina i després juntes hem patit els cursos de doctorat, la "burrocràcia" administrativa, els moments de frustració, però sobretot hem gaudit molt de la companyia al laboratori i fora, i estic segura que ens queden molts més moments inoblidables per passar-ho bé. De moment tenim una cita pel juliol de l'any vinent a Alemanya, oi Cris? Al lab 2 també he conegut molta més gent amb qui ho he passat molt i molt bé: el boig del Pere (Pedrooo!!), el curiós de l'Arnau de Gurb, l'imperdible Óscar (els meus tres *mosqueteros* particulars), la Nikolia, l'Ericolo, el Rodolfo, l'Amanda i els dos últims fitxatges, Susana i Silvia, dos diamants en brut. No voldria deixar d'agrair a tot el dpt. de micro la seva acollida, tant als professors, com als companys dels altres laboratoris.

No em puc descuidar el grup dels biòlegs, que m'acompanyen des de fa molt de temps, que ja hem fet tots els 30 i ens varem conèixer amb 18 i amb alguns abans, com l'Àfrica i la Neus que m'acompanyen des de l'escola. Alguns fins hi tot han fet augmentar el grup, i amb la Fina i el Mario se'ns ha incorporat el Xavi i ara amb la Olga en vindrà una altra. L'Antònia, la Gemma, l'Anna, la Núria i l'Albert, l'Enric, el Xavi i la Estíbaliz. Amb la Esti he compartit molt, és molt fàcil. Sembla mentida que ara gairebé tots siguin doctors!! He de dir que amb els no biòlegs (els respectius) també ho hem passat i ho passem molt bé. Gràcies a tot el grup pels bons moments viscuts i els que queden per viure. I ja que hi som als CTAòlegs, on tinc també a la Esti, la Neus de Les Borges Blanques, la Clara, la Imma, el Joan, el Monchi, la Cristi...

A mis *colegas*, mis mejores amigos con los que siempre puedo contar. Óscar muchas gracias por estar ahí siempre y a la pareja del año, Moni y Sergio, parece mentira pero todo llega. Gracias a los tres por las confianzas, los chismorreos, las risas, los abrazos, los besos, las escapadas y a la pareja por mi sobrinita Vega, que es como si lo fuera. También a mis niñas del básquet, Alba (Albichuela), Maria (Marieta) y Laurita les tengo que agradecer que me quieran tanto y me hagan sentir como una niña y a mis mujercitas Tere y Aurora porque lo pasamos muy bien dentro y fuera de la pista. Ah! y a las veteranas de este año, el

Basquetfo, que me han hecho desconectar un poco en este tramo final. Y a todos mis amigos que por suerte tengo muchos y no los puedo nombrar a todos: gracias, no quisiera olvidarme ninguno.

Tengo que dar también las GRACIAS con mayúsculas a mi familia, por su cariño, su ayuda y su comprensión incondicional e ilimitada. Por aguantarme con paciencia, por dárme todo y aún sin entender mucho de lo que hablo preguntarme por mi tesis, sin ellos estaría perdida. A mi "mami", Ana, y mi "papito" José, los mejores, y a mi hermano Jose, por tocarme con un poco de su talento y su curiosidad y por el poema y el ramo. También le agradezco a mi otra familia su cariño y apoyo, porque tengo dos papis más y otra hermana que me aceptaron desde el principio como una más de la familia. Mis "suegris" Encarna y Manolo, y mi "Reina de los mares", Sara. Y a la familia de verdad, la que está ahí cuando los necesitas y a los que he ido perdiendo por el camino que tanto quería y que tanto echo de menos. En memoria de mi tío Alonso y mi tía Cati y a mis abuelos Jose M^a, Manuel y Manuela.

Te he dejado para el final porque lo bueno se hace esperar *carinyet*, el más importante, "el mejor del mundo mundial". Muchas gracias porqué sin ti ya hace tiempo que habría abandonado esta aventura. Porque me das la calma que necesito, por aguantar mis berrinches, por hacerme reír cuando estoy triste y cuando no, por sorprenderme cada día, por cuidarme tanto, por ser como eres y compartirlo conmigo. Porque después de casi quince años juntos aún me haces sentir la ilusión del primer día. Por darme uno de los días más felices de mi vida, el 29 de marzo del 2008 y por hacer que todos lo sean. "Que todas las noches sean noches de luna, que todas las lunas sean lunas de miel" (Sabina).

Noelia Torrego Solana

ÍNDIX

1. INTRODUCCIÓ.....	1
1.1. Tecnologies netes i sostenibles. Residus oliosos	3
1.2. Els lípids	5
1.3. Utilització d'àcids grassos pels microorganismes per la producció de biopolímers i tensioactius	7
1.3.1. Les carboxilesterases	8
1.3.1.1. Aplicacions de les carboxilesterases	9
1.3.2. Àcids grassos hidroxilats (AG-OH).....	11
1.3.3. Polihidroxialcanoats (PHAs).....	14
1.3.3.1. Descobriment i caracterització dels polihidroxialcanoats (PHAs)	14
1.3.3.2. Genètica d'acumulació dels PHAs. La PHA sintasa (PhaC).....	16
1.3.3.3. Biosíntesi i regulació de les rutes de PHAs	19
1.3.4. Tensioactius.....	21
1.3.4.1. Tensió superficial	24
1.3.4.2. Classificació dels tensioactius i emulgents més emprats	25
1.3.4.3. Tipus de tensioactius i microorganismes productors	27
1.3.4.4. Funcions biològiques dels tensioactius	29
1.3.4.5. Aplicacions industrials dels tensioactius.....	30
1.3.5. Ramnolípid (Rhls)	31
1.3.5.1. Estructura química dels Rhls.....	32
1.3.5.2. Producció bacteriana dels Rhls	33
1.3.5.3. Biosíntesi de Rhls.....	33
1.3.5.4. Genètica de producció dels Rhls	35
1.3.5.5. Funció biològica dels Rhls.....	38
1.3.5.6. Producció de Rhls per <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38
1.3.5.7. Producció de Rhls a partir de substrats renovables de baix cost	39
1.3.5.8. Aplicacions industrials dels Rhls	40
1.4. Relació metabòlica entre les vies de biosíntesi dels Rhls i els PHAs	40
2. OBJECTIUS	43
3. MATERIALS I MÈTODES	47
3.1. Microorganismes	49
3.2. Medis de cultiu.....	50
3.3. Mètodes microbiològics	52
3.3.1. Inòcul dels cultius	52
3.3.2. Conservació de microorganismes.....	52
3.4. Plasmidis de clonació i/o d'expressió	53
3.5. Mètodes de manipulació d'àcids nucleics.....	53
3.5.1. Aïllament i purificació de l'ADN.....	53
3.5.2. Amplificació de l'ADN mitjançant PCR	54
3.5.3. Electroforesi en gels d'agarosa	55

3.5.4.	Purificació de fragments d'ADN separats per electroforesi	56
3.5.5.	Seqüenciació d'ADN.....	56
3.5.6.	Tractaments enzimàtics	57
3.5.6.1.	Digestions amb enzims de restricció	57
3.5.6.2.	Tractament amb RNAsa	58
3.5.6.3.	Lligacions de molècules d'ADN	58
3.5.7.	Sistemes de transferència de material genètic.....	58
3.5.7.1.	Transformació de <i>E. coli</i>	58
3.5.7.2.	Conjugació d' <i>E. coli</i> amb <i>P. aeruginosa</i>	59
3.5.7.2.1.	Conjugació <i>E. coli</i> S17.1 λ <i>pyr</i> amb <i>P. aeruginosa</i> 47T2 i 42A2	59
3.5.7.2.2.	Conjugació <i>E. coli</i> S17.1 pEX100TAGmD amb <i>P. aeruginosa</i> 47T2 i 42A2	60
3.5.7.3.	Electroporació de <i>Pseudomonas</i>	60
3.5.8.	Mètodes bioinformàtics	61
3.5.8.1.	Anàlisi de les seqüències	61
3.5.8.2.	Disseny d'oligonucleòtids	62
3.5.9.	Tècniques de mutagènesi	63
3.5.9.1.	Mutagènesi aleatòria	63
3.5.9.1.1.	Mutagènesi per exposició controlada a llum ultraviolada	63
3.5.9.1.2.	Mutagènesi per inserció amb el transposó del pUT mini-Tn5	63
3.5.9.2.	Mutagènesi dirigida	64
3.6.	Tècniques d'anàlisi de proteïnes	66
3.6.1.	Fraccionament cel·lular	66
3.6.2.	Valoració de la concentració de proteïna	66
3.6.3.	Electroforesi SDS-PAGE.....	67
3.6.4.	Detecció de l'activitat lipolítica	68
3.6.4.1.	Detecció qualitativa d'activitat amb derivats de la 4-metil-umbeliferona (MUF)	68
3.6.4.1.1.	Activitat sobre paper de filtre	68
3.6.4.1.2.	Anàlisis zimogràfiques	69
3.6.4.2.	Detecció quantitativa d'activitat lipasa amb derivats del <i>p</i> -Nitrofenil (<i>p</i> -NP)	69
3.6.4.3.	Estudi del rang de substrats	70
3.6.4.4.	Determinació de la temperatura òptima	70
3.6.4.5.	Determinació del pH òptim	70
3.6.4.6.	Anàlisi de la termoestabilitat	71
3.6.4.7.	Anàlisi de l'estabilitat a diferents pHs.....	71
3.7.	Seguiment i determinació del creixement cel·lular.....	71
3.7.1.	Quantificació de la biomassa	71
3.7.2.	Quantificació de proteïna en cultiu	72
3.7.3.	Determinació del pH	72
3.7.4.	Determinació de nitrats i nitrits	72
3.8.	Anàlisi qualitativa i quantitativa dels PHAs	72
3.8.1.	Observació microscòpica dels grànuls de PHA.....	72
3.8.2.	Determinació citomètrica de cèl·lules productores de PHA	74
3.8.3.	Extracció i purificació del PHA	75

3.8.4.	Anàlisi dels PHAs per Ressonància Magnètica Nuclear (RMN)	76
3.8.5.	Quantificació gravimètrica de PHAs	76
3.9.	Anàlisi qualitativa i quantitativa dels Rhls	77
3.9.1.	Obtenció i purificació de Rhls	77
3.9.2.	Anàlisi qualitativa dels diversos components dels Rhls	78
3.9.2.1.	Identificació per cromatografia en capa fina dels components lipídics i de sucres dels sobrenedant	78
3.9.2.2.	Identificació de l'extracte de Rhls per cromatografia líquida d'alta resolució i espectrometria de masses (HPLC/EM)	79
3.9.3.	Determinació quantitativa dels Rhls	80
3.10.	Determinació dels paràmetres fisicoquímics dels Rhls	80
3.10.1.	Determinació de la tensió superficial	81
3.10.2.	Concentració micel·lar crítica (CMC)	82
3.10.3.	Capacitat d'emulsificació dels Rhls	82
3.10.4.	Elaboració de diagrames de fases ternaris	82
3.10.5.	Assajos de solubilitat dels Rhls	83
3.11.	Anàlisi qualitativa i quantitativa dels àcids grassos monohidroxilats (MHOD) i dihidroxilats (DHOD)	84
3.11.1.	Extracció dels àcids grassos hidroxilats	84
3.11.2.	Identificació i quantificació dels àcids grassos hidroxilats	84
3.11.2.1.	Identificació per cromatografia en capa fina (TLC)	84
3.11.2.2.	Identificació per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC)	85
3.11.2.3.	Quantificació per cromatografia de gasos (CG) dels àcids grassos hidroxilats	85
4.	RESULTATS I DISCUSSIÓ	87
4.1.	Estudi comparatiu del sistema lipolític de la soca <i>P. aeruginosa</i> 47T2 amb la soca tipus <i>P. aeruginosa</i> PA01	91
4.1.1.	Activitat lipasa de <i>P. aeruginosa</i> 47T2 i <i>P. aeruginosa</i> PA01	92
4.1.1.1.	Detecció de l'activitat lipolítica de les soques mitjançant proves en paper i zimograma	92
4.1.1.2.	Determinació de l'especificitat de substrat	97
4.1.1.3.	Determinació de la temperatura òptima	99
4.1.1.4.	Determinació del pH òptim	101
4.1.1.5.	Determinació de la termoestabilitat	104
4.1.1.6.	Determinació de l'estabilitat a diferents pHs	107
4.2.	Obtenció de mutants negatius per la producció de PHA de <i>P. aeruginosa</i> 42A2 i 47T2	110
4.2.1.	Mutagènesi aleatòria	110
4.2.1.1.	Mutants obtinguts per exposicions controlades a llum ultraviolada	110
4.2.1.1.1.	Selecció i comprovació dels mutants obtinguts per irradiació llum UV	111
4.2.1.2.	Mutants obtinguts per inserció amb el transposó del pUT mini-Tn5	116
4.2.2.	Mutagènesi dirigida	118

4.2.2.1.	Anàlisi dels mutants defectius per la producció de PHAs.....	130
4.2.2.1.1.	Anàlisi per Microscòpia Òptica (MO) d'epifluorescència	131
4.2.2.1.2.	Anàlisi per Microscòpia Electrònica de Transmissió (MET)	132
4.2.2.1.3.	Anàlisi per Ressonància Magnètica Nuclear (RMN).....	136
4.2.2.1.4.	Quantificació gravimètrica	138
4.3.	Estudi comparatiu dels productes obtinguts a partir de les soques	
	<i>P. aeruginosa</i> 42A2 Δ AD i 47T2 Δ AD	140
4.3.1.	Cinètica dels cultius de <i>P. aeruginosa</i> 42A2 i <i>P. aeruginosa</i> 42A2 Δ AD sobre olis de fregit.....	140
4.3.1.1.	Determinació de la producció de MHOD i DHOD a partir de substrats carbonats residuals (olis de fregit).....	143
4.3.2.	Cinètica del cultiu de <i>P. aeruginosa</i> 47T2 i <i>P. aeruginosa</i> 47T2 Δ AD sobre olis de fregit	148
4.3.2.1.	Determinació dels productes excretats al sobrenedant produïts partir de substrats carbonats residuals.....	151
4.4.	Caracterització fisicoquímica dels Rhls	170
4.4.1.	Solubilitat dels Rhls.....	170
4.4.2.	Determinació de la concentració micel·lar crítica (CMC).....	171
4.4.3.	Propietats emulsionants dels Rhls. Determinació del balanç hidrofílic-lipofílic (HLB)	174
4.4.4.	Comportament fàsic per l'anàlisi de possibles aplicacions dels Rhls.....	176
4.4.4.1.	Aplicacions en cosmètica. Sistema Miristat d'Isopropil / Rhls / Aigua (MI/R/A)	182
4.4.4.2.	Aplicacions en la indústria alimentària. Sistemes Oli d'oliva / Rhls / Aigua (O/R/A) i Oli de soja / Rhls / Aigua (S/R/A).....	186
4.4.4.3.	Bioremediació i explotacions petrolíferes. Sistema Petroli de Casablanca / Rhls / Aigua (PC/R/A)	192
5.	CONCLUSIONS.....	197
6.	BIBLIOGRAFIA	201
7.	ANNEX	i-viii

1. INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Tecnologies netes i sostenibles. Residus oliosos

El desenvolupament sostenible i la producció neta, són dos conceptes que apareixen a la dècada dels noranta com a conseqüència de la presa de consciència global de l'augment incontrolat del consum de recursos naturals a les darreres dècades i de la generació de residus i emissions que d'aquest consum se'n deriva.

Si bé és molt estesa la idea que el desenvolupament sostenible és aquell capaç de satisfer les necessitats actuals sense comprometre els recursos i possibilitats de futures generacions, i que per tant es basa en l'ús de recursos naturals renovables (Brundlandt, 1990), cal considerar que es tracta d'una idea termodinàmicament impossible. Els recursos tenen una vida útil determinada i amb la tecnologia actual es pot aconseguir és allargar-la, però la pèrdua d'energia en fer-los servir és inevitable.

La producció neta és aquella basada en l'ús de tecnologies que minimitzen l'impacte ambiental, reduint així l'emissió de residus. Tot i així, l'aplicació de les anomenades tecnologies netes suposa un canvi en la manera de produir que es tradueix moltes vegades en la reutilització sistemàtica dels residus per tal d'allargar la seva vida útil. El desenvolupament de la biotecnologia, la química i l'optimització de processos industrials han fet possible que aquesta reutilització sigui viable econòmicament i que s'hagi pogut utilitzar com a solució a alguns dels problemes que es generen com a conseqüència de la pressió generada pel desenvolupament humà (O'Brien, 1999; Rodríguez, 2006). Això permet augmentar la producció de recursos i fer l'activitat humana més sostenible.

És per tant molt important l'estudi i utilització d'eines biotecnològiques per obtenir nous productes industrials amb propietats millorades, d'impacte ambiental minimitzat i d'elevada biodegradabilitat. Actualment s'estan desenvolupant, a través de la biotecnologia, processos de producció industrial menys contaminants que permeten optimitzar l'aprofitament de les matèries primeres i reduir el consum d'energia; és a dir, tecnologies sostenibles de producció (Gámiz, 2007).

Al nostre país i en tots els de la riba mediterrània, el fet de fregir el menjar amb oli forma part de la nostra cultura gastronòmica i genera com a residu l'oli de fregit. Centres productors d'aquest residu són restaurants, hotels, menjadors col·lectius, indústries de precuinats, bars... i domicilis privats. Una vegada utilitzat, aquest producte suposa un problema per a l'entorn si s'aboca indiscriminadament. Com aquest tipus de greixos no poden ser ràpidament eliminats del medi natural, provoquen danys molt importants i perillosos a les canonades, a les estacions

depuradores..., amb la qual cosa es contaminen les aigües subterrànies i es destrueix una part important de la vida fluvial i marina. Un litre d'oli de fregit pot arribar a contaminar 100.000 litres d'aigua (Generalitat de Catalunya, Departament de Medi Ambient, Junta de residus, 1999).

La producció dels olis vegetals usats a Espanya es situa entorn de les 750.000 tones/any, segons xifres del 2005 (Agència de Residus de Catalunya, 2007). A més a més, es calcula que, només a Catalunya, cada any es generen 45.000 tones d'olis minerals usats procedents de la renovació dels lubricants utilitzats a les indústries, els vehicles d'automoció i les embarcacions. L'abocament o la combustió en condicions inadequades d'aquests compostos provoquen efectes molt negatius sobre el medi ambient (Agència de Residus de Catalunya, 2007; http://www.arc-cat.net/ca/estaddin/index_ind.html).

Amb el reciclatge no sols s'evita aquesta contaminació sinó que s'afavoreix la producció de combustible ecològic i productes de valor afegit i d'interès biotecnològic com ara tensioactius o polihidroxicarbons. Amb aquest aprofitament i reciclatge dels residus com a matèries primeres barates, utilitzant-los per obtenir productes de valor afegit, es poden evitar els costos de tractament d'aquestes matèries primeres com a residus.

Amb tot, en el cas dels olis, la seva recollida és problemàtica ja que la Llei 10/98 de Residus modificada per la Llei 62/03 estableix la prohibició d'abocar olis usats (BOE num. 96 de 22/4/1998, BOE num. 313 de 31/12/2003). La Comissió Europea proposa que el Ministeri de Medi Ambient i els ajuntaments creïn un sistema de recollida d'oli fregit, oleïnes i greixos en tres etapes: industrial, hostalera i domèstica (http://ec.europa.eu/index_es.htm).

Dins la diversitat de residus oliosos, els més estudiats i que més preocupació immediata causen, són els petrolis i hidrocarburs. Els abocaments de tones de cru al mar per accidents marítims o fuites d'oleoductes, causen importants desastres ecològics. Com a conseqüència d'aquests estudis s'ha desenvolupat la bioremediació, que és un procés en el qual s'utilitzen organismes vius per resoldre problemes específics mediambientals com la contaminació i l'abocament de petroli. Aquests abocaments es tracten emprant diverses tècniques, incloent l'addició de microorganismes i fins i tot de fertilitzants per facilitar la descomposició del cru pels bacteris.

D'altra banda, l'estudi de la reutilització dels residus d'olis vegetals es troba en plena expansió degut a l'augment del consum d'aquests productes. El caràcter residual que prenen els olis de fregit és degut al seu abocament després de ser utilitzats, per tant la solució seria el seu reaprofitament. Però abans de donar una

segona vida útil a aquests residus o subproductes és necessari saber en quin estat es troben després de sotmetre'ls a les elevades temperatures del fregit.

En sotmetre l'oli a processos de fregit es provoca el trencament i saturació d'algun dels àcids grassos de l'oli i augmenta el percentatge d'àcids grassos inferiors a 10 àtoms de carboni, disminuint majoritàriament el principal àcid gras present en l'oli: l'oleic, en el cas de l'oli d'oliva, i el linoleic, en el cas de l'oli de gira-sol (Taula 1.1).

Taula 1.1. Principal composició d'àcids grassos en olis fregits i no fregits d'oliva i de gira-sol (Weast, 1975-1976). El control de la mescla oliva/gira-sol s'ha realitzat fregint els olis per separat i mesclant-los posteriorment (adaptació de Haba *et al.* 2000).

Àcids grassos lliures (g/100g)		Oliva		Gira-sol		Oliva/Gira-sol 1:1	
		No fregit	Fregit	No fregit	Fregit	Control	Fregit
Làuric	C ₁₂ :0	-	0,1	-	0,1	-	0,1
Mirístic	C ₁₄ :0	-	0,8	0,1	0,17	-	0,12
Palmític	C ₁₆ :0	9	8,74	7	7,55	3,1	8,2
Palmitoleic	C ₁₆ :1 ¹⁴	0,6	0,64	0,1	0,2	-	0,43
Esteàric	C ₁₈ :0	2,7	2,6	4,5	4,74	1,41	3,49
Oleic	C ₁₈ :1 ⁹	80,3	55,51	18,7	24,7	74,5	41,65
Linoleic	C ₁₈ :2 ^{9,12}	6,3	7,43	67,5	55,6	21	27,98
Linolenic	C ₁₈ :3 ^{9,12,15}	0,7	0,67	0,8	0,28	-	0,3
Behenic	C ₂₂ :0	-	0,1	-	0,8	-	0,38
Lignocèric	C ₂₄ :0	-	0,15	-	-	-	-
Cis-accenic	C ₁₈ :1 ¹¹	-	0,15	0,7	-	-	-
< C ₁₀		-	22,52	-	2,39	-	14,11
Altres		0,4	1,49	0,6	4,08	-	3,41

L'elevada presència d'àcids grassos de llargada variable presents en els olis fregits permetrien la seva reutilització amb dues finalitats: per una banda, disminuir els costos de la seva eliminació com a residus, i per una altra part, aprofitar-los en indústries de transformació basades en tecnologies netes. Això seria possible a través de la utilització dels àtoms de carboni presents en els àcids grassos residuals com a font de carboni per algunes espècies bacterianes, entre elles *Pseudomonas aeruginosa*, com a substrat per a l'obtenció de nous productes d'interès biotecnològic.

1.2. Els lípids

Els lípids constitueixen una gran part de la biomassa terrestre, juntament amb els carbohidrats, les proteïnes i els àcids nucleics, essent elements claus en la

química de la vida, tant a nivell estructural com a nivell fisiològic i energètic (Schmid i Verger, 1998). Són compostos fonamentals pel funcionament dels éssers vius amb funcions molt diverses gràcies a la seva elevada heterogeneïtat química. Desenvolupen funcions estructurals formant les membranes biològiques, funcions d'emmagatzemament d'energia de manera compacta i anhidra (com els grànuls de PHA), funcions fisiològiques, i actuen com a aïllants, molècules missatgeres, vitamines, pigments, hormones, transportadors d'electrons, cofactors enzimàtics i detergents entre d'altres funcions (Boyer, 2000).

No existeix una definició precisa pel terme lípid. Generalment, dins dels lípids s'agrupen substàncies com ara olis, greixos i ceres, importants cadascuna per les seves qualitats i funcions. Els lípids poden procedir de plantes i animals vius o fossilitzats. Són un conjunt de molècules orgàniques, la majoria biomolècules, compostes principalment per carboni, hidrogen i, en menor quantitat, oxigen tot i que també poden contenir fòsfor, sofre i nitrogen.

La seva característica principal és que són insolubles en aigua però solubles en dissolvents apolars o lleugerament polars com l'èter, el cloroform, l'hexà o el benzè (Verger, 1997). Així, en un medi aquós, lípids amb caràcter clarament hidrofòbic tendeixen a associar-se mitjançant forces no covalents, donant lloc a gotes olioses, mentre que els lípids amfipàtics, que tenen parts hidrofòbiques i parts hidrofíliques, formen monocapes, bicapes o micel·les (Boyer, 2000, Mathews *et al.*, 2000).

En funció de la seva composició química, els lípids es poden classificar en lípids simples i lípids complexos, ambdós saponificables. Els terpens i esteroides són lípids derivats que no contenen àcids grassos a la seva estructura bàsica i per tant són insaponificables (Lehninger *et al.*, 1993).

Els lípids simples tenen propietats no polars i contenen un o dos tipus de molècules diferents, generalment neutres, excepte els àcids grassos. En aquest grup s'inclouen hidrocarburs, àcids grassos, alcohols, aldehids, polihidroxialcanoats, cutines, ceres, entre altres.

Els lípids complexos tenen propietats polars i estan constituïts per tres o més tipus de molècules diferents. Dins d'aquest grup s'hi inclouen els gliceroglicolípid, glicerofosfolípids, les esfingomielines, i els lipopolisacàrids, entre altres (Boyer, 2000).

El rendiment energètic de l'oxidació completa dels lípids és superior al dels carbohidrats o les proteïnes; és per això que els organismes emmagatzemen els lípids com a reservori energètic (Lehninger *et al.*, 1993). Pel recanvi metabòlic dels lípids i altres compostos, els organismes produeixen hidrolases, un ampli grup enzimàtic on s'inclouen les carboxilesterases (EC 3.1.1.-) (Schmid i Verger, 1998).

Donat que una de les funcions biològiques més importants dels lípids és l'ús d'aquests com a font d'energia pels organismes, l'estudi del seu catabolisme és imprescindible. Mitjançant una reacció d'hidròlisi de les carboxilesterases, els organismes obtenen glicerol i àcids grassos lliures a partir dels triacilglicèrids (Figura 1.1). Aquests enzims hidrolitzen l'enllaç èster mitjançant la incorporació d'una molècula d'H₂O, i per tant, separen els àcids grassos del glicerol (Jaeger *et al.*, 1994). Posteriorment, aquest glicerol segueix el catabolisme en la via glicolítica. En canvi, els àcids grassos obtinguts a partir dels triacilglicèrids o d'altres lípids, poden ser oxidats a través d'un procés de β-oxidació, constituint així una bona font d'energia pel creixement microbià (Prescot *et al.*, 2002).

Tot i així, les complexes propietats físico-químiques dels lípids dificulten de forma important la seva manipulació i, per tant, l'estudi dels enzims que els degraden (Jaeger *et al.*, 1994).

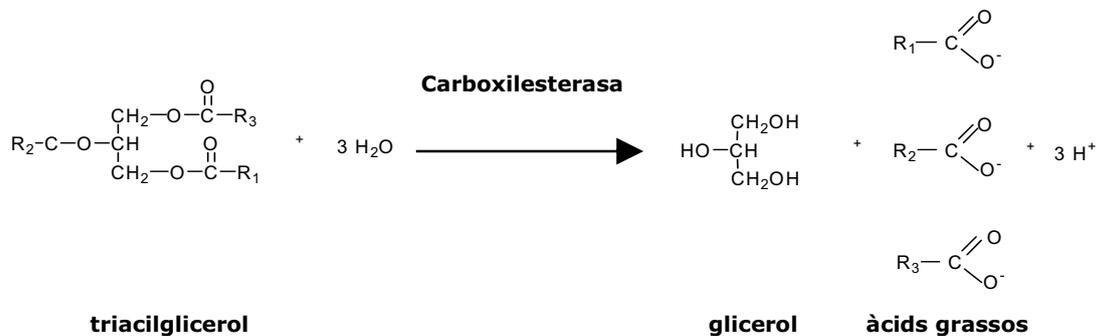


Figura 1.1. Reacció d'hidròlisi on intervé una carboxilesterasa.

1.3. Utilització d'àcids grassos pels microorganismes per la producció de biopolímers i tensioactius

L'ús de microorganismes per a la transformació de substrats, i sobretot de productes residuals, és una àrea en constant desenvolupament, ja que aquests són capaços de dur a terme reaccions molt complexes en pocs passos, que per síntesi química seria molt difícil realitzar.

De l'ús d'olis vegetals i àcids grassos pels microorganismes se'n deriven productes d'elevada funcionalitat i reactivitat. Entre aquests productes cal destacar els àcids grassos hidroxilats (mono-, di- i trihidroxilats), els àcids dicarboxílics i els polímers d'èsters, ja siguin ramnolípids, estòlids o polihidroxialcanoats (Kuo *et al.*, 2002).

Els microorganismes són capaços de portar a terme dos tipus de processos, el de biotransformació, en el qual l'àcid gras pateix petites modificacions en la seva

estructura, i el procés de conversió, en el qual a partir dels àcids grassos s'obtenen estructures polimèriques per mitjà d'enllaços èster (Culleré, 2002).

1.3.1. Les carboxilesterases

El metabolisme bacterià per a la transformació d'acilglicèrids i d'àcids grassos és dut a terme per diferents classes d'enzims entre els quals s'hi inclouen un grup enzimàtic amb una àmplia especificitat de substrats, les hidrolases. Així, aquests enzims són capaços d'hidrolitzar des d'amides o pèptids fins a èsters i triacilglicèrids. Les carboxilesterases (EC 3.1.1.-), dins les quals trobem les esterases (EC 3.1.1.1) i les lipases autèntiques (EC 3.1.1.3), catalitzen la hidròlisi d'èsters d'àcids carboxílics (Fojan *et al.*, 2000).

Les carboxilesterases són hidrolases que es troben presents a la major part d'organismes, des dels procariotes fins als fongs i organismes superiors (Schmid i Verger, 1998; Bornscheuer, 2002).

Les esterases són aquells enzims que hidrolitzen enllaços èster, per tant són capaces d'actuar sobre els èsters carboxílics de triglicèrids de cadenes curtes, fosfolípids, acetilcolina, o sobre els èsters del colesterol o d'alcohols simples i sobre els èsters d'àcids inorgànics, com el fosfòric o el sulfúric (Jaeger *et al.*, 1999).

Les lipases autèntiques, de manera general, són carboxilesterases que catalitzen la hidròlisi i la síntesi d'acilglicerols de cadena llarga, entenent per cadena llarga aquelles que tenen 10 o més àtoms de carboni (Jaeger *et al.*, 1999). Gràcies a les seves propietats catalítiques característiques presenten gran importància en aplicacions industrials i biotecnològiques (Arpigny i Jaeger, 1999).

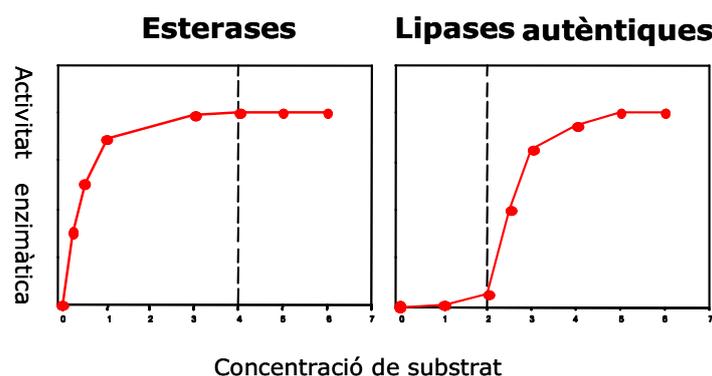


Figura 1.2. Comparació de la cinètica de catàlisi de les esterases i les lipases autèntiques.

Pel que fa a l'activitat enzimàtica, les esterases mostren un comportament cinètic típic de Michaelis-Menten, és a dir, la velocitat de reacció s'incrementa paral·lelament amb la concentració de substrat fins arribar a la saturació. En canvi,

les lipases autèntiques mostren un incrementen dràstic de la seva activitat quan el substrat té la suficient concentració per formar una emulsió (Figura 1.2) (Jaeger *et al.*, 1994).

Les lipases i esterases també es diferencien pel substrat sobre el que actuen. Mentre que les esterases trenquen únicament enllaços èster d'àcids grassos de cadena curta, les lipases tenen un ventall més ampli d'actuació i són capaces d'actuar tant sobre àcids grassos de cadena curta com llarga. Els àcids grassos de cadena llarga són més insolubles en dissolucions aquoses, així les lipases són capaces d'identificar i actuar sobre substrats agregats o insolubles. Per tant, l'activitat lipasa no és proporcional a la concentració del substrat en la dissolució sinó a l'àrea total de substrat disponible (Fojan *et al.*, 2000).

1.3.1.1. Aplicacions de les carboxilesterases

La versatilitat de les lipases bacterianes i fúngiques és interessant des del punt de vista biotecnològic, que és cada vegada major (Jaeger i Reetz, 1998; Bornscheuer, 2002 i Hasan *et al.*, 2006). El seu elevat potencial tecnològic és degut en gran part al seu ampli rang de substrats i a la seva elevada estabilitat en dissolvents orgànics no aquosos. Aquestes característiques possibiliten la seva aplicació ambivalent tant en reaccions d'hidròlisi com de síntesi d'èsters (Villeneuve *et al.*, 2000; Schmid i Verger, 1998). Fins fa poc temps, les lipases més utilitzades a nivell industrial eren les fúngiques (Jaeger *et al.*, 1997) degut a que dins la indústria alimentària, on s'apliquen majoritàriament, els fongs són considerats com a microorganismes segurs (*GRAS: Generally Recognised As Safe*) (Jaeger *et al.*, 1994).

Actualment les lipases microbianes s'estan utilitzant a la indústria alimentària com a additius alimentaris per la producció d'aromes i emulgents (Harwood, 1989; Hasan *et al.*, 2006). En el procés de panificació s'ha descrit la participació de les lipases en l'obtenció de productes finals amb unes propietats reològiques més satisfactòries (Poutanen, 1997). S'han utilitzat també en elements dietètics i en el camp de la nutrició parenteral per a la preparació de triacilglicèrids d'absorció més fàcil a través de processos de transesterificació (Schmid i Verger, 1998; Björkling *et al.* 1991).

Una altra aplicació de les lipases es troba en el processament d'olis fàcilment accessibles per a l'obtenció de compostos d'alt valor afegit (Godtfredsen, 1993; Macrae, 1989). A part d'aquestes aplicacions en la producció d'aliments amb un alt valor afegit, els àcids grassos poliinsaturats produïts per acció de les lipases també tenen un paper molt important en medicina ja que la majoria estan inclosos en la

l·lista d'àcids grassos essencials. I també són importants com a components farmacèutics, donat que tant els àcids grassos lliures com les seves formes mono- i diglicèrids, són utilitzats en la producció d'anticoolesterolèmics, antiinflamatoris o trombolítics (Jaeger i Reetz, 1998).

Les lipases també formen part de la majoria de formulacions de detergents. Així, entre les lipases que s'estan comercialitzant s'hi inclouen la lipasa de *Pseudomonas alcaligenes* [Lipomax, Gist Brocades] i la de *Pseudomonas mendocina* [Lumafast, Genencor] (Schmid i Verger, 1998; Hasan *et al.*, 2006).

Altres aplicacions destacables de les lipases com a hidrolases les trobem a la indústria paperera, per eliminar els components hidrofòbics de la fusta que provoquen greus problemes en la manufactura del paper (*pitch*) (Gutiérrez *et al.*, 2001); o a la indústria tèxtil i en la fabricació de cosmètics, entre altres (Hasan *et al.*, 2006).

Pel que fa a la capacitat sintètica de les lipases, s'han utilitzat aquests enzims com a catalitzadors d'una gran varietat de transformacions quimio-, regio- i estereoselectives, però l'aspecte més interessant és la l'enantioselectivitat de les lipases (Jaeger i Reetz, 1998). Molts intermediaris claus en la síntesi de components terapèutics, agroquímics o additius alimentaris, són compostos quirals, dels quals només és funcional un dels seus dos enantiòmers. Per tant, és necessària la síntesi d'enantiòmers purs, i és en aquest punt on les lipases contribueixen de manera essencial en el món de la indústria química i farmacèutica (Reetz, 2002).

Altres reaccions que tenen lloc en solvents orgànics són les transesterificacions, un exemple de les quals és la síntesi de biodiesel, una font d'energia alternativa pel transport produïda enzimàticament a partir de l'oli de diferents plantes oleaginoses. Les lipases poden catalitzar la transesterificació simple de l'oli vegetal a metil èster o a un altre alcohol de cadena més curta. Per tant, aquest combustible prové d'una font renovable i resulta menys contaminant degut a la reducció en la producció del sulfur d'òxid (Jaeger i Eggert, 2002).

En contrast, les esterases no són utilitzades biotecnològicament de manera tan àmplia com les lipases (Kademi *et al.*, 2000). Aquesta relativa poca utilització de les esterases sembla ser deguda a la manca de disponibilitat en quantitats suficients per la indústria de la química orgànica (Kademi *et al.*, 2000). Tot i així, existeixen ja nombroses referències pel que fa a les aplicacions d'aquests tipus d'enzims com ara síntesi de compostos òpticament purs, perfums i antioxidants i usos potencials de les esterases en referència a l'agricultura, l'alimentació i indústries farmacèutiques. Aquestes prometedores aplicacions s'hauran de veure recolzades per estratègies de producció apropiades i eficients (Panda *et al.*, 2004).

Així, treballs encaminats a la sobreproducció d'aquests enzims lipolítics podrien millorar l'ús i l'eficàcia de les múltiples reaccions catalitzades per les carboxilesterases.

Actualment, altres compostos que estan rebent una especial atenció són els biopolímers generats per síntesi enzimàtica. Un tipus especial de biopolímers són els estòlids, polímers d'àcids grassos hidroxilats amb propietats emulgentes (Peláez, 2000; Peláez *et al.*, 2003). Aquests polímers poden ser produïts a partir d'una font de carboni natural, renovable i a més a més, són biodegradables. Per tant, aquesta biocompatibilitat amb el medi ambient els confereix una gran importància i atrau l'atenció per al seu estudi. El procés de síntesi d'estòlids implica l'ús de lipases microbianes com a catalitzadors, amb la possibilitat de modular les propietats funcionals del producte a través del procés enzimàtic, obtenint així unes característiques noves respecte els productes obtinguts per síntesi química (Peláez, 2000).

1.3.2. Àcids grassos hidroxilats (AG-OH)

Existeixen nombrosos processos de bioconversió que poden ser realitzats per microorganismes a partir dels àcids grassos. Una de les reaccions de biotransformació que ha trobat aplicació com a procés industrial és la hidroxilació.

La hidroxilació d'àcids grassos per part dels microorganismes es pot produir en diferents punts de la cadena hidrocarbonada i consisteix en la conversió d'un enllaç carboni-hidrogen en un carboni-hidroxil (Kuo *et al.*, 2002). La hidroxilació és una de les activitats enzimàtiques més esteses, que té lloc tant en cèl·lules procariotes com en eucariotes (Holland i Weber, 2000). La introducció del grup hidroxil proporciona a l'àcid gras propietats especials com augmentar la seva viscositat o reactivitat. És per això que aquests productes són utilitzats com a reïnes, ceres, plàstics o en cosmètica, entre altres aplicacions (Hou *et al.*, 2002).

Als anys 60 diversos treballs van posar de manifest la capacitat de biotransformació de l'àcid oleic per part d'espècies del gènere *Pseudomonas* (Wallen *et al.*, 1962; Schroepfer, 1966 i Davis *et al.*, 1969). A finals dels 80 i durant la dècada dels 90, són múltiples els treballs referits a la biotransformació de l'àcid oleic en els quals es descriu l'obtenció d'una gran varietat de productes, essent els més destacats els derivats hidroxilats per les seves propietats tensioactives i antifúngiques.

L'any 1988 Mercadé i col·laboradors van descriure un nou tensioactiu procedent de la hidroxilació de l'àcid oleic per *Pseudomonas sp.* 42A2, l'estructura del qual es va assignar a l'àcid 7,10-dihidroxí-8(E)-octadecenoic. Posteriorment,

l'any 1991 Hou i col·laboradors van descriure la producció dels derivats hidroxilats 10-hidroxi-8(Z)-octadecenoic i 7,10-dihidroxi-8(E)-octadecenoic per *Pseudomonas* sp. PR3 a partir d'àcid oleic (Hou *et al.*, 1991 i Hou *et al.*, 1992). L'any 1995 Kaneshiro i col·laboradors van descriure la producció de 10(R)-hidroxiesteàric i 10-cetoesteàric per les espècies del gènere *Sphingobacterium*, *Bacillus* i *Nocardia* sp. a partir de l'oxidació de l'àcid oleic. Segons els autors, en primer lloc es dona una hidroxilació de l'àcid gras, i en segon lloc es produeix la desaparició del doble enllaç per actuació d'una hidratasa.

Cal ressaltar també els estudis de Kuo i col·laboradors on es descriu l'aparició del derivat trihidroxilat àcid 7,10,12-trihidroxi-8(E)-octadecanoic a partir d'àcid ricinoleic, amb aparició de l'àcid 10,12-dihidroxi-8(E)-octadecenoic com a producte intermediari (Kuo *et al.*, 1998). Aquest mateix grup l'any 2000, va determinar la configuració absoluta de l'àcid 10(S)-hidroxi-8(E)-octadecenoic i de l'àcid 7(S),10(S)-dihidroxi-8(E)-octadecenoic. Igualment, els autors es continuen referint a l'enzim hidratasa com a responsable del procés (Kuo *et al.*, 2000).

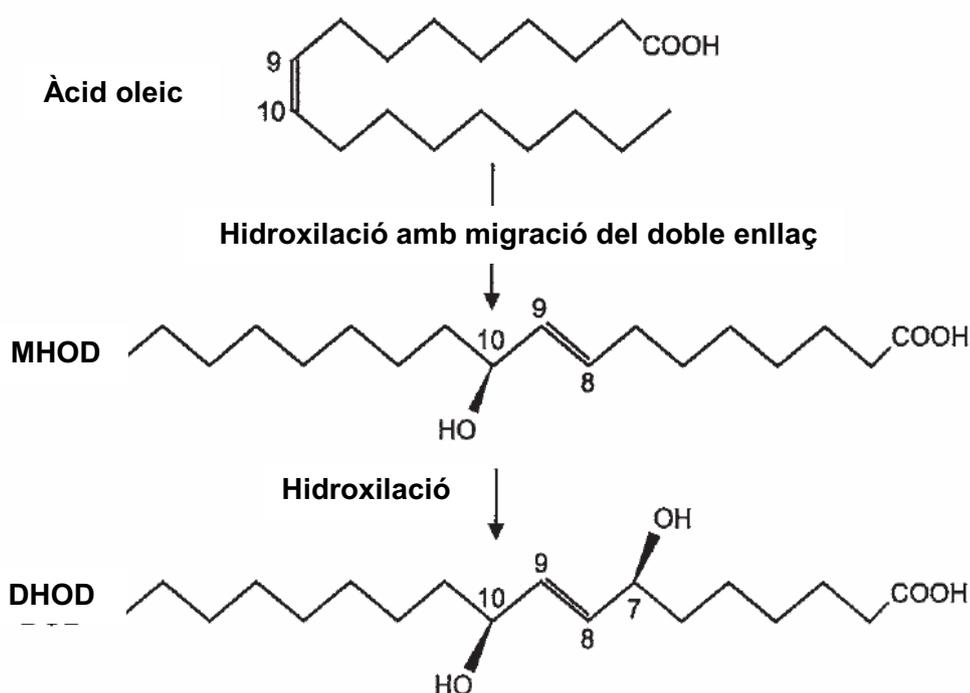


Figura 1.3. Ruta de conversió de l'àcid oleic per *Pseudomonas aeruginosa* PR3 (Kuo *et al.*, 2002). La soca *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 també pot presentar un intermediari hidroperoxi monoinsaturat (Guerrero *et al.*, 1997).

La tendència actual per a la bioconversió microbiana d'àcids grassos procedents de residus oliosos continua essent la mateixa que a finals dels anys 90, i que consisteix en treballar en l'obtenció de compostos hidroxilats a partir d'àcids grassos com el ricinoleic, el linoleic o l'oleic entre d'altres. Els productes que s'obtenen de la biotransformació microbiana tant de l'àcid oleic com del linoleic són:

- El derivat hidroperòxid, descrit per primera vegada l'any 1997, i trobat en cultius de *Pseudomonas* sp. 42A2 fets utilitzant àcid oleic com a font de carboni (Guerrero *et al.*, 1997). L'aparició d'aquest tipus de compostos s'ha observat també en plantes superiors, on es pot donar una conversió enzimàtica dels àcids grassos a àcids trihidroxilats passant pels epoxihidroxilats corresponents (Kim *et al.*, 2000).

- El derivat monohidroxilat (MHOD) (Figura 1.3), descrit per Guerrero i col·laboradors l'any 1997, juntament amb el derivat hidroperòxid. Alguns dels derivats monohidroxilats obtinguts per bioconversió microbiana d'àcids grassos mostren propietats antifúngiques (Kuo *et al.*, 2002). És el cas de l'àcid 10-hidroxi-8(E)-12(Z)-octadienoic o de l'àcid 9-hidroxi-10(E)octadecenoic, aïllats de plantes d'arròs infectades que van resultar més resistents a una segona infecció fúngica (Koshino *et al.*, 1987).

- El derivat dihidroxilat (DHOD), concretament el 7,10-dihidroxi-8(E)-octadecenoic (Figura 1.3), descrit l'any 1988 per Mercadé i col·laboradors, procedent de la hidroxilació de l'àcid oleic per *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 (Mercadé *et al.*, 1988). Aquest compost presenta propietats tensioactives. Addicionalment, s'han descrit propietats antifúngiques en altres compostos dihidroxilats com ara el 7(S),10(S)-dihidroxi-8(E)-octadecenoic obtingut per creixement de *Pseudomonas aeruginosa* sobre àcid oleic (Hou *et al.* 2002).

- El derivat trihidroxilat, detectat per primer cop a la cervesa com a resultat de la conversió de l'àcid linoleic durant el procés de maltat de l'ordi, que aporta a la beguda un gust astringent (Drost, 1971). L'any 1998 es va descriure la formació de l'àcid 9,10,13-trihidroxi-11(E)-octadecenoic i de l'àcid 9,12,13-trihidroxi-10-(E)octadecenoic a partir de l'àcid linoleic per *Pseudomonas aeruginosa* PR3 (Kuo *et al.*, 1998). També s'ha observat i aïllat aquesta família de compostos (àcid 12,13,17-trihidroxi-9(Z)-octadecenoic) en plantes d'arròs amb marciment prematur provocat per un fong, mostrant activitat antifúngica (Hou *et al.*, 2000). Kim i col·laboradors van detectar la presència d'àcids mono- i dihidroxilats al medi de cultiu de *P. aeruginosa* PR3 i els van designar com a compostos precursors dels derivats trihidroxilats (Kim *et al.*, 2000).

1.3.3. Polihidroxicanoats (PHAs)

Una altre tipus de bioconversió dels àcids grassos residuals per a la generació de nous materials es troba en la producció microbiana de polihidroxicanoats (PHAs), biopolímers constituïts per polièsters d'àcids grassos, amb propietats plàstiques. Actualment, els materials plàstics s'han convertit en una part important de la rutina diària per les seves propietats, entre les quals destaquen la durabilitat i la resistència a la degradació. Però el problema principal d'aquests plàstics és la seva acumulació deguda a la difícil biodegradabilitat. Segons dades del 2006 de l'Associació Europea de Productors Plàstics (PlasticsEurope), només a Espanya es produeixen 4,5 tones de plàstic l'any, que representen un 2% de la producció mundial estimades en 225 milions de tones.

El desenvolupament dels plàstics biodegradables ha evolucionat en la darrera dècada gràcies a la consciència de la població i de l'administració pel que fa als problemes ambientals globals i, en concret, a la gerència dels residus sòlids. Dins d'aquests plàstics biodegradables trobem els PHAs, els polièsters alifàtics, polisacàrids i copolímers d'aquests (Lee, 1996). De tots aquests compostos, els PHAs estan captant l'atenció de les indústries i centres d'investigació ja que tenen propietats similars als plàstics convencionals (Shimamura *et al.*, 1994) i presenten una biodegradabilitat completa (Lee *et al.*, 1999; Rehm, 2003 i Suriyamongkol *et al.*, 2007).

Els PHAs són molècules estructuralment senzilles que s'acumulen en determinades condicions a l'interior de certs microorganismes en forma de grànuls discrets, tant grampositius com gramnegatius, arribant en determinats gèneres fins al 90% del pes sec cel·lular (Jendrossek *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003; Tokiwa *et al.*, 2004; Kragelund *et al.*, 2005; Akar *et al.*, 2006). Aquests biopolímers funcionen com a reservori de font de carboni i poder reductor per la cèl·lula que els acumula (Suriyamongkol *et al.*, 2007).

1.3.3.1. Descobriment i caracterització dels polihidroxicanoats (PHAs)

L'any 1925, Lemoigne va aconseguir aïllar els polièsters bacterians de *Bacillus megaterium* i caracteritzar-los per primera vegada com a poli-3-hidroxi-butirat (PHB) (Lemoigne, 1925).

Entre les dècades dels 1950-1970 es van publicar diversos estudis que suggerien que el PHB funcionava com a reservori energètic i font de carboni intracel·lulars i que aquest fenomen era molt estès entre els bacteris tant gramnegatius com grampositius. Es pensava però que el monòmer 3-hidroxi-butirat

era l'únic constituent que formava part de l'estructura d'aquest polímer de reserva microbià. Aquesta idea va canviar l'any 1974, quan Wallen i Rohwedder van identificar i descriure altres polièsters formats majoritàriament per 3-hidroxi-butirat (3HB) i 3-hidroxi-valerat (3HV) i, en menor quantitat es van detectar també 3-hidroxi-hexanoat (3HHx) i 3-hidroxi-heptanoat (3HHp) en mostres de fangs d'aigües residuals (Wallen i Rohwedder, 1974). Posteriorment també s'han observat en altres PHAs extrets de sediments fins a 11 tipus de poli-3-hidroxi-alcanoats (3HA). A la taula 1.2 s'observen alguns d'aquests exemples de 3HA identificats en diferents microorganismes i en determinats entorns ambientals.

Taula 1.2. Composició monomèrica dels PHAs sintetitzats per diferents microorganismes i aïllats de diferents ambients naturals. 3HB:3-hidroxi-butirat; 3HV:3-hidroxi-valerat; 3HHx:3-hidroxi-hexanoat; 3HHp:3-hidroxi-heptanoat; 3HO:3-hidroxi-octanoat; 3HD:3-hidroxi-decanoat; 3HUD:3-hidroxi-undecanoat i 3HDOD:3-hidroxi-dodecanoat (Kim i Lenz, 2001).

	3HB	3HV	3HHx	3HHp	3HO	3HD	3HUD	3HDOD
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	X	X	X	X				
<i>Rhodobacter sphaeroidis</i>	X	X						
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Pseudomonas cepacia</i>	X	X						
<i>Ralstonia eutropha</i>	X	X						
<i>Bacillus megaterium</i>	X	X						
<i>Aphanotheco</i>	X	X						
<i>Microvoleus</i>	X	X						
Sediments marins	X	X	X	X	X			
Aigües residuals	X		X		X			
Fangs d'aigües residuals	X	X	X	X				

En 1983, fent créixer *Pseudomonas oleovorans* en un medi amb *n*-octà com a font de carboni i analitzant el polímer intracel·lular que acumulava, Witholt i col·laboradors van demostrar que estava constituït principalment per 3HO (De Smet *et al.*, 1983, Witholt *et al.*, 1988).

Aquest fet, conjuntament amb la identificació d'altres HAs diferents del HB i la cerca de materials alternatius als plàstics a mitjans dels anys 70 per l'augment del preu del petroli degut a la previsió d'exhauriment dels reservoris fòssils, van provocar un interès creixent a nivell industrial en els PHAs. En aquesta dècada va començar la producció a nivell industrial i la potència més gran en la comercialització dels PHAs va ser Imperial Chemical Industries, Ltd. (ICI), que en 1982 inicià la producció del BIOPOL® (co-polièster constituït per unitats de 3HB i 3HV) (Lenz i Marchessault, 2005).

En la dècada dels 80, el gruix de la recerca es va dirigir a la identificació i caracterització dels potencials components d'aquests polièsters bacterians, els HAs.

Es van arribar a identificar més de 125 tipus diferents d'unitats de 3HA (Rehm i Steinbüchel, 1999) i fins i tot algunes unitats de 4HA i 5HA (Williams *et al.*, 1999). A finals dels anys 80, els gens implicats en la biosíntesi dels PHAs es van començar a clonar a partir de *Ralstonia eutropha*, transferint la seva activitat funcional a soques d'*Escherichia coli* (Slater *et al.*, 1988; Schubert *et al.*, 1988). L'èxit en la clonació dels gens biosintètics dels PHAs va fer possible també la generació de plantes transgèniques, que probablement seran les potencials productores de PHA en el futur (Poirier, 2002).

Però malauradament, els costos de producció dels PHAs són un obstacle a l'hora de potenciar l'ús d'aquests polímers en les múltiples aplicacions comercials en les que es podrien utilitzar. Emprant un soca salvatge de *R. eutropha* per exemple, el cost del PHA ascendeix a 16\$US per Kg, unes 18 vegades més car que el cost de producció del polipropilè. Es pot aconseguir reduir els costos fins a 4\$US per Kg si es fan servir soques d'*E.coli* recombinants, fent que el preu es trobi dins del rang d'altres materials plàstics biodegradables com ara els polièsters alifàtics. Un cost assumible per la producció de biopolímers estaria entre 3 i 5 \$US per Kg (Lee *et al.*, 1996).

El preu del producte depèn directament del cost del substrat, del rendiment del procés d'acumulació respecte el substrat de partida i de l'eficiència dels processos de purificació i de formulació final del producte (Lee *et al.*, 1996). Així, no sembla que l'ús d'aquests materials d'alta qualitat pugui ser molt ampli, tot i que si que s'ha trobat un gran potencial en aplicacions biomèdiques, indústria en la qual el alts costos de producció són més acceptables ja que els productes que se'n deriven són considerats d'alt valor afegit.

En l'actualitat l'interès per millorar la producció dels PHAs necessita de l'estudi dels mecanismes catalítics dels enzims implicats en la síntesi, i per tant implica la determinació de les estructures terciàries i quaternàries de les PHA sintases. Aquest desenvolupament en la enginyeria de proteïnes i la investigació de l'especificitat de substrat d'aquest grup d'enzims per tal d'analitzar la biosíntesi dels PHAs facilitarà que la producció d'aquests biopolímers sigui més dirigida i eficient (Rodríguez, 2006; Suriyamongkol *et al.*, 2007).

1.3.3.2. Genètica d'acumulació dels PHAs. La PHA sintasa (PhaC)

La biosíntesi dels PHAs es produeix gràcies a la capacitat polimeritzant de la PHA sintasa o PHA polimerasa. Els substrats naturals d'aquest enzim són els coenzim-A tioèsters d'un àcid (R)-hidroxialcanoic (HA-acil-CoA tioèsters) amb el grup hidroxil en la posició 3, 4, 5 o 6 de la unitat acil, amb diverses longituds de

cadena de carboni i també amb una ampla varietat de substituents (Steinbüchel y Valentin, 1995).

Aquesta PHA sintasa i la resta d'enzims que intervenen en la biosíntesi del PHA són codificats per l'acció d'uns pocs gens situats en el mateix operó (Witholt *et al.*, 1999). S'ha estudiat aquest operó en molts microorganismes que acumulen PHA (*Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Allochrocatium vinosum* D, *Bacillus megaterium*, etc.) (Figura 1.4) observant-se diferències tant en els gens que contenen aquests operons com en la distribució i orientació dels mateixos (Madison *et al.*, 1999).

A *Pseudomonas aeruginosa* s'han identificat i caracteritzat dos gens PHA sintasa, *phaC1* i *phaC2*, que es troben separats entre sí pel gen *phaZ*. Aquest gen codifica per una putativa PHA depolimerasa intracel·lular -PhaZ- implicada en l'alliberament de derivats d'hidroxiacil-CoA a partir dels PHAs (Timm i Steinbüchel, 1992).

L'operó per a la biosíntesi de PHAs en *P. aeruginosa* inclou també el gen *phaD*, que codifica per un putatiu regulador transcripcional, i els gens *phaF* i *phaI*, que aparentment codifiquen per proteïnes estructurals associades als grànuls de PHA. La proteïna PhaF també ha estat considerada com un regulador negatiu dels gens implicats en la biosíntesi dels PHAs. Per últim, el gen *phaG* codifica per una transacilasa que uneix la biosíntesi d'àcids grassos amb la biosíntesi de PHAs (Prieto *et al.*, 1999; Kilnke *et al.*, 2000).

La PHA sintasa pertany a la superfamília d' α/β -hidrolases, dins la qual es distingeixen tres tipus enzimàtics: classe I, classe II, classe III i classe IV, d'acord a la seva mida, número de subunitats i estructures primàries, i a la seva especificitat de substrat. Els tres tipus de PHA sintases posseeixen un residu de cisteïna altament conservat, un àcid aspàrtic i una histidina que constitueixen potencialment el centre actiu implicat en la reacció de polimerització (Jia *et al.*, 2000). La mutagènesi dirigida ha proporcionat un gran coneixement sobre la bioquímica de les PHA sintases, i s'ha progressat molt en la comprensió del mecanisme catalític d'aquest tipus de polimerases (Taguchi *et al.*, 2001; Jia *et al.*, 2001).

La PHA sintasa de *Pseudomonas aeruginosa* pertany a la classe II (Figura 1.4). Aquest segon tipus de PHA sintases s'ha descrit com aquelles sintases que incorporen preferentment monòmers de cadena mitja de (R)-3-HA-CoA (*mcl*-HAs) de forma eficient a les seves cadenes laterals, és a dir, monòmers que continguin de 6 a 14 àtoms de carboni (Rehm, 2003; Lageveen *et al.*, 1988; Steinbüchel i Hein, 2001).

A la Figura 1.4 es mostren els enzims que codifiquen per la PHA sintasa de les quatre classes enzimàtiques en diferents espècies bacterianes, així com la resta

de gens que es troben en el mateix operó i que contribueixen de manera indirecta en la formació del PHA (Suriyamongkol *et al.* 2007).

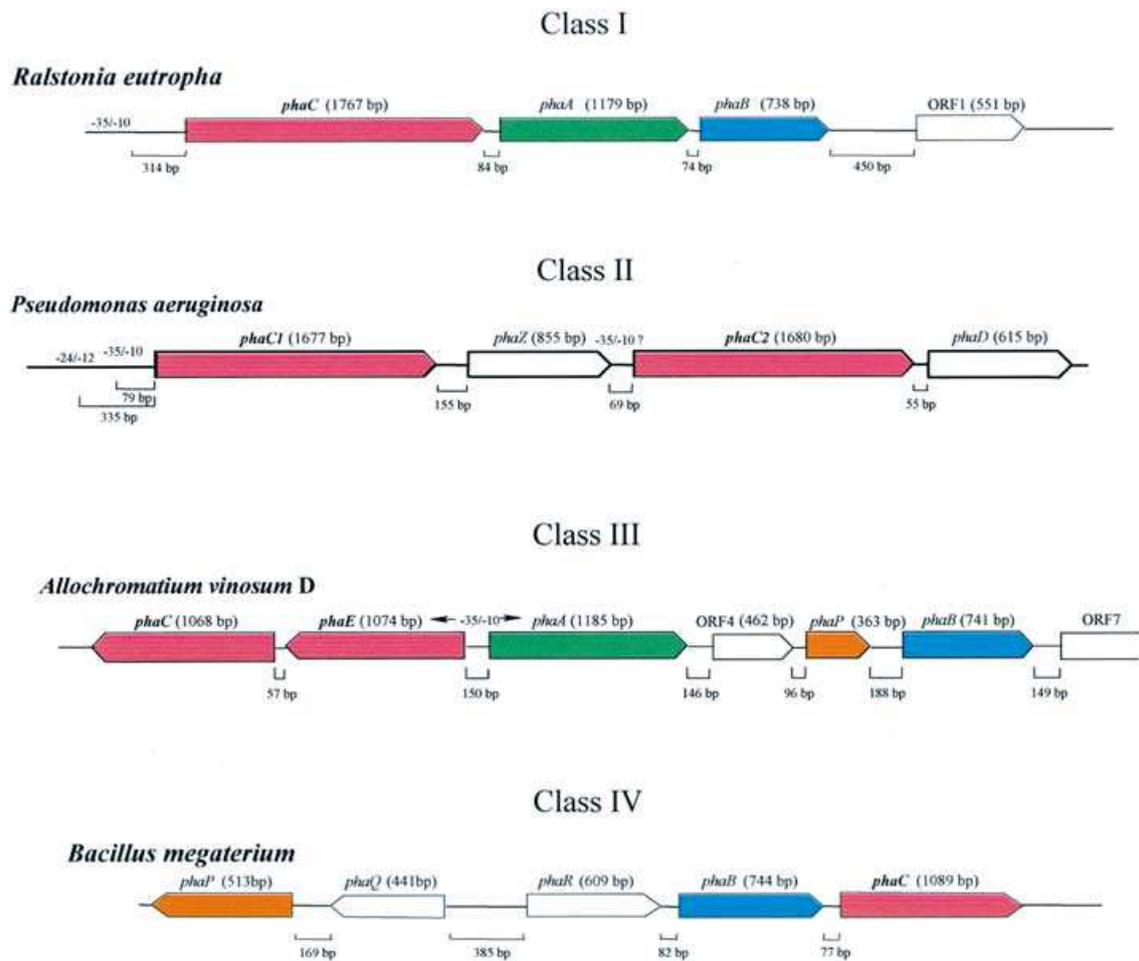


Figura 1.4. Representació de l'organització genètica dels gens que codifiquen per la PHA sintasa de diferents classes d'enzims. *PhaC/C1/C2*, gen que codifica per la PHA sintasa; *phaE*, gen que codifica per una subunitat de PHA sintasa; *phaA*, gen que codifica per la β -etotiolasa; *phaB*, gen que codifica per una acetoacetil-CoA reductasa; *phaR*, gen que codifica per una proteïna reguladora; ORF, origen de replicació de funció desconeguda; *phaZ*, gen que codifica per una PHA depolimerasa; *phaD*, origins de replicació de funció desconeguda. Per la classe II l'operó correspon a *phaC1ZC2D* per la formació de PHA (Rehm, 2003).

Les soques de *Pseudomonas* (*P. oleovorans*, *P. aeruginosa*, *P. mendocina*, *P. putida*), així com *Rickettsia prowazekii*, tenen dues polimerases actives (PhaC1 i PhaC2), i s'han detectat tres polimerases en *Pseudomonas* sp. GP4BH1 i en *Pseudomonas* sp. 61-3 (Timm *et al.*, 1994; Matsusaki *et al.*, 1998; Steinbüchel i Hein, 2001) (Figura 1.4). L'existència de dos o més polimerases en el mateix microorganisme, probablement com a conseqüència d'una duplicació de gens,

representa un interessant esdeveniment evolutiu que pot haver contribuït a la transició bioquímica dels polihidroxibutirats (PHBs), que només requereixen una sola polimerasa, als PHAs, on estan implicats dos enzims. En qualsevol cas, es requereixen més estudis que confirmin aquesta hipòtesi (Luengo *et al.* 2003). Ambdós enzims són bastant similars en les seves seqüències aminoacídiques, amb aproximadament el 50% d'homologia, i les seves especificitats de substrat són també similars. Les PHA sintases PhaC1 i PhaC2 de *Pseudomonas putida* BMOI s'assemblen molt a les de *Pseudomonas oleovorans* GPo1, mentre que les de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 i *Pseudomonas* sp. 61-3 són més divergents entre sí (Witholt i Kessler, 1999; Rehm, 2003).

1.3.3.3. Biosíntesi i regulació de les rutes de PHAs

Existeix una extensa bibliografia sobre el metabolisme, la bioquímica i la fisiologia del poli-(3-hidroxibutirat) (P-(3HB)), que s'ha enriquit en els darrers anys gràcies a la genètica molecular. Aquests estudis són una eina poderosa pel disseny i l'enginyeria d'organismes recombinants, que permeten modular a voluntat la producció de PHAs.

Així, actualment se sap que existeixen a la natura diferents rutes per la biosíntesi de PHAs. Els estudis genètics han proporcionat una idea sobre la regulació d'aquestes rutes biosintètiques en funció de les condicions de cultiu, així com del paper que desenvolupen en el metabolisme central i en la fisiologia de les pròpies cèl·lules (Suriyamongkol *et al.* 2007). El descobriment, fa més de dues dècades, de components diferents del 3HB (3-hidroxibutirat) en els PHAs va fer que s'estudiés l'àmplia varietat de monòmers que poden ser polimeritzats, resultats que van mostrar l'ampli rang d'especificitat de substrat de les PHA sintases. Els microorganismes són capaços de produir PHAs a partir de fonts de carboni molt variades: des de recursos renovables (sacarosa, midó, cel·lulosa, triacilglicerols, etc.), recursos fòssils (metà, oli mineral, carbó, etc.), residus complexes i de baix cost com les melasses i el glicerol, compostos químics (àcid propiònic, àcid 4-hidroxibutíric i diòxid de carboni), olis vegetals i els seus àcids grassos, fins alcans o simples carbohidrats (Suriyamongkol *et al.* 2007).

Per tant, la composició dels PHAs dependrà de les PHA sintases i per tant del microorganisme productor d'aquests PHAs, de la font de carboni utilitzada, i de les rutes metabòliques implicades (Madison i Huisman, 1999; Rehm i Steinbüchel, 2003).

Fins el moment s'han descrit quatre rutes metabòliques principals, que varien segons els microorganismes productors de PHAs (Doi i Abe, 1990; Steinbüchel, 1991):

- La ruta biosintètica del P(3HB) en *Cupravidus necator*.
- La ruta biosintètica de *Rhodopseudomonas rubrum*.
- La ruta biosintètica de *Pseudomonas* pertanyents al grup I d'homologia del rRNA 16S (entre les que es troba *P. aeruginosa*).
- La ruta biosintètica de *Pseudomonas* pertanyents al grup II d'homologia del rRNA 16S.

En qualsevol cas, la biosíntesi bacteriana dels PHAs pot dividir-se fonamentalment en dos tipus majoritaris atenent a la composició dels monòmers (*scl*-PHA o *mcl*-PHA) utilitzats pels diferents tipus de soques salvatges. Així, *C. necator* representa a un grup que utilitza monòmers de cadena curta (*scl*), mentre que les espècies de *Pseudomonas* representen a l'altre tipus majoritari de patró de biosíntesi de PHAs en que s'utilitzen els monòmers de cadena mitja (*mcl*) (Rodríguez, 2006).

A soques de *Pseudomonas* s'han trobat com a mínim tres rutes metabòliques diferents (Figura. 1.5) per la síntesi d'aquests 3-hidroxiacil-CoA tioèsters, (Rehm *et al.*, 1998; Soberón-Chávez *et al.*, 2005):

- La β -oxidació, ruta principal quan s'utilitzen àcids grassos com a font de carboni.
- La síntesi de *novo* d'àcids grassos, ruta principal durant el creixement amb fonts de carboni que són metabolitzades a acetil-CoA com carbohidrats, el gluconat, l'acetat o l'etanol.
- La reacció d'elongació de cadena, en la qual unitats d'acetil-CoA són condensades a 3-hidroxiacil-CoA. Aquesta ruta està implicada en la síntesi de PHAs durant el creixement amb hexanoat.

Es coneix poc sobre el procés de regulació dels sistemes de síntesi dels PHAs. Alguns grups d'investigació proposen que la regulació vindria donada per proteïnes associades als grànuls que contenen els PHAs, que podrien actuar sobre la transcripció dels gens de síntesi de PHAs (Steinbüchel *et al.*, 2003).

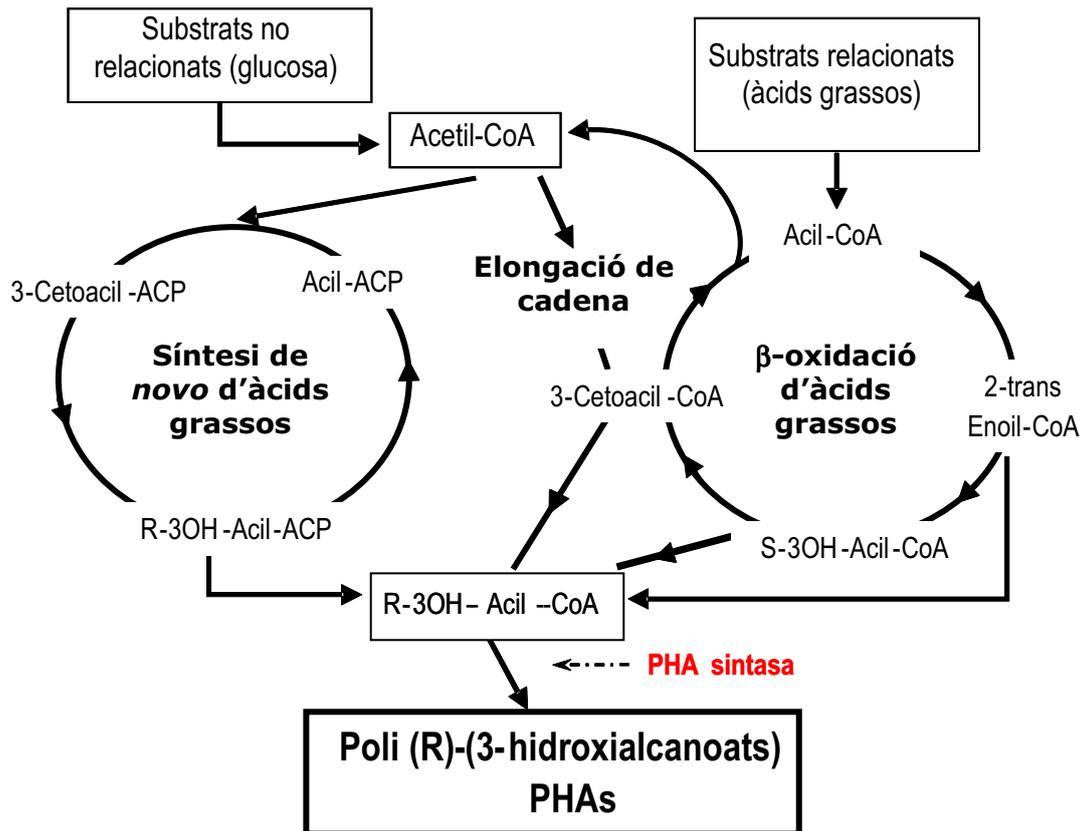


Figura 1.5. Principals rutes de biosíntesi dels *mcl*-PHA en *Pseudomonas* sp. (adaptat de Witholt *et al.*, 1999). Els números corresponen als enzims de les rutes de síntesi i degradació dels àcids grassos. (1) β -cetoacil-ACP hidratasa, (2) β -cetoacil-ACP reductasa, (3) enoil-ACP reductasa, (4) acil-CoA deshidrogenasa, (5) enoil-CoA hidratasa, (6) 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa i (7) 3-cetoacil-CoA tiolasa. Les lletres són els principals enzims de la síntesi de PHAs. (a) 3-hidroxiacil-CoA ACP transferasa, (b) cetoacil-CoA reductasa, (c) 3-hidroxiacil-CoA epimerasa, (d) enoil-CoA hidratasa i (e) PHA sintasa o polimerasa.

1.3.4. Tensioactius

A banda d'àcids grassos hidroxilats i PHAs, la bioconversió microbiana dels residus oliosos permet també la producció de tensioactius. Un compost tensioactiu és una substància química o bioquímica que s'adsorbeix a les interfases gas/líquid (aire/aigua), líquid/líquid (oli/aigua) o gas/sòlid (aire/superfície de sòlids). S'entén per interfase el límit entre dues fases condensades no miscibles, o bé la superfície quan una de les fases és un gas (normalment l'aire) i l'altra una fase condensada (líquida o sòlida) (Attwood i Florence, 1983).

Així, podem definir tensioactiu, o agent de superfície, com una substància capaç de fer variar la tensió superficial d'un líquid. Algunes substàncies tensioactives són capaces d'incrementar la tensió superficial, com ara les dissolucions concentrades de determinats electròlits forts; tot i així, els més

emprats a nivell pràctic són aquells que actuen de manera contrària, és a dir, reduint la tensió superficial o interfacial entre components líquids (Van Hamme *et al.*, 2006).

Els tensioactius són molècules de naturalesa amfifílica, amb una marcada diferència de polaritat en la seva estructura química entre els extrems de la molècula, fet que els hi confereix un marcat caràcter dual (Van Hamme *et al.*, 2006) (Figura. 1.6).

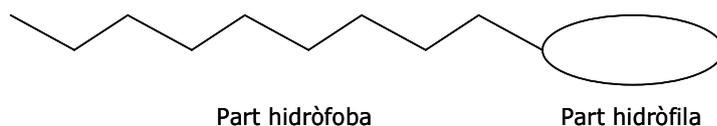


Figura 1.6. Esquema de l'estructura d'un tensioactiu.

La part hidròfoba és apolar i presenta afinitat per dissolvents orgànics o apolars i normalment correspon a una cadena hidrocarbonada de tipus alquil o alquil benzè de longitud variable. La part hidròfila és polar i es caracteritza per mostrar atracció cap a dissolvents polars, sobretot l'aigua, i pot estar formada per àtoms d'oxigen, sofre, fòsfat o nitrogen, inclosos en grups funcionals com alcohols, tiols, èters, èsters, àcids, sulfats, sulfonats, fòsfats, amines, amides, etc.

Aquesta propietat amfifílica els hi permet formar micel·les de diferents tipus (esfèriques, tubulars o planes) en funció de la concentració en la que es trobin en el medi dispersant, o bé formar monocapes a les interfases existents entre els líquids immiscibles (Rosen, 2004).

La naturalesa dual (polar-apolar) dels tensioactius i concretament l'equilibri entre aquestes dues parts hidròfila i hidròfoba de la molècula rep el nom de balanç hidròfil-lipòfil. L'índex **HLB** (Hydrophile-Lipophile Balance) representa el percentatge en pes de la part hidròfílica de la molècula no iònica del tensioactiu i està directament relacionat amb la solubilitat d'aquest. Aquest índex ens permet fer una predicció del comportament i de les propietats físico-químiques dels tensioactius, i representa numèricament el predomini de la part hidròfila o lipòfila de la molècula en una escala de valors adimensional entre el 0 i el 20. De manera que com més hidròfílica sigui la molècula més alt serà el seu valor HLB, mentre que als productes poc polars o oliosos els corresponen valors d'HLB baixos (Rosen, 2004).

Aquest índex evidencia la diferència conceptual entre tensioactiu i emulgent. El tensioactiu és un terme molt més ampli que engloba totes les molècules amfifíliques. Dins d'aquestes podem trobar molècules d'HLB extrem, que s'utilitzen

preferentment com a co-solvents donada la seva solubilitat molt preferencial per una de les fases. La seva acció es limita exclusivament a reduir la tensió interfacial (per humectació o formació de micel·les), però no són capaces de constituir pel·lícules uniformes que estabilitzin el sistema en forma d'emulsió (Griffin, 1949). L'emulgent en canvi és capaç d'estabilitzar l'emulsió que l'integra mitjançant la formació de pel·lícules interfacials coherents, contínues i flexibles. Aquest terme doncs, engloba les molècules més equilibrades pel que fa a l'índex HLB tot i poder tenir un cert predomini d'un dels pols sobre l'altre, cosa que diferencia els emulgents A/O (aigua en oli) amb predomini del pol hidròfob i amb un HLB baix, dels O/A (oli en aigua), en els que el predomini és de la fracció polar i que presenten un HLB alt.

El concepte d'HLB proposat per Griffin en 1949 respon a la següent expressió:

$$HLB = \frac{A}{A + O} \times 20$$

On A és la massa molecular de la fracció hidròfila de la molècula i O la massa molecular de la fracció lipòfila de la molècula.

Aquest índex HLB no determina l'eficiència del tensioactiu sinó que el classifica segons la seva estructura química, mitjançant la qual es relaciona amb l'estructura química del que es vol emulsionar. A grans trets, la correlació general entre l'HLB i l'ús del tensioactiu és la que es mostra a la Taula 1.3.

Taula 1.3. Correlació existent entre l'HLB requerit i l'ús pels diferents tipus d'emulsions (Rivas *et al.*, 1999).

HLB	ÚS
1-3,5	Antiescumants
4 - 6	Tensioactius per emulsions A/O
7 - 9	Agents humidificants
8 - 18	Tensioactius per emulsions O/A
13 - 15	Detergents
15 - 40	Solubilitzadors

En determinats casos és molt millor fer servir una barreja de tensioactius que un per sí sol, ja que l'efecte sinèrgic augmenta la seva eficàcia. En general, les barreges de tensioactius es recomanen per emulsions més fluides o de menor viscositat.

Una equació general per determinar l'HLB d'una barreja de dos tensioactius (A i B) és:

$$HLB_{\text{Barreja}} = (\% \text{Tensioactiu A} \times HLB_{TS \text{ A}}) + (\% \text{Tensioactiu B} \times HLB_{TS \text{ B}})$$

1.3.4.1. Tensió superficial

Les forces d'atracció i repulsió intermoleculars afecten les propietats de la matèria com ara el punt d'ebullició, la fusió, la temperatura d'evaporació, i la tensió superficial. Dins d'un líquid, al voltant d'una molècula actuen atraccions simètriques intra i intermoleculars, però a la superfície, una molècula es troba només parcialment envoltada per molècules i en conseqüència es veu atreta cap al interior del líquid per les molècules que l'envolten, fet que genera la tensió superficial (Rosen, 2004).

La tensió superficial és la responsable de la resistència que un líquid presenta a la penetració de la seva superfície, de la tendència a la forma esfèrica de les gotes d'un líquid, de l'ascens dels líquids en els tubs capil·lars i de la flotació dels objectes o organismes en la superfície dels líquids.

A nivell termodinàmic, la tensió superficial és un fenomen de superfície i és la tendència d'un líquid a disminuir la seva superfície fins que la seva energia de superfície potencial sigui mínima, condició necessària per tal que l'equilibri sigui estable. Com l'esfera presenta una àrea mínima per un volum donat, per acció de la tensió superficial, la tendència d'una porció de líquid porta a formar una esfera o a que es produeixi una superfície corba o menisc quan entren en contacte un líquid amb l'aire dins un recipient (Rosen, 2004).

La tensió superficial d'un líquid equival a la força que actua per centímetre de longitud d'una pel·lícula que s'estén, la qual actua com una força que s'oposa a l'augment de l'àrea del líquid. Numèricament és la proporció d'augment de l'energia superficial amb l'àrea, i s'expressa en N/m o J/m². L'energia superficial per centímetre quadrat es representa amb la lletra grega gamma (γ):

$$F\Delta x = \gamma\Delta S \qquad \gamma = \frac{F}{2d}$$

La tensió superficial depèn de la naturalesa del líquid, del medi que l'envolta i de la temperatura. En general, la tensió superficial disminueix amb la temperatura, ja que les forces de cohesió disminueixen en augmentar l'agitació tèrmica. La influència del medi exterior és deguda a que les molècules del medi

exerceixen accions atractives sobre les molècules situades en la superfície del líquid, contrarestant així l'acció de les molècules del líquid (Rosen, 2004).

Taula 1.4. Tensió superficial dels líquids a 20°C.

Líquid	g (10^{-3} N/m)
Oli d'oliva	33.06
Aigua	72.8
Alcohol etílic	22.8
Benzè	29.0
Glicerina	59.4
Petroli	26.0

La formació de la interfase és deguda a la interacció que es dona entre les molècules d'aigua i les molècules de líquids o gasos no solubles en aigua. Per tal de modificar aquesta interfase cal un aportació d'energia, i el treball necessari per a canviar la forma és el que es coneix com a tensió interfacial.

Com ja s'ha comentat, els tensioactius són molècules amb activitat sobre la tensió superficial, així, en afegir un tensioactiu a l'aigua, inicialment aquest es concentrarà a la superfície amb els dominis hidrofòbics enfocats cap a la superfície. Ara bé, quan tota la superfície d'aigua queda recoberta de molècules del tensioactiu, les seves molècules comencen a formar micel·les dins l'aigua. La concentració de tensioactiu a partir de la qual es comencen a formar micel·les és el que es coneix com a concentració micel·lar crítica (CMC), mesura important per a la caracterització dels tensioactius (Rivas *et al.*, 1999).

Les micel·les són estructures esfèriques o el·lipsoïdals que exposen els dominis hidrofílics dels tensioactius cap a la superfície exterior i els dominis hidrofòbics cap a la cara interna. L'efecte rentador dels tensioactius es basa en el fet que les substàncies hidrofòbiques com els greixos poden ser incorporades i emmagatzemats en les micel·les (Rosen, 2004) .

1.3.4.2. Classificació dels tensioactius i emulgents més emprats

Tal com s'ha comentat abans, les molècules tensioactives són amfifíliques, amb dues parts clarament diferenciades, una lipofílica i l'altra hidrofílica. La majoria estan constituïdes per una cadena hidrocarbonada llarga (part hidrofòbica), i una cadena o grup hidrofílic. En funció d'aquest últim els tensioactius es classifiquen en aniònics, catiònics, amfòters i no iònics (Taula 1.5).

Taula 1.5. Classificació i exemples de tensioactius (Solsona, 2001).

Tipus	Nom	Fòrmula
Aniònics	Sals d'àcids carbòxílics	RCOO-M+
	Sals d'àcids sulfònics	RSO ₃ -M+
	Èsters de l'àcid sulfúric	R-O-SO ₃ -M+
	Èster de l'àcid fosfòric	R-O-PO ₃ -(M+) ₂
Catiònics	Sals d'amoni	R ₃ N+H(X ⁻)
	Sals d'amoni quaternàries	R ₄ N+X ⁻
Amfòters	Sal d'amoni-grup carboxilat	R ₃ N+CHRCOO-
	Sal d'amoni -grup sulfonat	R ₃ N+(CH ₂) _n SO ₃ -
No iònics	Alcohols etoxilats	R-(OCH ₂ CH ₂) _n OH
	Èters etoxilats d'àcids grassos	RCOO-(CH ₂ CH ₂ O) _n H
	Òxids d'amina	R ₃ N(O)

Aquesta classificació, basada en el caràcter iònic del tensioactiu, estableix quatre grups de productes (Roberts, 2000; Holmberg *et al.*, 2002; Rosen 2004):

- **Tensioactius i emulgents aniònics:** són aquells que en dissolució s'ionitzen i el grup hidròfob queda carregat negativament. Són molècules amb cations orgànics i inorgànics (Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Ba²⁺, Mg²⁺, NH₄⁺, etc.) i una part hidrofílica que conté els grups aniònics (-COO⁻, -SO₃⁻, -O-PO₃²⁻, etc.), unida a la fracció orgànica. Són importants pel seu ús en la formulació de detergents d'ús domèstic i industrial.

- **Tensioactius i emulgents catiònics:** són aquells que en dissolució s'ionitzen i el grup hidròfob queda carregat positivament. Són compostos que tenen com a mínim una cadena de 8 a 25 àtoms de carboni, derivada d'àcids grassos o d'un derivat petroquímic, i un nitrogen carregat positivament; l'anió acostuma a ser Cl⁻, Br⁻, OH⁻, SO₄²⁻, etc. La majoria estan constituïts per una cadena llarga de sals d'amoni quaternàries o bé sals d'alquilamines. El grup hidrofòbic és, per tant, la cadena llarga, mentre que el grup hidròfil és petit i constituït pel nitrogen quaternari. Són importants a la indústria per la seva eficiència bactericida, germicida, algicida, etc.

- **Tensioactius i emulgents amfòters:** són aquells que presenten en la seva molècula grups aniònics i catiònics, formats per una cadena d'àcids grassos i un nitrogen quaternari, contenint un radical aniònic. Són productes estables en sistemes àcids i alcalins, molt importants en cosmètica per tenir una tolerància cutània bona, i en la formulació de productes de neteja alcalins o com a inhibidors de la corrosió.

· **Tensioactius i emulgents no iònics:** són aquells que es solubilitzen sense ionitzar-se mitjançant un efecte combinat d'un cert nombre de grups solubilitzants dèbils (hidròfils) com èter i OH⁻. Són derivats polioxietilenats i polioxipropilenats, derivats de sorbitan, alcanolamides grasses, etc. Tenen l'avantatge que són estables en front a la majoria dels productes químics en les concentracions usuales en que s'empren, i en no ionitzar-se en l'aigua no formen sals amb els ions metàl·lics i són igualment efectius en aigües toves (amb una concentració de CaCO₃ inferior a 50 mg/L) i dures (amb una concentració de CaCO₃ superior a 200 mg/L). La seva naturalesa els fa compatibles amb altres tensioactius catiónics, aniònics i col·loides carregats positivament i negativament. D'altra banda, les seves característiques els fan molt valuosos com a matèries primeres, base per la formulació de diversos productes per la indústria, l'agricultura, el làtex, tèxtils, processament de metalls, pintures en emulsió, petroli, polpa i paper i detergents.

1.3.4.3. Tipus de tensioactius i microorganismes productors

Segons la seva naturalesa química i l'espècie microbiana que els produeix existeixen diferents tipus de tensioactius. Així doncs els principals grups són: glicolípid, fosfolípid i àcid grassos, lipopèptid i lipoproteïnes, i tensioactius polimèrics (Hommel i Ratledge, 1993; Das *et al.*, 2008).

Els glicolípid, els més estudiats, són carbohidrats en combinació amb cadenes llargues d'àcid alifàtic o àcid alifàtic hidroxilat. Els glicolípid més comuns són els glicosil diglicèrids, presents en les membranes cel·lulars de molts bacteris. Tres exemples de glicolípid són: els ramnolípid, els trehalosalípid i els soforolípid.

- **Ramnolípid:** biotensioactiu format per diversos tipus de molècules, amb una o dues unitats de ramnosa lligades per un enllaç èster a una o dues molècules de l'àcid gras β-hidroxidecanoic .

- **Trehalosalípid:** format per disacàrids de trehalosa lligats pel C-6 i C-6' a un àcid micòlic. La diversitat de trehalosalípid depèn de l'estructura de l'àcid micòlic (nombre de carbonis i grau d'insaturacions).

- **Soforolípid:** són dímers de soforosa units a llargues cadenes d'àcid grassos hidroxilat. En funció de la longitud de l'àcid gras s'obtenen diferents tipus de soforolípid. El biotensioactiu està format per entre 6 i 9 tipus diferents de soforolípid.

Taula 1.6. Classificació i microorganismes productors de tensioactius.

Tipus de biotensioactius	Espècies microbianes productores
Glicolípid	
Micolats de trehalosa	<i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Arthrobacter paraffineus</i> <i>Mycobacterium phlei</i>
Èsters de trehalosa	<i>Mycobacterium fortitum</i> <i>Micromonospora spp.</i> <i>Mycobacterium smegmatis</i> <i>Mycobacterium paraffinicum</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i>
Micolats de mono-, di- i trisacàrids	<i>Corynebacterium diptheriae</i> <i>Mycobacterium smegmatis</i> <i>Arthrobacter spp.</i>
Ramnolípid i Soforolípid	<i>Pseudomonas spp.</i> <i>Torulopsis bombicola</i> <i>Torulopsis petrophilum</i> <i>Torulopsis apicola</i> <i>Candida spp.</i>
Fosfolípid i àcid grassos	
Fosfolípid i àcid grassos	<i>Candida spp.</i> <i>Corynebacterium spp.</i> <i>Micrococcus spp.</i> <i>Acinetobacter spp.</i>
Fosfolípid	<i>Thiobacillus thiooxidans</i> <i>Aspergillus spp.</i>
Lipopeptid i lipoproteïnes	
Gramicides	<i>Bacillus brevis</i>
Polimixines	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ornitina-lípid	<i>Pseudomonas rubescens</i> <i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Cerilipina	<i>Gluconobacter cerinus</i>
Lisina-lípid	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>Streptomyces sioyaensis</i>
Surfactin Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
Pèptid-lípid	<i>Bacillus licheniformis</i>
Tensioactius polimèrics	
Lipoheteropolisacàrids	<i>Arthrobacter calcoaceticus RAG-1</i>
Heteropolisacàrids	<i>Arthrobacter calcoaceticus A2</i>
Polisacàrid-proteïna	<i>Arthrobacter calcoaceticus strains</i> <i>Candida lipolytica</i>
Mano-proteïna	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>
Carbohidrat-proteïna	<i>Candida petrophilum</i> <i>Endomycopsis lipolytica</i>
Manan-complex lipídic	<i>Candida tropicalis</i>
Manosa/Eritrosa-lípid	<i>Shizonella melanogramma</i> <i>Ustilago maydis</i>
Carbohidrat-Proteïna-complex lipídic	<i>Pseudomonas spp.</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Debaryomyces polymorphus</i>

Els fosfolípids i àcids grassos són produïts per alguns bacteris i llevats degradadors d'hidrocarburs en créixer en medis amb *n*-alcans com a font de carboni. Aquests tensioactius poden produir microemulsions d'aquests alcans en l'aigua. S'utilitzen a la indústria farmacèutica pel tractament de ferides, entre altres.

Els lipopèptids i lipoproteïnes són antibiòtics decapeptídics i lipopeptídics amb propietats tensioactives. El lipopèptid surfactina, un compost cíclic que incorpora set aminoàcids (tant isòmers D com L) i 3-hidroxi-13-metil tetradecanoic, és un dels tensioactius coneguts més efectius però la seva capacitat hemolítica en limita el seu ús (Cooper, 1984).

Per últim, els tensioactius polimèrics són biopolímers d'alt pes molecular que acostumen a presentar viscositats altes, resistència a la ruptura i elasticitat. Aquestes característiques fan que aquests productes puguin ser aplicats en diverses àrees industrials. Alguns exemples són: Emulsan[®], Liposan[®], manoproteïnes i altres proteïnes polisacàridiques complexes (Hommel i Ratledge, 1993).

A la taula 1.6 es pot veure la relació entre la classificació dels tensioactius i les espècies microbianes productores.

1.3.4.4. Funcions biològiques dels tensioactius

Els tensioactius són produïts per una gran varietat de microorganismes molt diversos, cosa que fa difícil determinar de manera general quin és el paper que aquests juguen a la natura. Tot i així, diversos autors han proposat i demostrat una sèrie de funcions que posen de manifest el seu interès:

- Els tensioactius permeten incrementar la superfície de substàncies hidrofòbiques insolubles en aigua. S'ha comprovat que bacteris que creixen sobre hidrocarburs veuen limitat el seu creixement per l'àrea de la interfície aigua-oli (Shreve *et al.*, 1995).

- També incrementen la biodisponibilitat de substàncies hidrofòbiques insolubles en aigua. Els tensioactius poden potenciar el creixement bacterià en substrats adsorbits que no són accessibles, tot desadsorbint-los de la superfície o augmentant la seva solubilitat aparent en aigua (Deziel *et al.*, 1996).

- Els tensioactius tenen la capacitat de fixar metalls pesants. Els ramnolípid, per exemple, poden recuperar cadmi, plom i zinc del sòl (Herman *et al.*, 1995).

- Pel que fa a la patogènesi dels bacteris, s'ha vist que els tensioactius poden actuar com a factors de virulència. Els ramnolípid, per exemple, són considerats factors de virulència en *Pseudomonas aeruginosa*, associats a exoproductes, i la seva producció és portada a terme i regulada de manera

paral·lela a altres factors de virulència (Olvera *et al.*, 1999). Aquesta hipòtesi també es veu recolzada pel moment de la seva producció ja que els tensioactius es produeixen quan la densitat cel·lular és prou alta com per causar un atac localitzat a l'hospedador (Sullivan *et al.*, 1998).

- S'han descrit propietats antimicrobianes evidents d'alguns tensioactius per inhibició de creixement, com és el cas dels ramnolípidis produïts per *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 (Haba *et al.*, 2003).

- Per últim els tensioactius estan implicats en la unió-desunió dels microorganismes a les superfícies. Els microorganismes poden usar els seus tensioactius per regular les seves propietats superficials per tal d'unir-se o alliberar-se de les superfícies d'acord amb les necessitats del moment (Rosenberg, 1993). S'han observat transferències horitzontals de gens que codifiquen per a la producció de tensioactius d'una espècie bacteriana a una altra en comunitats bacterianes naturals, en coagregacions i en biofilms (Ron *et al.*, 2001).

1.3.4.5. Aplicacions industrials dels tensioactius

Les propietats úniques dels tensioactius permeten el seu ús i la possible substitució dels tensioactius sintetitzats químicament i utilitzats en gran quantitat en les operacions industrials. Els tensioactius són usats en un gran nombre d'indústries i es pot dir que la majoria d'operacions industrials modernes fan ús de les propietats d'aquests agents. Així doncs es pot dir que l'aplicació potencial d'aquests agents és ja una realitat (Singh *et al.*, 2007).

En general els tensioactius tenen funcions com a emulsificants, dispersants, humectants, en l'escumat o trencament d'escuma, com a impermeabilitzants, en detergència, com a germicides, insecticides, com a engrassants i desengreixants, en el tenyit, el blanquejat, com a suavitzants o lubricants, entre altres (Singh *et al.*, 2007).

Aquestes funcions s'aprofiten a la indústria per tal de preparar emulsions, pel platejat, la neteja de metalls i en el bany i gravat d'aquests. També s'utilitzen en el curtint de pells, per preparar tints d'impremta, en la preparació d'agents abrasius, en la preparació d'adhesius, en emulsions alimentàries, en el camp de la lubricació, la soldadura, la indústria paperera, en la pintura, en la indústria petrolera i en la dels plàstics, entre altres (Singh *et al.*, 2007).

D'acord amb les propietats generals dels tensioactius, aquests resulten de gran interès en la formulació galènica a la indústria farmacèutica, generalment en la solubilització micel·lar de fàrmacs poc solubles que es vulguin incorporar en formes farmacèutiques líquides. A més a més, tenen una acció humectant de

fàrmacs poc solubles o hidròfobs en formes farmacèutiques sòlides (comprimits, càpsules). Addicionalment els tensioactius faciliten la solubilització del fàrmac en els fluids biològics, afavorint el procés d'absorció del mateix. També són útils en la formulació d'emulsions farmacèutiques (fluides o cremes), proporcionant estabilitat físico-química per ser administrades de manera parenteral, oral o tòpica, i en la formulació de preparats d'higiene com sabons antisèptics, gels de bany, xampús, etc (Sadurní *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2007).

A la indústria tèxtil els agents tensioactius s'utilitzen per preparar les fibres, com a suavitzants, humectants, auxiliars de tintura, antiestàtics i per donar acabats antibacterians (Desai *et al.*, 1997).

A la indústria del rentat, gràcies a les seves propietats de detergència, humectació, mullat, dispersants i emulsionants, es fan servir per productes de neteja, desodorants, aromatitzants, desinfectants i detergents. A la indústria dels desinfectants s'utilitzen per la seva acció germicida i antisèptica, i a la indústria agrícola com a insecticides principalment (Roberts, 2000).

A la indústria dels cosmètics s'utilitzen els tensioactius amb funcions d'humectació, detergència, emulsificació, escumació, solubilització i efecte bactericida, generalment per preparar productes de neteja de la pell, preparats pel bany, locions, cremes, dentífrics, xampús, etc (Singh *et al.*, 2007).

A la indústria de la metal·lúrgica es fan servir en la lubricació, com a preventius de l'oxidació, com a detergents, desfloculants, emulsionants, etc. (Desai *et al.*, 1997).

A la indústria alimentària es fan servir com agents emulsionants, normalment lipofílics. Els més desitjats són els d'origen biològic, que siguin estables i no modifiquin el gust final dels aliments ni les emulsions durant mesos considerant el canvi de temperatura que poden patir els aliments. També s'utilitzen com a agents escumants en pastisseria i per l'elaboració de salses i embotits (Singh *et al.*, 2007).

1.3.5. Ramnolípid (Rhls)

Els ramnolípid són èsters de ramnosa amb propietats d'activitat superficial que s'acumulen al sobrenedant del cultiu de *Pseudomonas aeruginosa* i altres espècies de *Pseudomonas* com un conjunt de molècules homòlogues (Déziel *et al.*, 2003). Són emulsionants complexos, la composició dels quals determina les seves propietats físico-químiques. Això fa que sigui d'interès conèixer la seva composició i propietats per determinar les seves possibles aplicacions (Lang *et al.*, 1999).

1.3.5.1. Estructura química dels Rhls

Els ramnolípidos són els tensioactius microbians més efectius i millor estudiats dins els glicolípidos. L'estructura general dels ramnolípidos conté un anell d' α -L-ramnopiranosil unit a una cadena d'un β -hidroxiàcid mitjançant un enllaç glicosídic (Figura 1.7). Les cadenes del β -hidroxiàcid estan unides per enllaços èster i poden oscil·lar entre 8 i 14 carbonis. L'anell d' α -L-ramnopiranosil, tant en els mono- com en els di-ramnolípidos, constitueix la part invariable de la molècula (Soberón-Chávez *et al.*, 2005).

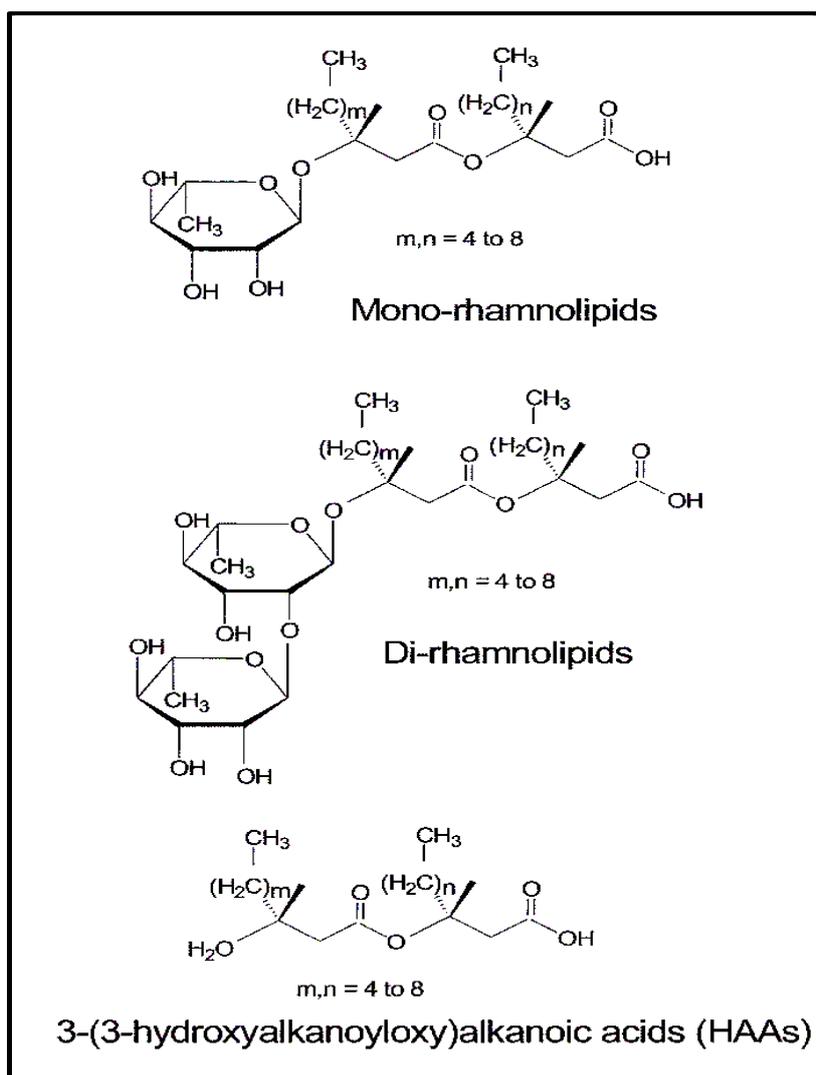


Figura 1.7. Estructura química dels ramnolípidos (Rha-C10-C10: Mono-ramnolípidos, Rha-Rha-C10-C10: Di-Ramnolípidos) i dels àcids 3-(3-hidroxi)alcanoil) alcanòics (HAAs).

1.3.5.2. Producció bacteriana dels Rhls

La producció de Rhls per *P. aeruginosa* va ser descrita per primera vegada per Jarvis i col·laboradors l'any 1949. Aquestes molècules amfifíliques estan formades per una part hidrofòbica –l'àcid gras– i una part hidrofílica consistent en una o dues ramnoses. Els àcids 3-(3-hidroxi- α -alcanoiloxi) alcanòics (HAAs), precursors anabòlics dels Rhls sense la fracció del sucre, també són alliberats pels bacteris productors i mostren propietats tensioactives (Déziel *et al.*, 2003). Com s'ha descrit, els Rhls produïts d'aquesta manera tenen aplicacions mediambientals i un elevat potencial industrial degut a les seves propietats tensioactives (Lang *et al.* 1999; Maier *et al.* 2000).

La biosíntesi bacteriana dels Rhls és dependent d'algunes vies del metabolisme central com ara la dels àcids grassos i la de producció de sucres activats dTDP (dioxitimidin difosfat) (Soberón-Chávez *et al.*, 2004). La producció d'aquests biotensioactius es troba fortament regulada a nivell transcripcional per les respostes de *quorum sensing* (QS) i per les condicions ambientals i té passos i intermediaris comuns a la biosíntesi dels PHAs (Soberón-Chávez *et al.*, 2005), dels lipopolisacàrids (LPSs) (Rahim *et al.* 2000), de l'alginat (Olvera *et al.*, 1999), i de les 4-hidroxi-2-alquinolines (HAQs) (Bredenbruch *et al.*, 2005).

1.3.5.3. Biosíntesi dels Rhls

Els Rhls són sintetitzats per cèl·lules lliures al final de la fase exponencial o al principi de l'estacionària, en condicions de limitació de nitrogen, via síntesi *de novo* (Syldatk i Wagner, 1987), i s'acumulen extracel·lularment (Mulligan *et al.*, 1989). La producció de ramnolípid va ser descrita per primera vegada al 1949, quan es va demostrar l'existència de l'enllaç glicosídic entre la cadena lipídica i la unitat de ramnosa i entre les unitats de ramnosa (Jarvis i Johnson, 1949).

En 1963, Burger va proposar la ruta de biosíntesi (Figura 1.8) a partir dels extractes cel·lulars de *P. aeruginosa*, on va trobar que la producció de Rhls té lloc per dues reaccions seqüencials catalitzades cada una per una ramnosiltransferasa específica. En la primera reacció hi participa la ramnosiltransferasa 1 (Rt1), que utilitza com a precursors els β -hidroxiàcids grassos de cadena mitja i la d-timidinfosfat (dTDP)- α -L-ramnosa, que actua com a substrat donador (Burger *et al.*, 1963) i que també intervé en la síntesi de lipopolisacàrids (LPSs) (Maier i Soberón-Chávez, 2000). El substrat acceptor és el β -hidroxiacidoil- β -hidroxiàcid (Burger *et al.*, 1963) que és un intermediari comú en la síntesi de PHAs (Rehm *et al.*, 1998). El β -hidroxiàcid, procedent de l'àcid gras sintasa amb independència de

la font de carboni (Hommel i Ratkedge, 1993), és el substrat que determina la velocitat de reacció (Mulligan i Gibbs, 1989).

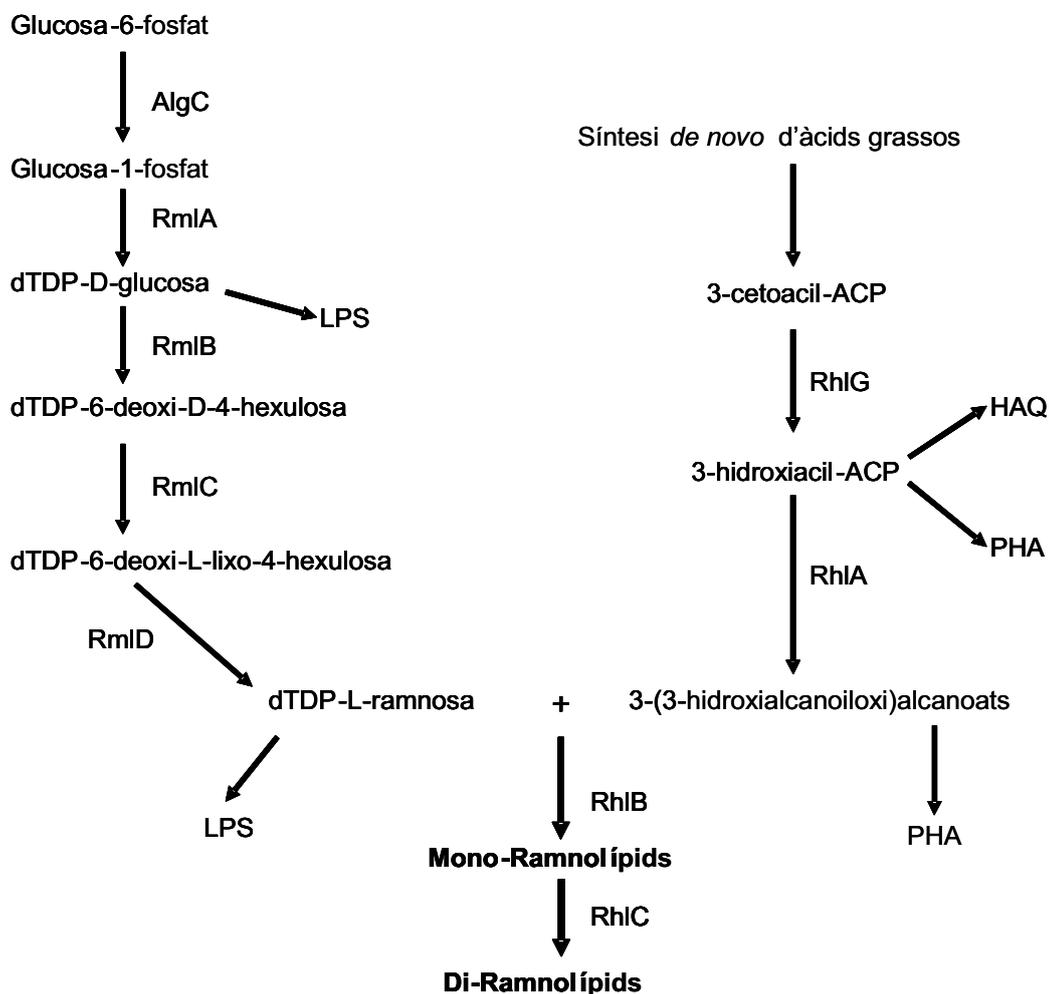


Figura 1.8. Ruta biosintètica de mono-ramnolípid i di-ramnolípid (adaptada de Lang, 1999).

Un cop produït el mono-ramnolípid (àcid ramnosil-β-hidroxi-decanoil-β-hidroxi-decanoic), aquest serveix a la seva vegada de substrat per l'enzim ramnosiltransferasa 2 (Rt2), qui juntament amb la dTDP-L-ramnosa, dona lloc a la producció del di-ramnolípid (ramnosil-ramnosil-β-hidroxi-decanoil-β-hidroxi-decanoat).

L'enzim Rt1 està constituït per dos polipèptids, RhIA i RhIB, on la segona subunitat catalítica sembla ser una proteïna de membrana interna, mentre que l'enzim Rt2 consta d'una única subunitat, RhIC. Recentment s'ha proposat que la subunitat RhIA es troba implicada en la síntesi del dímer intermediari β-hidroxiàcid gras. També es creu que l'activitat β-hidroxiàcid gras dimeritzant de la RhIA és responsable de la síntesi dels tensioactius àcids 3-(3hidroxialcanoiloxi)-alcanoic (HAAs) (Soberón-Chávez *et al.*, 2005).

En un cultiu líquid de *P. aeruginosa* es poden arribar a trobar fins a 28 formes homòlogues de ramnolípid on la longitud de cadena varia entre C8 i C24, i algunes d'elles contenen insaturacions (Mata-Sandoval *et al.*, 1999; Déziel *et al.*, 1999b).

Degut a aquesta variabilitat, el terme ramnolípid no fa referència a la síntesi d'un únic tipus de molècula sinó a una barreja complexa de molècules homòlogues. En el cas de *Pseudomonas aeruginosa*, les formes majoritàries que produeix són: R₁C₁₀C₁₀ (α -L-ramnopiranosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoat) i R₂C₁₀C₁₀ (α -L-ramnopiranosil- 2-O- α -L-ramnopiranosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoat) (Syldatk i Wagner, 1987).

1.3.5.4. Genètica de producció dels Rhls

La producció de ramnolípid es troba regulada a nivell de la transcripció per una complexa xarxa genètica que rep el nom de resposta sensòria al quòrum (RSQ). La major part dels elements que intervenen en la patogenicitat de *P. aeruginosa*, com exoenzims hidrolítics, toxines i ramnolípid, es produeixen d'una manera concertada quan els cultius arriben a una densitat cel·lular elevada, mitjançant l'activació transcripcional dels gens que els codifiquen (Soberón-Chávez, 2005).

Per tant, els gens que codifiquen per factors de virulència estan regulats per la RSQ, constituïda bàsicament per dos reguladors transcripcionals, LasR i RhIR. Aquests reguladors modulen la seva activitat a través de la interacció amb acil homoserinlactones, 3-oxodecanoil homoserinlactona (3O-C12-HSL) i butanoil homoserinlactona (C4-HSL), respectivament (Soberón-Chavez, 2005). Les acil homoserinlactones són produïdes pel mateix bacteri i és la seva concentració la que permet detectar que hi ha una elevada densitat cel·lular, motiu pel qual es denominen autoinductors.

A elevades densitats cel·lulars, la cèl·lula allibera l'autoinductor N-acilhomoserin lactona, una petita molècula difusible formada per la proteïna RhII, que fa possible la comunicació entre cèl·lules. Aquest autoinductor és més efectiu quan la densitat cel·lular és major i es troba normalment al final de la fase logarítmica i en la fase estacionària de creixement. Com a resultat, els ramnolípid es produeixen en aquesta franja del cicle cel·lular (Figura 1.9) (Ochsner *et al.*, 1995, Soberón-Chávez, 2005).

La proteïna RhIR és un activador transcripcional que actua com a regulador directe dels gens *rhIAB* i *rhIC* responsables de la síntesi de les dues formes dels ramnolípid (mono- i di-ramnolípid). La proteïna RhIR activa la transcripció de

rhlAB quan està unida a l'autoinductor, però també reprimeix al mateix promotor en absència de l'autoinductor (Figura 1.9).

Les condicions mediambientals, així com la composició del medi de cultiu, influeixen de manera molt decisiva en la RSQ, que afecta d'una manera important en l'expressió del gen *rhlR* i dels gens que són regulats per la proteïna RhIR, de manera que se sap que aquest reguló no només respon a una elevada densitat cel·lular, sinó que la condició metabòlica del bacteri és determinant.

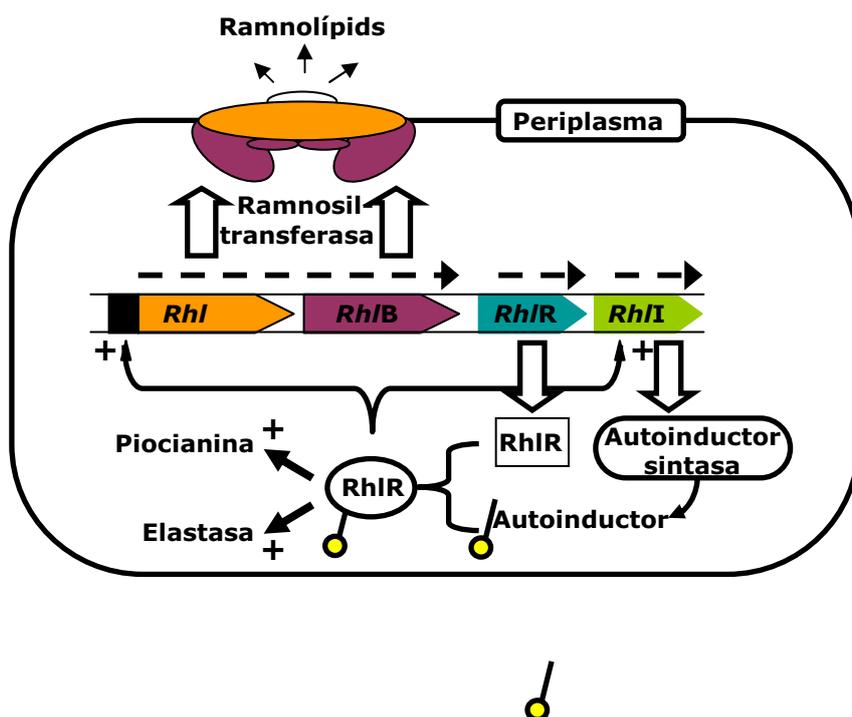


Figura 1.9. Model de regulació de la producció de ramnolípids per *Pseudomonas aeruginosa* (Ochsner *et al.*, 1995).

En 1999, Ragim i col·laboradors van descriure el gen *rhlC*, que codifica per l'enzim Rt2. Aquest enzim és homòleg a les ramnosiltransferases involucrades en la biosíntesi de lipopolisacàrids. A més a més, l'any 1998 Campos-García *et al.*, van identificar el gen *rhlG*, que codifica per l'enzim responsable del drenatge d'àcids grassos precursors de ramnolípids des de la seva via de síntesi general. L'enzim RhIG mostra una significativa homologia de seqüència amb nombroses cetoacil reductases NADPH-dependents. A *Pseudomonas*, la síntesi de l'àcid gras del ramnolípide es separa de la via general de biosíntesi d'àcids grassos en la reducció del cetoacil (Campos-García *et al.*, 1998). Per tant, la proteïna RhIG és necessària per la producció de ramnolípids, però no per la síntesi d'àcids grassos (Figura 1.10).

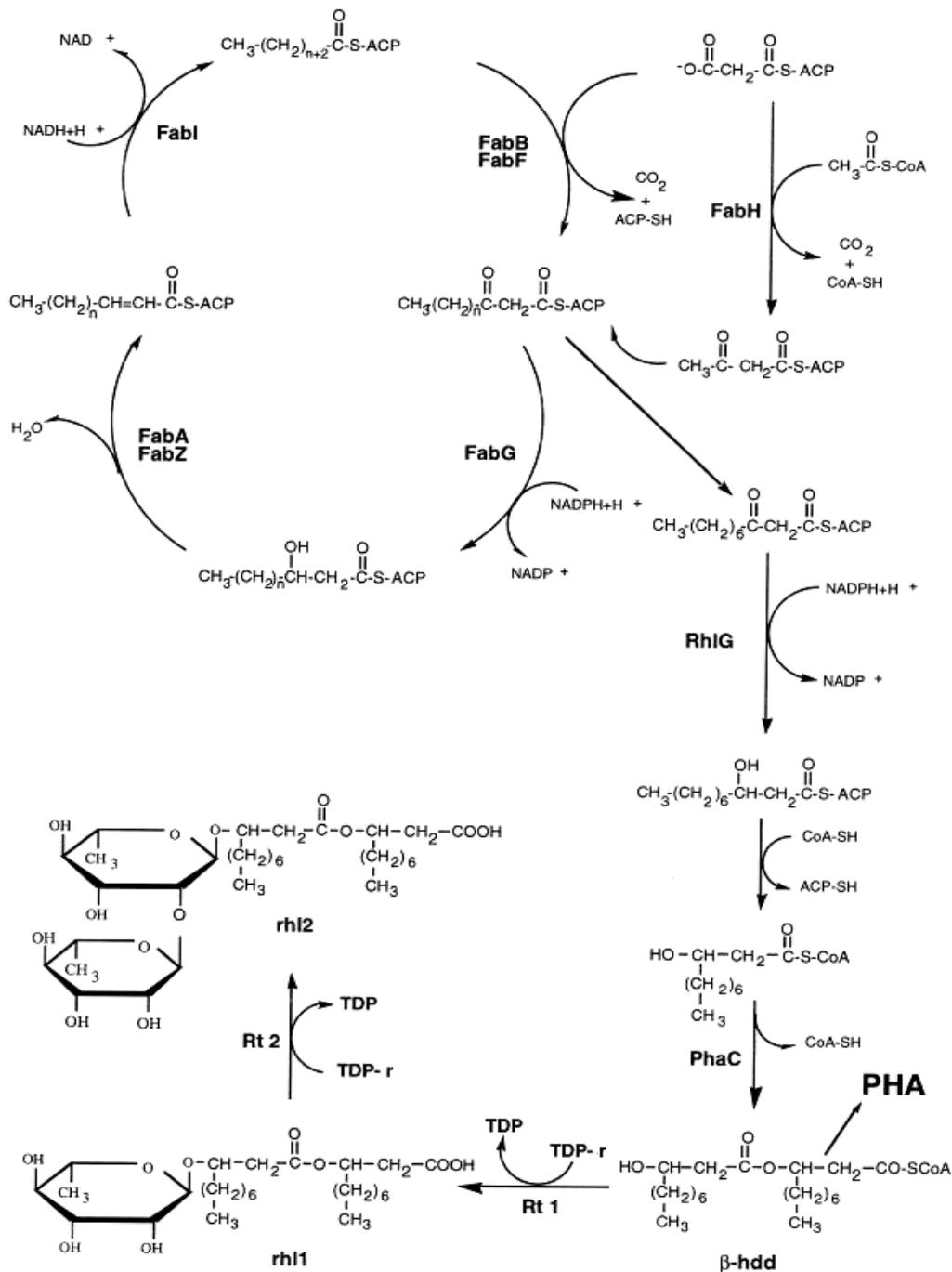


Figura 1.10. Representació esquemàtica de la ruta biosintètica dels àcids grassos mostrant el rol que s'atribueix a la proteïna RhIG en la producció de ramnolípids i PHAs. L'inici del cicle biosintètic dels àcids grassos, catalitzat per FabH, necessita de l'acetil-CoA i del malonil-ACP per tal de formar l'aceto-acetil-ACP. Els cicles consecutius s'inicien per la condensació del malonil-ACP amb l'acil-ACP, catalitzat per FabB i FabF. En el segon pas, el β -cetoéster resultant és reduït a β -hidroxiacil-ACP per FabG. El tercer pas del cicle és catalitzat per FabA o FabZ. El quart i últim pas consisteix en la conversió del *trans*-2-enoil-ACP a acil-ACP, una reacció catalitzada per FabI. **TDP-r**: timidin-difosfo-L-ramnosa; **PhaC**: PHA sintasa; **rhl 1**: mono-ramnolípids; **rhl 2**: di-ramnolípids; **β -hdd**: β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoat (Campos-García *et al.*, 1998).

1.3.5.5. Funció biològica dels Rhls

Igual que en el cas de la resta de tensioactius, és difícil determinar quin paper juguen els ramnolípidis en la fisiologia dels microorganismes que els produeixen. S'ha descrit, en el cas de *Pseudomonas aeruginosa*, que faciliten el seu creixement quan es cultiven en substrats insolubles en aigua com poden ser els n-alcans. En facilitar l'emulsificació del substrat, fan possible la penetració del mateix en el medi cel·lular (Syldatk *et al.*, 1985; Zhang *et al.*, 1992). Tot i així, s'ha comprovat que en substrats solubles en aigua, com la glucosa (Guerra-Santos *et al.*, 1984) o l'etanol (Matsufuji *et al.*, 1997), *P. aeruginosa* és també capaç de sintetitzar ramnolípidis, concretament uns 1,5 g/L i 32 g/L, respectivament.

El rol fisiològic que juguen els ramnolípidis encara no és del tot ben comprès, però han estat considerats com a factors de virulència (Kownatzki *et al.*, 1987) i com a antimicrobians (Abalos *et al.*, 2001), implicats en el desenvolupament de biofilms (Davey *et al.*, 2003), així com, juntament amb els HAAs, considerats imprescindibles pel desplaçament en massa o "swarming" de *P. aeruginosa* (Köhler *et al.*, 2000; Déziel *et al.*, 2003). Aquest "swarming" afavoreix la colonització d'hàbitats naturals *in vivo*, on la biodisponibilitat de nitrogen pot ser un factor limitant (Köhler *et al.*, 2000). Aquesta mobilitat de *P. aeruginosa* se suposa semblant a la de *Myxococcus xanthus*, que secreta un tensioactiu orientat cap a l'extrem oposat a la direcció del moviment, de manera que la diferència de tensió superficial en ambdós costats de la cèl·lula que genera el tensioactiu, impulsa cap endavant el bacteri (Prescott *et al.*, 1999).

Finalment, s'atribueix també als ramnolípidis alguna possible funció lligada als factors de patogenicitat donat que la seva producció està regulada per la RSQ com la de la majoria de factors de virulència (Soberón-Chávez, 2005).

1.3.5.6. Producció de Rhls per *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa és capaç de produir ramnolípidis sota condicions limitants de nutrients, tant en condicions proliferants de cultiu com en condicions no proliferants. S'han estudiat diverses estratègies per incrementar la producció de ramnolípidis com ara el cultiu discontinu (Syldatk *et al.*, 1985a), el cultiu alimentat (Linhardt, 1989), i el cultiu continu reciclant o no les cèl·lules (Reiling *et al.*, 1986).

Quan es treballa amb cèl·lules no proliferants, les cèl·lules no es multipliquen però no perden la capacitat de fer servir la font de carboni per la síntesi de ramnolípidis (entre altres metabòlits secundaris). Per això és necessari

recollir les cèl·lules del cultiu en el moment en que s'inicia la producció de ramnolípid per tal d'immobilitzar-les.

En la síntesi associada a creixement la font de carboni té un paper determinant, i existeix una relació paral·lela entre aquesta, el creixement i la síntesi de ramnolípid. La font de carboni afecta el rendiment cel·lular i en funció de quina sigui, el bacteri creix més o menys i produeix més o menys ramnolípid (Robert *et al.*, 1989). S'ha determinat que la producció de ramnolípid en *Pseudomonas* s'incrementa de manera notable quan el bacteri es troba en condicions limitants d'un o més components del medi com el nitrat (NO_3^-), l'amoni (NH_4^+), ions ferro, calci i magnesi (Fe^{2+} , Ca^{2+} i Mg^{2+}) (Syldatk *et al.*, 1985a).

1.3.5.7. Producció de Rhls a partir de substrats renovables de baix cost

Per tal de desenvolupar un procés de producció microbiana de ramnolípid que sigui viable a nivell econòmic, cal que els nutrients que faci servir el microorganisme siguin econòmics, ja que el cost de la matèria primera pot arribar a representar entre un 10 i un 50% del cost del producte final. Si a més a més es vol un procés ecològicament sostenible, s'ha de buscar la matèria primera en substrats renovables i/o residus d'altres activitats.

S'han fet servir diversos substrats per la producció de ramnolípid per *Pseudomonas aeruginosa*, tant substrats solubles en aigua com ara la glucosa (Babu *et al.*, 1996), l'etanol (Matsufuji *et al.*, 1997), el glicerol (Arino *et al.*, 1996), el manitol (Déziel *et al.*, 1999b), o les melasses residuals del procés d'obtenció de sucre de remolatxa (Patel *et al.*, 1997), com substrats insolubles en aigua com els olis vegetals (Robert *et al.*, 1989; Patel i Desai, 1997; Mata-Sandoval *et al.*, 1999; Chayabruta *et al.*, 2001), els residus oliosos de processos industrials (Mercadé *et al.*, 1997; Haba *et al.*, 2000; Abalos *et al.*, 2001; Benincasa, 2001), i derivats del petroli (Syldatk *et al.*, 1985a; Déziel *et al.*, 1999b).

Els olis vegetals (els més freqüentment emprats) i els residus oliosos en general, afavoreixen l'acumulació d'elevades quantitats de ramnolípid (Mercadé *et al.*, 1993; Sim *et al.*, 1997) així com l'aparició d'una gran varietat de molècules homòlogues de ramnolípid en cultius de *Pseudomonas* (Déziel *et al.*, 1999b; Mata-Sandoval *et al.*, 1999; Abalos *et al.*, 2001), ja que els àcids grassos són incorporats directament pel bacteri en el procés de la β -oxidació, facilitant així la síntesi *de novo* del β -hidroxiàcid (Mata-Sandoval *et al.*, 2000).

L'ús de residus oliosos com a matèria primera de baix cost, no només disminueix els costos de producció fent el procés més rentable i competitiu, sinó que a més a més evita el tractament d'aquests com a residus i minimitza la

contaminació ambiental que de l'abocament continu al medi i acumulació per la seva baixa solubilitat i biodegradabilitat se'n deriva.

1.3.5.8. Aplicacions industrials dels Rhls

Degut al seu caràcter tensioactiu aquests compostos tenen diverses aplicacions potencials industrials i mediambientals. Han estat estudiats per les seves múltiples aplicacions en diversos àmbits per la possible substitució dels tensioactius sintetitzats químicament que s'utilitzen en gran quantitat de processos industrials (Soberón-Chávez *et al.*, 2005).

Els avantatges que aporten els biotensioactius en front als tensioactius de síntesi química son molts: la bidegradabilitat, la baixa toxicitat (en general), la biocompatibilitat i digestibilitat, la seva producció a partir de materials de baix cost, el possible ús en el control ambiental i l'especificitat de la seva funció. Els inconvenients apareixen quan aquests biotensioactius s'apliquen en indústries que fan un ús massiu com la petrolera o en tractaments ambientals per la descontaminació d'àrees contaminades amb olis o metalls tòxics, on el preu no pot ser competitiu. Un altre problema apareix quan indústries com la farmacèutica, cosmètica o alimentària, necessiten el producte purificat, aleshores són necessàries altes concentracions per facilitar la recuperació i la purificació d'aquests compostos.

A nivell industrial, els ramnolípids es poden fer servir per la producció de productes de química fina, elaboració de superfícies i cobertura de superfícies, com additius, per bioremediació per la descontaminació de sòls o aigües, com agents de control biològic, en la indústria de metall, en la paperera, la pintura, la tèxtil, l'alimentària, en la del plàstic i en l'àmbit de la construcció i l'agricultura, entre altres.

1.4. Relació metabòlica entre les vies de biosíntesi dels Rhls i els PHAs

Diversos autors (Campos-García *et al.*, 1998; Rehm *et al.*, 2003, Déziel, 2003) han establert la relació metabòlica entre les vies de biosíntesis dels Rhls i els polihidroxicanoats (PHAs), ja que en ambdues vies es poden utilitzar els mateixos derivats d'àcids grassos com a substrat. L'enzim Rt1 pot fer servir com a substrat tant àcids grassos-ACP (*acyl carrier protein*) com àcids grassos-CoA (coenzim-A) per la producció de mono-Rhls quan la soca creix amb glucosa o àcid oleic com a fonts de carboni (Soberón-Chávez *et al.*, 2005). En canvi, s'ha vist que la PhaC només pot fer servir àcids grassos-CoA com a substrats i per això, quan el bacteri creix amb sucres com a única font de carboni, és necessària l'activitat transacil·lasa,

codificada pel gen *phaG* per a la producció de PHAs (Figura 1.11) (Rhem *et al.*, 1998).

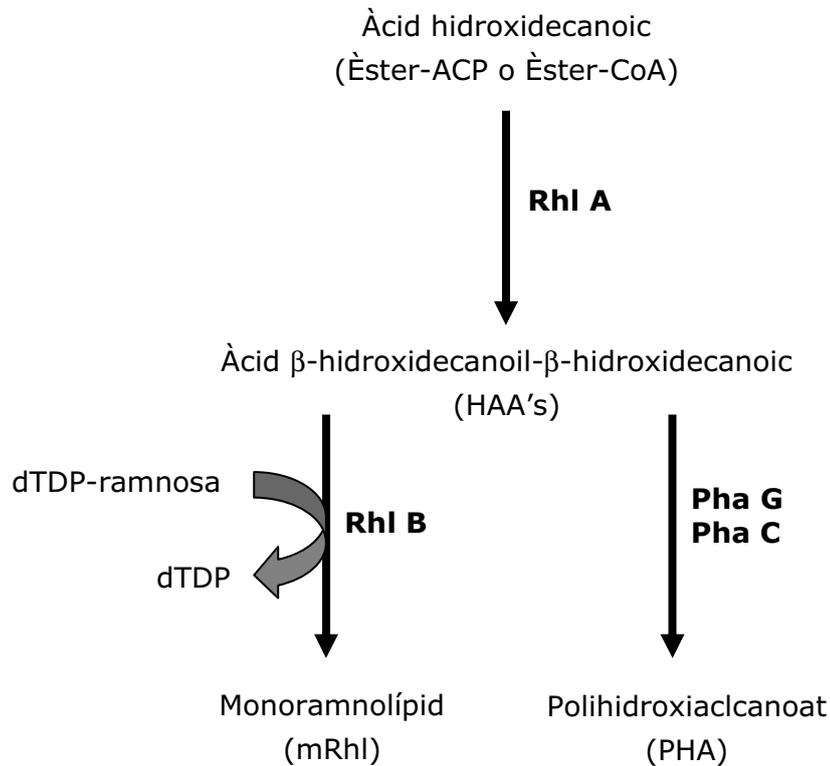


Figura 1.11. Representació esquemàtica del paper proposat per RhlA en la producció de Rhls i PHAs, i de la seva activitat en la síntesi de tensioactius (HAAs) com a substrats comuns per a les dues vies de síntesi (Adaptació de Soberón-Chávez *et al.*, 2005).

Segons resultats obtinguts per Soberón-Chávez i col·laboradors es considera que existeix una relació inversa entre la síntesi de PHAs i de Rhls. Això es deu a que ambdues síntesis competeixen pels àcids grassos precursors i a que Rhl A està involucrat en la síntesi d'un precursor comú per la síntesi de tots dos compostos (Soberón-Chávez *et al.*, 2005). En aquests mateixos estudis s'ha observat que una soca de *P. aeruginosa* mutant pel gen *rhl A*, incapaç de produir Rhls, veu gairebé doblada la seva producció de PHAs. Seria interessant doncs, comprovar que succeeix a la inversa. Potser en generar un mutant per la producció de PHAs la síntesi d'altres compostos del metabolisme lipídic es vegi afectada.

2. OBJECTIUS

2. OBJECTIUS

El present treball s'emmarca dins el projecte d'investigació "Biocatalizadores para la producción de emulsionantes poliméricos: optimización del sistema y desarrollo de nuevos productos, CTQ 2007-60749/PPQ" que té com a objectiu l'estudi de substàncies tensioactives d'origen biològic. En 1989 s'aïllen les soques que s'estudien en aquest treball -*P. aeruginosa* 47T2 i *P. aeruginosa* 42A2 (Robert, 1989)- per la seva capacitat de produir Rhls, la primera i per ser capaç de transformar olis residuals en àcids grassos hidroxilats i polimeritzar-los a estòlids, la segona. Existeixen, per tant, trets diferenciadors a nivell del metabolisme lipídic entre ambdues soques i probablement no només entre elles sinó també amb la soca tipus *P. aeruginosa* PA01 i l'objectiu principal de la tesi és l'estudi d'aquestes diferències. Per això es plantegen els següents objectius:

1. Realització d'un estudi comparatiu del sistema lipolític de la soca *P. aeruginosa* 47T2 amb la soca tipus *P. aeruginosa* PA01.
2. Obtenció de mutants negatius per a la producció de PHAs de *P. aeruginosa* 42A2 i 47T2.
3. Estudi comparatiu dels productes obtinguts a partir de les soques mutants PHAs negatives *P. aeruginosa* 42A2 Δ AD i 47T2 Δ AD i de les soques parentals.
4. Finalment es pretén estudiar les propietats dels Rhls obtinguts a partir del mutant *P. aeruginosa* 47T2 Δ AD, utilitzant com a font de carboni els residus oliosos, una barreja d'olis de fregit de gira-sol i oliva (1:1). La composició del biotensioactiu determina les propietats físico-químiques, que a la seva vegada condicionen les seves possibles aplicacions a nivell industrial. Així l'últim objectiu de la tesi consisteix en la caracterització físicoquímica dels Rhls.

3. MATERIALS I MÈTODES

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1. Microorganismes

En aquest treball s'han fet servir tres soques de *Pseudomonas aeruginosa*:

***Pseudomonas aeruginosa* 47T2** (NCBI 40044): Aïllada a partir d'una mostra de sorres contaminades amb residus oliosos (Robert, 1989). Es manté en medi sòlid d'agar tripticasa de soja (TSA) a 4°C i es ressebra cada quinze dies incubant-la a 30°C durant una nit. S'utilitza per analitzar el seu sistema lipolític i per intentar mutar els gens que codifiquen per la PHA sintasa i d'aquesta manera anul·lar la producció de polihidroxialcanoats (PHAs).

***Pseudomonas aeruginosa* 42A2** (NCBI 40045): Aïllada a partir d'una mostra d'aigües contaminades amb residus oliosos (Robert, 1989). Es manté en medi sòlid d'agar TSA a 4°C i es ressebra cada quinze dies incubant-la a 30°C durant una nit. S'utilitza per intentar mutar els gens que codifiquen per la PHA sintasa i d'aquesta manera anul·lar la producció de PHAs.

***Pseudomonas aeruginosa* PAO1** 208964 (Holloway *et al.* 1979): Es manté en medi sòlid d'agar TSA a 4°C i es resembra cada quinze dies incubant-la a 30°C durant una nit. S'utilitza per l'anàlisi comparativa del seu sistema lipolític amb les soques 47T2 i 42A2.

També s'han utilitzat dues soques d'*Escherichia coli*:

***Escherichia coli* DH5 α** (Hanahan, 1983): F⁻, *gyrA96*, *recA1*, *relA1*, *endA1* *thi-1*, *hsdR17* (r_k⁻ m_k⁺), *glnV44*, *deorD(lacZYA-argF)u169*, [*f80dD(lacZ)M15*]. Es manté en medi agar Luria-Bertani (LB) a 4°C i es ressebra mensualment incubant-la durant una nit a 37°C. S'utilitza com a soca hospedadora per la clonació del fragment AD de *P. aeruginosa* en el vector pEx100Tlink i per la posterior clonació del gen de resistència a gentamicina Gm^r entre A i D, (pEx100TlinkA::Gm::D).

***Escherichia coli* S17.1 λ pyr** (De Lorenzo, 1994): Tp^r Sm^r *recA thi hsdRM*⁺ RP4::2- Tc::Mu::Km, contenint el transposó Tn5 del fag lisogènic λ pyr. Es manté en medi agar LB, afegint al medi una concentració de 50 μ g/mL de kanamicina i es ressebra mensualment incubant-la durant una nit a 37°C. S'utilitza com a soca hospedadora per al vector pEx100TlinkA::Gm::D, i com a soca donadora durant la conjugació amb *Pseudomonas aeruginosa* per poder originar mutacions per recombinació.

3.2. Medis de cultiu

Els medis de cultiu utilitzats per l'aïllament, selecció i manteniment de les diferents soques i dels clons recombinants són:

Medi Trypticase de Soja amb Agar (TSA). La seva composició per litre és: 15g de peptona de caseïna, 5g de peptona de soja, 5g de clorur sòdic i 20g d'agar (Adsa, Espanya).

Per la selecció, cultiu i manteniment de les soques d'*Escherichia coli* i els clons transformants d'*Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* s'utilitza:

Medi Luria-Bertani (LB, Sambrook et al., 1989). La seva composició per litre és: 10g de bactotripton (Scharlau-Microbiology, Espanya), 5g d'extracte de llevat (Scharlau-Microbiology, Espanya) i 10g de NaCl (Panreac, Espanya). El pH s'ajusta a 7,5. En placa s'hi afegixen a més a més 20g d'agar.

Medi Brou Trypticase de Soja (TSB). La seva composició per litre és: 15g de peptona de caseïna, 5g de peptona de soja i 5g de NaCl (Panreac, Espanya).

Per estimular la producció de PHAs en *Pseudomonas sp.* s'utilitza:

Medi Mínim Mineral (MM). La seva composició en grams per litre és: NaNO_3 , 3,5; $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ (2:1 m/m), 1; CaCl_2 , 0,01; KCl, 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,012 i 0,05 mL/L d'una dissolució d'oligoelements de composició (g/L): H_3BO_3 0,26, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,5, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,5, $\text{MoNa}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,06, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,7. Per últim, com a font de carboni s'utilitzen 50g/L d'oli de fregit (barreja oliva/gira-sol, 50/50 v/v). Els components del medi s'esterilitzen per separat a 121°C, 1 atm, durant 20 minuts a l'autoclau. El pH inicial del medi s'ajusta a 6.8. Per la preparació de les plaques s'addicionen 20g d'agar i 0,1% de Tween 80, amb l'objectiu d'emulsionar l'oli i permetre la seva correcta distribució a les plaques.

Per tal de detectar i seleccionar els possibles mutants per la producció de PHAs obtinguts per mutagènesi aleatòria de *P. aeruginosa* 47T2 i 42A2 es proven els següents medis:

Medi Trypticase de Soja Agar amb Roig Nil (TSA/RN). La seva composició és igual a la del TSA afegint 2 mL/L de Roig Nil (*Red Nile*, Sigma, EEUU) a partir d'una dissolució concentrada de 0,25 mg RN/mL en DMSO (dimetilsulfòxid, Sigma, EEUU).

Medi Mínim Mineral amb Roig Nil (MM/RN). La seva composició és igual a la del MM afegint 2 mL/L de Roig Nil (*Red Nile*, Sigma, EEUU) a partir d'una dissolució concentrada de 0,25 mg RN/mL en DMSO (dimetilsulfòxid, Sigma, EEUU).

Per la preparació de les plaques s'addicionen 20g d'agar i 0,1% de Tween 80, amb l'objectiu d'emulsionar l'oli i permetre la seva correcta distribució a les plaques.

Per tal d'incubar les cèl·lules transformades de *P. aeruginosa* i permetre així l'expressió dels gens de resistència als antibiòtics codificats pel plasmidi introduït, es fa servir el següent medi ric:

Medi SOC (Hanahan *et al.*, 1991). La seva composició per litre és: 20g de bactotripton, 5g d'extracte de llevat, 0,58g de NaCl, 0,19g de KCl, 2,03g de MgCl₂, 2,46g de MgSO₄ i 3,6g de glucosa. Els components del medi s'esterilitzen a l'autoclau excepte la glucosa, que es prepara en una dissolució al 20% i es filtra, i les dissolucions de MgCl₂ i de MgSO₄, que es preparen i s'esterilitzen per separat.

Tots els medis es preparen amb H₂O destil·lada i s'esterilitzen mitjançant calor humida i pressió a l'autoclau a 121°C i 1 atmosfera de pressió durant 20 minuts. Les dissolucions que no poden ser tractades per aquest mètode d'esterilització són sotmeses a esterilització per filtració mitjançant filtres de cel·lulosa (MF-Millipore) de 0,22µm de diàmetre de porus. El pH s'ajusta amb NaOH (Panreac, Espanya) o HCl (Panreac, Espanya). En ocasions aquests medis es solidifiquen mitjançant l'addició d'agar bacteriològic (Sharlau-Microbiology, Espanya) a una concentració final d'1,5%.

Per a la selecció i/o manteniment dels clons recombinants d'*E. coli* o *P. aeruginosa*, els medis de cultiu es complementen amb diferents antibiòtics o suplementos:

Ampicil·lina (Amp) (Sigma, EEUU). Es prepara una dissolució concentrada d'ampicil·lina a una concentració de 100 mg/mL en aigua destil·lada, essent necessària l'addició de NaOH per aconseguir-ne la completa dissolució. La dissolució d'antibiòtic s'esterilitza per filtració i s'addiciona als medis de cultiu a una concentració final de 50-100 µg/mL, depenent de les característiques i nombre de còpies del vector utilitzat. Es conserva a -20°C.

Cloramfenicol (Cm) (Sigma, EEUU). Es prepara una dissolució concentrada de cloramfenicol a una concentració de 100 mg/ml en etanol absolut. La dissolució d'antibiòtic s'esterilitza per filtració i la concentració de treball habitual és de 50 µg/mL. Es conserva a -20°C.

Tetraciclina (Tc) (Sigma, EEUU). Es prepara una dissolució concentrada de 12,5 mg/ml en etanol 50 %. La dissolució d'antibiòtic s'esterilitza per filtració i la concentració de treball habitual és de 300-400 µg/ml. Es conserva a -20°C protegida de la llum.

Estreptomina (Sm) (Sigma, EEUU). Es prepara una dissolució concentrada d'estreptomina a una concentració de 100 mg/ml en aigua destil·lada. La dissolució d'antibiòtic s'esterilitza per filtració i s'utilitza a una concentració de treball habitual de 200 µg/ml. Es conserva a -20°C.

Gentamicina (Gm) (Sigma, EEUU). Es preparen dues dissolucions concentrades diferents de gentamicina, una a 100 mg/mL i una altra a una concentració de 350 mg/mL en aigua destil·lada. Cada dissolució d'antibiòtic s'esterilitza per filtració i s'utilitza a una concentració de treball habitual de 10 µg/mL per *E. coli* i de 350 µg/mL per *P. aeruginosa*. Es conserva a -20°C.

Sacarosa: s'addiciona als medis de cultiu per provocar la segregació del plasmidi suïcida pEx100A:Gm:D en els mutants de *P. aeruginosa* defectius per la producció de PHAs. Es suplementa el medi amb un 5% de sacarosa.

Per a la selecció de clons recombinants d'*E. coli* mitjançant el sistema de l' α -complementació (Sambrook *et al.*, 1989), els medis es suplementen amb isopropil- β -tiogalactopiranosid (IPTG, Boehringer Mannheim) i 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosid (X-gal, Boehringer Mannheim).

IPTG: Es prepara una dissolució concentrada d'IPTG (Sigma, EEUU) en aigua destil·lada a una concentració de 200 mg/mL i s'utilitza a una concentració final de 100 µg/mL.

X-gal: Es prepara una concentració de 20 mg/mL (Sigma, EEUU) en dimetilformamida (Sigma, EEUU) i s'utilitza a una concentració final de 40 µg/mL.

3.3. Mètodes microbiològics

3.3.1. Inòcul dels cultius

Per l'obtenció de cultius de les soques, es realitzen inòculs al 2% (v/v) a partir d'una suspensió bacteriana en clorur sòdic 0,9% provinent del creixement en plaques d'agar TSA. S'utilitzen suspensions bacterianes d'aproximadament 2.0 unitats d'absorbància, mesurada a una longitud d'ona de 540 nm (Guerrero *et al.*, 1997). Per fer el registre de l'absorbància s'utilitza l'espectrofotòmetre PharmaSpec UV-1700 (Shimadzu, Japó).

3.3.2. Conservació de microorganismes

A més a més del manteniment periòdic en placa de les soques utilitzades en aquest treball, també es mantenen congelades a -80°C en glicerol al 20% (v/v) a

partir d'un cultiu d'una nit amb medi TSB o LB suplementat amb antibiòtic en cas de ser necessari.

3.4. Plasmidis de clonació i/o d'expressió

En aquest treball s'han fet servir els següents plasmidis:

Taula 3.1. Plasmidis emprats en aquest treball.

Plasmidi	Kb	Principals Característiques	Hospedadors	Referència
pGEM[®]-T	3,0	Vector de clonació Ap ^R , <i>lacZ</i> , <i>lacI</i> , linial amb dos extrems poli T per clonar productes d'amplificació amb <i>taq</i> -polimerasa	<i>E. coli</i>	Promega (Espanya), 1999
pGEM-TAD	4,3	Ap ^R , <i>lacZ</i> , <i>lacI</i> ; inclou el fragment amplificat AD entre els seus extrems poli T	<i>E. coli</i>	Aquest treball
pUT-Mini-Tn5	-	pUT-Cm, pUT-Sm i pUT-Tc, transposó mini-Tn5 Cm ^R , Sm ^R i Tc ^R , respectivament	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i>	De Lorenzo, 1990
pUCGm/<i>lox</i>	3,7	Ap ^R , Gm ^R , vector basat en el pUC18 que conté els elements <i>lox</i> flanquejant el gen <i>aacC1</i>	<i>E. coli</i>	Quénéée <i>et al.</i> , 2005
pEx100<i>link</i>	6,2	Ap ^R , vector basat en el pUC19 per substituir gens de pEX100T amb un MCS	<i>E. coli</i>	Quénéée <i>et al.</i> , 2005
pEx100TAD	7,6	Ap ^R , vector pEx100 <i>link</i> al qual se li ha introduït en el MCS el fragment amplificat AD	<i>E. coli</i>	Aquest treball
pEx100TAGmD	8,4	Ap ^R , Gm ^R , vector pEx100TAD que conté el gen <i>aacC1</i> flanquejat pels elements <i>lox</i> (Gm/ <i>lox</i>) entre A i D	<i>E. coli</i>	Aquest treball
pCM157	7,9	Tc ^R , <i>cre</i> , vector d'expressió de la recombinasa Cre per l'eliminació d'insercions entre els elements <i>lox</i>	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Marx <i>et al.</i> , 2002

3.5. Mètodes de manipulació d'àcids nucleics

3.5.1. Aïllament i purificació de l'ADN

L'aïllament de l'ADN genòmic de *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 i 42A2 s'ha realitzat seguint el protocol descrit per Kiu *et al.* (2000), basat en una lisi combinada amb SDS i EDTA a 75°C, una extracció orgànica amb fenol-cloroform i precipitació amb isopropanol.

La purificació de l'ADN plasmídic s'ha realitzat mitjançant una lisi alcalina tal com descriu Sambrook *et al.* (1989). En el cas que es volgués obtenir ADN plasmídic en grans quantitats i més pur, com per exemple per seqüenciar, s'han utilitzat columnes comercials Qiagen-tip 100 MidiPrep (Qiagen, Alemanya). Aquest mètode consisteix en una modificació del procés de lisi alcalina, seguida de la unió del DNA plasmídic a una reïna d'intercanvi aniònic de Qiagen (Alemanya) en condicions de baixa concentració de sals i pH àcid. Per utilitzar aquest protocol es segueixen detalladament les instruccions que ofereix la casa comercial.

3.5.2. Amplificació d'ADN mitjançant PCR

Amb l'objectiu de sintetitzar ADN *in vitro*, s'utilitza el mètode de reacció en cadena de la polimerasa (PCR, Mullis *et al.*, 1986). Les reaccions d'amplificació s'han realitzat amb dos tipus de polimerases termoestables seguint les recomanacions de la casa comercial en ambdós casos: per una banda s'ha utilitzat la polimerasa *Pfu* (Stratagene, EEUU) d'alta fidelitat i que genera extrems roms, i d'altra la polimerasa *Taq* (Invitrogen, EEUU), que pot introduir una mutació (la substitució d'una base) cada 900 parells de bases sintetitzades (Tindall *et al.*, 1988) i que genera extrems protuberants de poli-A. Les reaccions es realitzen en un termociclador GeneAMP PCR System 2400 (Perkin Elmer, EEUU). Les barreges de reacció que es fan servir per amplificar s'especifiquen a la taula 3.2.

Taula 3.2. Barreges de les reaccions d'amplificació típiques.

Barreges de reacció:	
1 µl Taq Polimerasa (1U/µL)	0,5 µl Pfu Polimerasa (2'5 U/µL)
5 µl Tampó d'amplificació 10X	5 µl Tampó d'amplificació 10X
4 µl dNTPs (2,5 mM cada uno)	4 µl dNTPs (2,5 mM cada un)
X µl de ADN motlle	X µl de ADN motlle
12 pmols d'encebador/s	12 pmols d'encebador/s
H ₂ O bidestil·lada fins 50 µl	H ₂ O bidestil·lada fins 50 µl

L'ADN motlle consisteix en ADN genòmic purificat i dissolt en H₂O bidestil·lada, tot i que en ocasions la reacció d'amplificació es realitza directament a partir d'una suspensió de cèl·lules en H₂O bidestil·lada (PCR colonial). En aquests casos, la suspensió cel·lular es prepara per resuspensió de tres colònies en 15µl d'aigua bidestil·lada.

El programa d'amplificació que s'ha fet servir habitualment és el que es mostra a la taula 3.3. La temperatura òptima es tria en funció de la temperatura de fusió dels dos encebadors.

Taula 3.3. Programa d'amplificació d'ADN.

Reacció d'amplificació	
x 1 cicle:	94°C durant 5 minuts Temperatura d'hibridació (°C) durant 40 s 72°C durant 4 minuts
x 30 cicles:	94°C durant 30 s Temperatura d'hibridació (°C) durant 40 s 72°C durant 4 minuts
x 1 <i>hold</i> :	72°C durant 5 minuts 4°C ∞

En alguns casos s'ha fet servir el sistema de *Hot Start* en la reacció d'amplificació per evitar unions inespecífiques de la polimerasa amb l'ADN motlle en el moment de la preparació de la barreja de reacció a temperatura ambient. Aquest *Hot Start* consisteix en afegir la *Pfu* o la *Taq* quan han passat dos minuts del primer cicle de reacció d'amplificació (a 94°C). El programa es manté en pausa mentre s'afegeix la polimerasa a la reacció, continuant després el cicle en el moment just on s'havia aturat.

3.5.3. Electroforesi en gels d'agarosa

Les preparacions d'ADN plasmídic i els productes de PCR obtinguts s'han analitzat en gels d'agarosa (Low EEO, Conda, Espanya) en tampó TBE 1X o en tampó TAE 1X per aquelles mostres en que posteriorment fos necessari recuperar l'ADN analitzat. L'agarosa es prepara prèviament a una concentració d'entre 0.8% i 2% en el tampó corresponent, en funció de la mida dels fragments d'ADN a analitzar. A les mostres se'ls hi afegeix tampó de càrrega 6X (Sambroock *et al.*, 1989) i a continuació es porta a terme la separació electroforètica en una cubeta horitzontal Bio-Rad Mini-Sub[®]Cell GT, aplicant un voltatge de 100 volts amb una font d'alimentació PAC300 (Bio-Rad, EEUU). Es segueix sempre el protocol d'electroforesi descrit per Sambroock *et al.* (1989).

Un cop realitzada l'electroforesi, per visualitzar els fragments d'ADN separats, els gels d'agarosa es submergeixen durant 15 minuts en una dissolució de bromur d'etidi (Sigma, EEUU) preparada a 0,75 µg/ml en H₂O destil·lada. Passat

aquest temps, mitjançant la llum ultraviolada d'un sistema d'ImageMaster® (Pharmacia Biotech, Suïssa), es poden observar els fragments d'ADN gràcies a la capacitat del bromur d'etidi d'intercalar-se entre les bases de l'àcid nucleic i emetre fluorescència en ser irradiat amb llum UV.

Com a marcador de pes molecular, s'utilitza la barreja de fragments resultants de la digestió de l'ADN del bacteriòfag lambda amb *HindIII* (Promega, Alemanya), que cobreix el rang entre 23 i 0,5 kb. Quan els fragments d'ADN a valorar són més petits, s'utilitza com a marcador la barreja de fragments procedents de la digestió d'ADN del fag ϕ X174 amb *HaeIII* (Promega, Alemanya), que cobreix un rang entre 1,35 i 0,0072 kb, o la barreja de fragments procedents de la digestió del plasmidi pMXL amb *Eco147I* i *PvuI* (Biotools, Espanya), que cobreix un rang entre 1,0 i 0,008 kb.

3.5.4. Purificació de fragments d'ADN separats per electroforesi

A partir dels fragments d'ADN separats mitjançant electroforesi en gels d'agarosa en tampó TAE 1X i tenyits amb bromur d'etidi, les bandes d'interès es localitzen gràcies a una làmpada de llum ultraviolada de longitud d'ona llarga (Làmpada Black-Ray, $\lambda=366$ nm). Amb un bisturí es retallen les porcions d'agarosa que contenen els fragments d'ADN que es vulguin purificar. Posteriorment, fent servir el kit comercial QIAquick (Qiagen, EEUU) s'extreu l'ADN de l'agarosa. Aquest kit es basa en la unió de l'ADN a una membrana de silicagel continguda en una columna, mentre que els components residuals de la mostra són eluïts. S'utilitza seguint detalladament les instruccions que la casa comercial ofereix.

3.5.5. Seqüenciació d'ADN

Per tal d'obtenir les seqüències de nucleòtids dels fragments d'ADN aïllats es segueix el mètode de Sanger et al. (1977), basat en la síntesi i terminació amb dideoxinucleòtids, realitzada mitjançant amplificació per PCR. S'utilitza un kit de seqüenciació automàtica BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems, EEUU), que conté la polimerasa termostable, els dideoxinucleòtids marcats amb rodamina, i el tampó adequat. En cada cas es segueixen les instruccions de la casa comercial. Les quantitats d'ADN varien en funció del material que es vulgui seqüenciar, així com la composició de la barreja de reacció (ADN motlle) i la temperatura d'hibridació del programa (Taules 3.4 i 3.5).

Un cop acabada la reacció de seqüenciació són els Serveis Científic-Tècnics els que s'encarreguen de la purificació i precipitació de l'ADN, i la seqüència de

nucleòtids s'obté mitjançant el sistema analític CEQ™ 8000 dels Serveis Científic-Tècnics de la Universitat de Barcelona amb el seqüenciador ABI Prism® DNA377 (Perkin Elmer, EEUU).

Taula 3.4. Composició de la barreja de reacció emprada.

Barreja de la reacció de seqüenciació	
-	1 µl de <i>Ready reaction mix</i>
-	1 µl Tampó Big Dye® 10X
-	X µl de ADN
-	3,2 pmols d'encebador <i>forward</i> o <i>backward</i>
-	H ₂ O fins enrasar a un volum final de 10 µl

Taula 3.5. Programa de seqüenciació emprat.

Programa de seqüenciació	
x 1 cicle:	94°C durant 1 minuts
x 25 cicles:	96°C durant 30 s
	Temperatura d'hibridació (°C) durant 15 s
	60°C durant 4 minuts
x 1 <i>hold</i> :	4°C ∞

3.5.6. Tractaments enzimàtics

Tots els tractaments enzimàtics s'han dut a terme seguint les indicacions de temps, temperatura i volums requerits que ens ofereixen les mateixes cases comercials que ens subministren els enzims.

3.5.6.1. Digestions amb enzims de restricció

Per fragmentar l'ADN o linealitzar els vectors a utilitzar, es realitzen digestions amb enzims de restricció, en diferents volums de reacció. Quan es volen obtenir grans quantitats de material digerit per treballar amb ell posteriorment, es realitzen digestions preparatives en un volum total de reacció de 30 a 60 µL. Però, en cas de voler únicament confirmar la presència d'un fragment d'ADN mitjançant restricció enzimàtica, es fa servir un volum total de reacció de 15 µL. Els enzims de

restricció i els seus respectius tampons van ser subministrats fonamentalment per Roche (Suïssa) o BioLabs (EEUU). En el cas de les digestions dobles, s'utilitza el tampó més adient pels dos enzims o bé es realitzen dues digestions de manera seqüencial, amb un pas entremig de precipitació d'ADN, per tal de canviar les condicions de la digestió. Totes les digestions s'incuben entre 3 i 16 hores a la temperatura recomanada per cada enzim.

3.5.6.2. Tractaments amb RNAsa

En alguns casos, la purificació d'ADN plasmídic arrossega grans quantitats d'ARN que poden interferir en l'observació de les bandes d'ADN separades en els gels d'agarosa. Amb la finalitat de facilitar la visualització de fragments d'ADN, s'afegeix RNAsa (Roche, Suïssa) a una concentració final de 50 µg/ml directament a les mostres preparades per a ser carregades en els gels d'agarosa.

3.5.6.3. Lligacions de molècules d'ADN

Per a la lligació de molècules d'ADN s'utilitza la lligasa del bacteriòfag T4 (BioLabs, EEUU). Les proporcions entre la quantitat d'ADN del vector i ADN de l'insert són generalment de 1:3 si les lligacions són entre extrems cohesius, o de 1:6 si són entre fragments d'ADN d'extrems roms. Les reaccions entre extrems cohesius s'incuben a 15°C durant 16h, mentre que les lligacions entre extrems roms es realitzen durant tota la nit a 4°C.

3.5.7. Sistemes de transferència de material genètic

3.5.7.1. Transformació d'*E. coli*

Amb l'objectiu de transformar *Escherichia coli*, de forma rutinària s'utilitza el mètode descrit per Cohen *et al.* (1972) per fer competents les cèl·lules que de manera natural no són capaces de captar molècules d'ADN. Per això les cèl·lules són sotmeses a un tractament de xoc tèrmic i estrès per clorur càlcic (CaCl₂ 50 mM) per tal d'augmentar la permeabilitat de les seves membranes a l'ADN. En alguns casos, es guarden aquestes cèl·lules competents a -80°C per tal de fer-les servir en les setmanes següents o fins i tot en el mes següent. En aquests casos, es necessari afegir a la dissolució de CaCl₂ un 15% de glicerol com a agent crioprotector de les cèl·lules.

Un cop obtingudes les cèl·lules competents es procedeix a la seva transformació (Griffith, 1928) amb ADN (5ng/ μ L) mitjançant el mètode de xoc tèrmic: primer la barreja de cèl·lules competents i l'ADN són sotmesos a 42°C durant 1 minut (moment en el qual les cèl·lules capten l'ADN) i seguidament s'incuben en gel uns minuts. A continuació s'afegeix 1 mL de LB i la suspensió cel·lular s'incuba a 37°C en agitació durant una hora, amb la finalitat de que les cèl·lules es recuperin i de permetre l'expressió dels marcadors de resistència a antibiòtics dels vectors introduïts. A continuació les cèl·lules transformades es sembren en plaques d'agar LB suplementades amb els antibiòtics adequats per la selecció dels transformants, i s'incuben a 30°C o 37°C tota la nit.

3.5.7.2. Conjugació d'*E. coli* amb *P. aeruginosa*

La conjugació consisteix en la transferència d'informació genètica entre dos bacteris que estableixen un contacte íntim mitjançant un pont intracel·lular propiciat pels *pili*. Aquest procés es realitza mitjançant plasmidis conjugatius que poden codificar la capacitat d'autotransferir-se a una altra cèl·lula. A través de la conjugació s'han transmès molts gens entre bacteris Gram negatius com enterobacteris, *Pseudomonas* i també entre espècies anaeròbies de bacteris Gram positius. És freqüent també la transferència d'ADN de bacteris Gram positius a Gram negatius, però no a l'inrevés (Lederberg i Tatum, 1946).

3.5.7.2.1. Conjugació d'*E. coli* S17.1 λ *pyr* amb *P. aeruginosa* 47T2 i 42A2

En aquest treball s'utilitza la conjugació en medi sòlid per realitzar la mutagènesi amb el plasmidi pUTmini-*Tn5*, segons el protocol descrit per De Lorenzo i col·laboradors (1990).

La conjugació es va realitzar a partir d'un cultiu de tota la nit de la soca donadora i un altre de la receptora mantingudes en agitació constant i normalment crescudes sense antibiòtics. En cas que hagin crescut amb antibiòtics, cal rentar les cèl·lules prèviament per eliminar-los. Això es fa mitjançant centrifugació dels cultius (3.000 *xg*, 10 minuts) i resuspensió de les cèl·lules en LB, repetint aquest rentat 3 vegades per eliminar totalment els antibiòtics del medi.

A partir dels cultius lliures d'antibiòtics, es barregen 100 μ l de la soca donadora i 100 μ l de la soca receptora en 5 ml de MgSO₄ 10 mM i la barreja es filtra a través de membranes d'un diàmetre de porus de 0,45 μ m (Millipore, EEUU). La membrana amb les cèl·lules retingudes es col·loca en una placa de LB amb les cèl·lules mirant cap a la part superior i s'incuben durant 8 h a 37°C. El creixement

obtingut sobre el filtre es resuspèn en 5 ml de MgSO₄ 10 mM i es sembra en plaques de LB suplementades amb els antibiòtics corresponents a la resistència del marcador de la soca receptora i del plasmidi conjugatiu. Les plaques s'incuben durant 18-24 hores a 37°C.

3.5.7.2.2. Conjugació d'*E. coli* S17.1 pEX100TAGmD amb *P. aeruginosa* 47T2 i 42A2

Es pretén transferir el plasmidi pEx100*link*AGmD des d'*E. coli* S17.1 a *P. aeruginosa* 42A2 i 47T2 per conjugació (Quénée *et al.*, 2005). El primer pas és la preparació d'un pre-inòcul, un cultiu d'una nit d'uns 5 mL en agitació constant en medi LB de cada una de les soques en medi líquid LB. En el cas d'*E. coli* S17.1 pEx100*link*AGmD el medi LB es suplementa amb ampil·lina (Amp) 100 µg/mL.

Abans de barrejar els cultius per la conjugació cal eliminar l'antibiòtic del medi; per això centrifuguem els 5 mL de cultiu d'*E. coli* S17.1 pEx100*link*AGmD en LB 100 Amp i les cèl·lules es resuspèn en 50 µL de LB estèril fresc, de manera que es concentren les cèl·lules. Seguidament, 50 µL d'aquesta suspensió es barregen en un tub de 1,5 mL amb 50 µL del pre-inòcul de *P. aeruginosa* 42A2 o 47T2. Aquesta barreja de 100 µL es sembra en el centre d'una placa de LB intentant moure-la el mínim possible per tal que quedin en contacte les cèl·lules d'*E. coli* i les de *P. aeruginosa* i s'incuba a 30°C durant una nit.

Després d'una nit, es recull tot el creixement conjunt i es resuspèn en 500 µL de LB estèril o de Ringer ¼ (Scharlau, Espanya) estèril i es sembren alíquotes de 100 µL en plaques de LB amb l'antibiòtic corresponent per seleccionar les cèl·lules de *P. aeruginosa* transconjugants i alhora recombinants ja que el vector pEx100*link*AGmD no pot replicar-se a *Pseudomonas*. L'antibiòtic de selecció és la gentamicina (Gm), a una concentració de 350 µL/mL.

3.5.7.3. Electroporació de *Pseudomonas*

Donat que els mètodes químics no són massa efectius, per tal de transformar *Pseudomonas* s'ha fet servir l'electroporació, una tècnica que permet la captació d'ADN per part de la soca mitjançant la permeabilització de les membranes, provocada per una descàrrega elèctrica. El protocol que s'ha seguit en aquest treball és una adaptació dels protocols descrits per Smith i Iglewsky, (1989) i per Solaiman (1998).

A partir d'un cultiu d'una nit de la soca a transformar, es realitza un inòcul 1/25 en 50 ml de LB fresc. Es deixa incubant a 30°C durant aproximadament 1

hora o 1,5 hores, es recullen 50 ml del cultiu i es centrifuguen durant 10 minuts a 3000 xg i a 4°C. Es decanta tot el medi de cultiu i es resuspèn el sediment de cèl·lules en 10 ml d'una dissolució de sacarosa 0,3 M a 4°C. Tot seguit es realitzen una sèrie de rentats centrifugant repetides vegades a 3000xg durant 10 minuts a 4°C, i resuspènent successivament en 0,2, 0,1, 0,05, 0,02, 0,01 i $5 \cdot 10^{-3}$ volums de sacarosa 0,3 M mantinguda a 4°C. A continuació, es barregen 50 µl d'aquesta suspensió cel·lular amb 0,5-3 µl de la suspensió d'ADN que es vol incorporar, i es deixa reposar uns minuts en gel. Posteriorment, aquesta barreja es transfereix a cubetes d'electroporació (prèviament mantingudes en gel) de 1 mm de separació entre els elèctrodes (Eppendorf®, Alemanya). Finalment es procedeix a l'electroporació utilitzant l'aparell Electroporator 2510 (Eppendorf®, Alemanya), seguint les condicions que es detallen en la taula 3.6.

Taula 3.6 Condicions d'electroporació de cèl·lules de *Pseudomonas*

Condicions d'electroporació
- Temperatura 4°C
- Força del camp elèctric aplicat 10 kV/cm (màxim)
- Voltatge de la descàrrega 2 kV
- Resistència R5 (129Ω)
- Duració del pols 5 ms

Un cop realitzada la descàrrega elèctrica, s'afegeix 1 ml del medi SOC (Hanahan *et al.*, 1991) prèviament incubat a 30°C, i es barreja suaument amb l'ajut de la micropipeta varies vegades per tal de recollir totes les cèl·lules electroporades. Tot seguit, la barreja es deixa incubant durant 2 hores a 30°C per tal de permetre l'expressió dels gens de resistència als antibiòtics codificats pel plasmidi introduït. Finalment, les cèl·lules electroporades es sembren en medi sòlid suplementat amb els antibiòtics de selecció adients i s'incuben durant una nit a 30°C.

3.5.8. Mètodes bioinformàtics

3.5.8.1. Anàlisi de les seqüències

Actualment hi ha diversos mètodes per comparar i alinear seqüències. Els mètodes formals permeten fer cerques complexes per determinar coincidències exactes, multiplicitats, insercions i delecions, però comporten més temps per la

seva realització. D'altra banda, utilitzar mètodes aproximatiu possibilita igualment aquestes determinacions però no garanteix trobar les millors comparacions i es poden obviar algunes similituds significatives.

En aquest treball, l'anàlisi d'homologia/identitat de les seqüències de nucleòtids obtingudes per seqüenciació respecte a altres seqüències prèviament conegudes, s'ha dut a terme *on line* mitjançant el sistema BLAST (*Basic Local Alignment Tool*) de l'NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (Altschul *et al.*, 1997; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). D'altra banda, l'alineament de seqüències homòlogues s'ha fet utilitzant el programa ClustalW MultalignX (Higgins *et al.*, 1994; <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>).

També s'ha fet servir el programa BioEdit v.5.0.9 (Hall, 1999) per fer diferents anàlisis de les seqüències obtingudes com la localització de pautes de lectura oberta o trobar patrons de restricció, entre altres.

3.5.8.2. Disseny d'oligonucleòtids

El disseny dels oligonucleòtids utilitzats com a encebadors per l'amplificació de fragments d'ADN s'ha portat a terme mitjançant el programa *Oligo Primer Analysis Software* v.6.31 (Wojciech & Rychlik, 1989-2000). Aquest calcula les temperatures de desnaturalització (T_m) i el percentatge d'obtenció de falsos positius, de formació de dímers, de zones d'autohibridació (*hairpins*) i l'energia lliure de cada un dels encebadors utilitzats (Taula 3.7).

Taula 3.7. Encebadors utilitzats en aquest treball.

Nom	Seqüència
(A) U58	5' GCGAATTCGATGAGTCAGAAGAAC 3'
(B) L555 BamHI	5' CCGATCC TGTCTACAGTAGCTCGTTGTTACCAGGTCCTTG 3'
(C) U3973 BamHI	5' ACCAACTGTAGACA GGATCC GGCCGGCAACTGCGCAAGGTCAG 3'
(D) L4730	5' GGCCGAAGCTTTCAGCGTATATGC 3'
(E) U11	5' CTTCGTCTCCGACCATC 3'
(F) L823	5' GGAACGGACGAGGGTGCAT 3'

Els oligonucleòtids s'han dissenyat a partir de zones d'homologia a extrems dels gens codificants per la PHA sintasa i a zones internes per crear la mutació, sempre prenent com a referència el genoma seqüenciat de la soca tipus *P. aeruginosa* PAO1.

3.5.9. Mètodes de mutagènesi

3.5.9.1. Mutagènesi aleatòria

S'han utilitzat dues metodologies de mutagènesi aleatòria tot fent servir el mateix mètode de contraselecció dels mutants: la mutagènesi per irradiació amb llum ultraviolada i la mutagènesi per transposició.

3.5.9.1.1. Mutagènesi per exposició controlada a llum ultraviolada

Aquesta metodologia consisteix en irradiar amb llum ultraviolada una suspensió cel·lular bacteriana diluïda en un tampó transparent (Ringer ¼ en el nostre cas) per tal d'evitar protecció a la llum UV per elevada densitat cel·lular o pel fet que algun nutrient absorbeixi part de les radiacions (Gerhardt *et al.*, 1994). Les cèl·lules han de provenir d'un cultiu de 16 h crescut en medi ric com l'LB fins arribar a la fase estacionària ($2 \cdot 10^9$ - $5 \cdot 10^9$ cèls/mL), moment en que es dilueixen 100 vegades en un brou fresc i es deixen créixer fins a una densitat de $2 \cdot 10^8$ cèls/mL. Aquestes cèl·lules bacterianes es renten per centrifugació i es resuspenen en el tampó Ringer ¼ mantenint la mateixa concentració cel·lular. A continuació, 5 mL de la suspensió cel·lular es dipositen en una placa de Petri de vidre de 100 mm de diàmetre, es col·loquen les plaques sense tapa en un agitador KS125 basic (IKALabortchnik, Alemanya) i es realitzen les irradiacions curtes amb una làmpada UV de 15W VL-6.M (Fisher Bioblock Scientific, Espanya) a una distància de 25 cm. Es proven diferents temps d'irradiació, de 5 a 15 segons, per tal de determinar la sensibilitat del bacteri a la irradiació, i per cada dosi d'UV es treu una alíquota de 0,1 mL que es sembra en una placa de LB per calcular la taxa de supervivència.

Els possibles mutants produïts es seleccionen per tinció lipídica dels grànuls de PHAs amb Roig Nil (*Red Nile*, Sigma, EEUU) i per citometria de flux (apartat 3.8.2), i es comproven per quantificació gravimètrica de la quantitat de PHAs produïts (apartat 3.8.5).

3.5.9.1.2. Mutagènesi per inserció amb el transposó del pUT mini-*Tn5*

La mutagènesi aleatòria per transposició consisteix en la inactivació de gens situats a l'atzar en llocs diferents del genoma, per inserció d'un element genètic mòbil (transposó). La transposició es realitza utilitzant *Escherichia coli* S17.1 λ pyr, que conté un vector suïcida pUT amb un transposó mini *Tn5* (De Lorenzo, 1990). Per començar s'assaja la transposició amb diferents vectors que presenten diferents

gens de resistència per tal d'adaptar el sistema a *P. aeruginosa*, bacteri que presenta una extraordinària resistència a nombrosos antibiòtics (Kiska *et al.*, 2003). Per tal de determinar quina concentració d'antibiòtic utilitzar com a contraselecció es va assajar la concentració mínima inhibidora (CMI) (Hancock i Woodruff, 1988) sobre *P. aeruginosa* 42A2 i 47T2 per a tres antibiòtics pels que es disposava d'un Mini*Tn5* amb aquesta resistència: Cloramfenicol (Cm) pUT-Cm, Estreptomicina (Sm) pUT-Sm i Tetraciclina (Tc) pUT-Tc (De Lorenzo, 1990).

Els minitransposons mini-*Tn5* són derivats del transposó compost *Tn5*. A cada un d'aquests elements els hi falta el gen que codifica per la transposasa i inclouen un gen que els hi confereix resistència a un antibiòtic flanquejat per una seqüència de 19 pb dels extrems I i O del *Tn5*. El vector de transmissió, el plasmidi pUT (De Lorenzo *et al.*, 1990) té un origen de replicació depenent de la proteïna π (derivat del plasmidi R6K), i l'origen de transferència *oriT* que deriva del plasmidi autoconjugatiu RP4. A més a més, el plasmidi pUT conté el gen que codifica per la transposasa, necessària per la transposició dels mini-*Tn5*. El cassette pUTmini-*Tn5* és estable i presenta la capacitat de ser mobilitzable en la soca *E. coli* S17-1 (λ *pyr*), ja que aquesta soca produeix la proteïna π i expressa les funcions per la conjugació de RP4 (De Lorenzo, 1990).

Durant el procés de mutagènesi el plasmidi pUTmini-*Tn5* es transfereix per conjugació de *E. coli* S17-1 (λ *pyr*) a una altra soca no productora de la proteïna π i que per tant no pot replicar i mantenir el plasmidi (apartat 3.5.7.2.1). En aquest cas les soques receptores van ser *P. aeruginosa* 42A2 i 47T2. Les cèl·lules conjugants, seleccionades per la resistència a l'antibiòtic codificada pel minitransposó, són necessàriament mutants produïts per inserció del mini-*Tn5* en algun *locus* del genoma de la soca receptora. L'avantatge que representa l'ús dels minitransposons és que en no tenir codificada la transposasa generen insercions estables (De Lorenzo, 1990).

El procediment que s'ha seguit per tal de realitzar la mutagènesi és el proposat per De Lorenzo i col·laboradors (1990), que s'ha descrit a l'apartat de conjugació 3.5.3.2.1. La contraselecció dels mutants per transposició es fa mitjançant la resistència adquirida pel bacteri receptor en incorporar el transposó. Entre els nombrosos mutants obtinguts és necessari fer la selecció d'aquells mutants que tenen afectada la producció de PHAs.

3.5.9.2. Mutagènesi dirigida

L'estratègia seguida per a la mutagènesi dirigida es basa en la inactivació de gens cromosòmics per recombinació homòloga amb fragments d'ADN de zones de

la mateixa regió obtinguts per PCR. Amb aquesta metodologia és possible deleccionar la regió gènica *phaC1-phaZ-phaC2*, que intervé en la síntesi dels PHAs (apartat 1.3.3.2), substituïnt-la mitjançant recombinació homòloga per uns fragments d'ADN que no continguin els gens complets. Es segueix el protocol descrit per Quénée i col·laboradors (2005).

S'amplifiquen les regions flanquejants a la regió gènica *phaC1-phaZ-phaC2* per PCR (apartat 3.5.2) a partir dels genomes de *P. aeruginosa* 42A2 i 47T2 amb els encebadors **A**, **B**, **C** i **D** (Taula 3.7), generant dos fragments d'ADN, AD i CD, que a la seva vegada serveixen com a motlle en una nova PCR, ara només amb els encebadors A i D, per generar un únic fragment AD. Aquest fragment generat compren una zona d'homologia a la regió 5' del gen *phaC1* de *Pseudomonas aeruginosa*, una seqüència diana per l'enzim de restricció *Bam*HI i seguidament una segona zona d'homologia aquesta vegada amb la zona 3' del gen *phaC2* de *Pseudomonas aeruginosa*.

El fragment d'ADN AD es lliga al vector de clonació pGEM-TEasy® (apartat 3.4) i es transforma en *E. coli* DH5 α (apartat 3.1) seguint les instruccions de la casa comercial. S'extreu novament el vector (apartats 3.5.3 i 3.5.4) i es digereix amb l'enzim *Eco*RI per tal de lligar-lo al vector suïcida pEX100Tlink prèviament digerit amb el mateix enzim (apartats 3.5.6.1 i 3.5.6.3).

El plasmidi obtingut pEX100TAD es transforma en *E. coli* DH5 α (apartat 3.5.7.1), s'extreu novament i es digereix amb *Bam*HI per tal de lligar la resistència a Gm flanquejada per seqüències *lox* que ha estat extreta prèviament del vector pUCGm/*lox* mitjançant digestió amb el mateix enzim de restricció (Quénée *et al.*, 2005).

Un cop lligat, el plasmidi aconseguit, *pEX100TAlloxGmloxD*, es transforma en *E. coli* S17.1 λ *pyr*, que és capaç de conjuguar amb *P. aeruginosa*. Es realitza la conjugació amb les soques *P. aeruginosa* 47T2 i 42A2 i es seleccionen els transconjugants per resistència a Gm i sensibilitat a sacarosa (apartat 3.5.7.2.2; Quénée *et al.*, 2005).

Finament, pel sistema Cre-*lox* és possible retirar la resistència a Gm del cromosoma electroporant el vector d'expressió del gen *Cre* pCM157 en els mutants aconseguits. Es seleccionen els mutants que han patit l'escissió dirigida entre els llocs de reconeixement *lox*, afegint Tc al medi de cultiu, per tal que pCM157 expressi *Cre* i es produeixi l'escissió. Es seleccionen els mutants per sensibilitat a Gm (Quénée *et al.*, 2005).

Per últim els mutants es comproven per seqüenciació (apartat 3.5.5) i per anàlisi de la producció de PHAs (apartat 3.8).

3.6. Tècniques d'anàlisi de proteïnes

3.6.1. Fraccionament cel·lular

Per tal de dur a terme la determinació de l'activitat lipolítica de les soques d'interès *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 i 42A2 per poder comparar-les amb la soca tipus PAO1, s'ha realitzat el fraccionament cel·lular consistent en l'obtenció dels sobrenedants i els extractes cel·lulars dels cultius d'aquestes soques.

Per a l'obtenció de les fraccions cel·lulars es centrifuga un cultiu d'una nit durant 10 minuts a 7500 *xg* i a 4°C per tal de separar les cèl·lules bacterianes del medi de cultiu líquid. Els sobrenedants obtinguts es concentren entre 30 i 50 vegades respecte el volum inicial, utilitzant Centricons de Centriplus® YM-30 (Millipore, EEUU) i seguint les instruccions que ofereix la casa comercial. Un cop concentrats, aquests sobrenedants es conserven a 4°C fins el moment de la determinació de l'activitat enzimàtica, sempre dins el termini d'una setmana.

Per tal d'obtenir la fracció intracel·lular d'aquestes cèl·lules, el sediment cel·lular dels cultius es resuspèn en un volum deu vegades inferior del volum del cultiu inicial de tampó fosfat 50 mM pH 7. Es sotmet a un procés de sonicació per tal de lisar les cèl·lules, realitzant 4 polsos de 2 minuts a una freqüència de 0,9 seg i a 50 vats de potència en un sonicador Labsonic 1510 (B. Braun, Alemanya). Es centrifuguen les mostres lisades durant 10 minuts a 7500 *xg* per tal de separar les restes cel·lulars, i es recupera el sobrenedant que conté l'extracte cel·lular cru de les mostres. Aquest extracte es guarda a 4°C fins al moment de realitzar l'assaig d'activitat, sempre dins el termini d'una setmana.

3.6.2. Valoració de la concentració de proteïna

La determinació de la concentració de proteïna es realitza mitjançant l'assaig *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad, EEUU), basat en l'observació que l'absorbància màxima d'una dissolució acidificada del colorant blau brillant Coomassie G-250, que canvia de 465 nm a 595 nm, passant del vermell al blau, quan s'uneix de manera proporcional amb les càrregues positives de les proteïnes (Bradford, 1976), dins el rang lineal de l'assaig. Donat que es tracta d'un assaig colorimètric, en augmentar la quantitat de proteïna s'incrementa la intensitat de color de la mostra. La valoració de la concentració de proteïna present a la mostra es fa respecte una recta patró realitzada amb seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma, EEUU) en un rang de concentració entre 0.1 i 1 mg/ml.

3.6.3. Electroforesi SDS-PAGE

Les proteïnes dels sobrenedants i dels extractes crus obtinguts s'analitzen mitjançant electroforesi en gels de poliacrilamida amb l'agent desnaturalitzant SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*), de manera que les proteïnes es separen en funció del seu pes molecular, tal i com està descrit per Laemmli (1970).

Abans de carregar les mostres en el gel és imprescindible afegir-hi el tampó de càrrega 3X, aquest s'afegeix abans d'un tractament previ d'ebullició: es fan incubacions d'1, 2, 5 i 10 minuts a 100°C per desfer possibles agregats proteics i facilitar així la formació de micel·les proteiques per a la separació electroforètica. L'electroforesi es porta a terme en una cubeta Mini-proteanII (Bio-Rad, EEUU), a 75 volts pel gel d'empaquetament i a 100 volts pel gel separador (Taula 3.8 i 3.9).

Taula 3.8. Composició dels gels de separació i empaquetament per l'electroforesi SDS-Page.

Gel de separació (10%)	
Tampó de separació	3,2 ml
Dissolució d'acrilamida-bisacrilamida (30%)	4 ml
Aigua bidestil·lada	4,8 ml
APS (Persulfat amònic, Bio-Rad, EEUU) 10%	60 µl
TEMED (N,N,N'N'-Tetrametiletilendiamina, Bio-Rad, EEUU)	10 µl
Gel d'empaquetament (6%)	
Tampó d'empaquetament	1,3 ml
Dissolució d'acrilamida-bisacrilamida (30%)	0,84 ml
Aigua bidestil·lada	2,8 ml
APS 10%	35 µl
TEMED	10 µl

Un cop finalitzada l'electroforesi, es tenyeix el gel durant 1 hora en una dissolució de Blau de Coomassie R-250 (taula 3.8) i posteriorment es destenyeix amb àcid acètic al 10% amb agitació suau utilitzant un agitador Polymax 1040 (Heidolph, Alemanya), fins observar la presència de bandes de proteïna en el gel. El pes molecular de les proteïnes es determina mitjançant comparació amb uns marcadors de pes molecular en el rang de 200-6 kDa (Bio-Rad, EEUU).

Taula 3.9. Composició de les dissolucions utilitzades en l'anàlisi de proteïnes.

Dissolució d'acrilamida-bisacrilamida (30%)	30 g d'acrilamida (Bio-Rad, EEUU) 0,8 g de bisacrilamida (Bio-Rad, EEUU) Enrasar a 100 ml amb aigua bidestil·lada Filtrar i guardar a 4°C protegit de la llum
Tampó de separació	Tris-HCl 1,5M, pH 8,8 (Roche, Suïssa) SDS (Merck, Alemanya) 0,4%
Tampó d'empaquetament	Tris-HCl 0,5M, pH 6,8 SDS 0,4%
Tampó d'electroforesi 10x	Tris 0,25M Glicina (Bio-Rad, EEUU) 1,92 M SDS 1%
Tampó de carrega 3x	Glicerol (Panreac, Espanya) 15% β -mercaptoetanol (Sigma, EEUU) 7,5% SDS (Merck, Alemanya) 3,45% Tris-HCl 93,7 mM, pH 6,8 Blau de bromofenol (Bio-Rad, EEUU) 0,15%
Dissolució de tinció	Blau Brillant de Coomassie R-250 (Sigma) 0,05% Àcid acètic glacial (Panreac, Espanya) 10% Isopropanol (Merck, Alemanya,) 25%

3.6.4. Detecció de l'activitat lipolítica

Per tal de valorar l'activitat lipasa dels extractes crus i els sobrenedants obtinguts en el present treball, es realitzen una sèrie de proves tan qualitatives com quantitatives.

3.6.4.1. Detecció qualitativa d'activitat amb derivats de la 4-metilumbeliferona (MUF)

3.6.4.1.1. Activitat sobre paper de filtre

L'activitat lipolítica de les suspensions cel·lulars i dels sobrenedants obtinguts s'analitza sobre paper de filtre seguint el mètode descrit per Díaz *et al.* (1999). Aquest mètode consisteix en aplicar sobre paper de filtre una al·lquota de 5 μ l de MUF-Butirat 25 mM dissolt en etilenglicol-monometilèter (EGME, Merck, Alemanya). Al damunt d'aquest substrat s'afegeixen 5 μ l de la mostra a assajar i de manera immediata s'observa l'aparició de fluorescència mitjançant transil·luminació amb llum ultraviolada (Image Master, EEUU) degut a l'activitat lipasa que allibera el

compost fluorescent 4-metilumbeliferona (MUF). Les mostres assajades amb aquest procediment normalment són suspensions en tampó fosfat 50 mM pH 7.

3.6.4.1.2. Anàlisis zimogràfiques

L'activitat lipolítica de les proteïnes separades per SDS-PAGE, es detecta mitjançant anàlisis zimogràfiques abans de la tinció proteica amb Blau de Coomassie, seguint el protocol prèviament descrit per Díaz *et al.* (1999) i modificat per Prim *et al.* (2003). Després de la separació electroforètica, els gels s'incuben en una dissolució de Triton X-100[®] al 2,5% durant 30 minuts a temperatura ambient, posteriorment es renten dues vegades amb tampó fosfat 50 mM a pH 7 (20 minuts) i es cobreixen amb una dissolució de MUF-butirat 100 µM en el mateix tampó. Les bandes de proteïnes amb activitat lipasa es poden detectar després d'una breu incubació a temperatura ambient (5-15 minuts), de la mateixa manera que l'activitat sobre paper de filtre, mitjançant transil·luminació amb llum ultraviolada (Image Master, EEUU) per l'aparició de fluorescència deguda a l'alliberament de la 4-metilumbeliferona (MUF).

3.6.4.2. Detecció quantitativa d'activitat lipasa amb derivats del *p*-Nitrofenil (*p*-NP)

L'activitat lipolítica es pot quantificar sobre diversos substrats lipídics derivats del *p*-NP (*p*-Nitrofenil), utilitzant el protocol descrit per Ruiz *et al.* (2005), adaptat del prèviament descrit per Prim *et al.* (2000, 2003). Es tracta d'un mètode senzill, ràpid i sensible per a la detecció d'activitat lipolítica d'una gran quantitat de mostres al mateix temps.

Es prepara el substrat (derivat del *p*-NP com ara el *p*-NP-butirat, *p*-NP-caprilat, entre altres) a una concentració de 20 mM en isopropanol i es dissol amb l'ajut d'un bany d'ultrasons (Sonica ultrasonidos S.L., España), sonicant durant 3 minuts seguits. Després, es prepara una dilució 1:10 (v/v) d'aquest substrat en tampó fosfat-Triton X-100[®] (55,56 mM de tampó fosfat pH 7 i 1,33% (v/v) de Triton X-100[®]), s'homogeneïtza i es dosifiquen alíquotes de 50 µl d'aquesta barreja en una placa *microtiter*. La placa s'incuba durant 15 minuts a la temperatura d'assaig (normalment 37°C) i després d'aquesta pre-incubació, s'afegeixen 50 µl de la mostra (dissolució d'extracte cru o sobrenedant preparats en tampó fosfat 50 mM pH 7 i prèviament incubats a 37°C durant 15 minuts), obtenint així la reacció en un volum final de 100 µl. Aquesta barreja de reacció s'incuba durant 15-30

minuts a la temperatura d'assaig i es mesura l'absorbància de cada pou de la placa *microtiter* a $\lambda=405$ nm en un lector de plaques (BIO-RAD Model 3550).

Les concentracions finals dels diferents components en cada pouet de la placa *microtiter* són: *p*-NP, 1 mM; isopropanol, 5%; Triton X-100[®], 0,6%; tampó fosfat pH 7, 50 mM i mostra a assajar entre 0 i 2,5 mg/ml. En aquest cas, una unitat d'activitat (U) es defineix com la quantitat d'enzim necessari per alliberar 1 μ mol de *p*-NP per minut sota les condicions d'assaig descrites.

3.6.4.3. Estudi del rang de substrats

El rang de substrats de les fraccions cel·lulars es determina mitjançant l'assaig colorimètric descrit en l'apartat anterior. S'utilitzen una sèrie de derivats del *p*-NP esterificats a un àcid gras de diferent llargada de cadena: *p*-NP-butirat (C₄), *p*-NP-valerat (C₅), *p*-NP-caproat (C₆), *p*-NP-caprilat (C₈), *p*-NP-caprat (C₁₀), *p*-NP-laurat (C₁₂), *p*-NP-palmitat (C₁₆) i *p*-NP-estearat (C₁₈). Les condicions d'assaig són les mateixes que en el cas anterior, però utilitzant una concentració final de substrat de 0,5 mM.

3.6.4.4. Determinació de la temperatura òptima

La determinació de la temperatura òptima de les fraccions es realitza mitjançant una adaptació de l'assaig colorimètric descrit anteriorment a l'apartat 3.6.4.2. S'incuba la barreja de reacció durant 30 minuts en diferents banys a temperatures entre 4 i 60°C. Però, a diferència de l'assaig colorimètric descrit, les incubacions es realitzen en tubs d'1,5 mL (Eppendorf[®], Alemanya). Seguidament els tubs es submergeixen en gel per tal d'aturar la reacció i es mantenen en gel en tot moment fins l'hora de passar-les a les plaques *microtiter* per realitzar la lectura de l'absorbància amb el lector de plaques i enregistrar l'activitat residual de la reacció a cada una de les temperatures assajades.

3.6.4.5. Determinació del pH òptim

Per tal de realitzar la determinació del pH òptim de les fraccions s'adapta novament l'assaig colorimètric anteriorment descrit. Els tampons utilitzats són: citrat 50 mM (pH 3-4), succinat 50 mM (pH 4-6), fosfat sòdic 50 mM (pH 6-7), tris-HCl 50 mM (pH 7-9) i glicina sòdica 50 mM (pH 9-12).

La barreja de reacció final s'incuba durant 30 minuts en cadascun dels pHs i després es determina l'activitat residual a partir del registre de l'absorbància a 405 nm amb el lector de plaques.

3.6.4.6. Anàlisi de la termoestabilitat

Pels assajos de termoestabilitat, les dilucions de les fraccions amb activitat enzimàtica preparades en tampó fosfat 50 mM (pH 7) s'incuben de 0 a 24h hores en banys a les següents temperatures (°C): 4, 20, 30, 40, 50 i 60 (adaptat de Prim *et al.*, 2000) i s'extreu una alíquota abans de començar el tractament tèrmic, una altra passada una hora, a les dues hores, a les 4 hores i per últim es pren una darrera mostra a les 24h per tal de mesurar l'activitat residual. L'assaig es realitza a la temperatura i pH òptims trobats per les fraccions i s'analitza l'activitat lipolítica segons el mètode colorimètric descrit anteriorment.

3.6.4.7. Anàlisi de l'estabilitat a diferents pHs

Pels assajos d'estabilitat de l'enzim en diferents pHs, es preparen dilucions de les fraccions amb activitat lipolítica en els següents tampons: citrat (pH 3-4), succinat (pH 4-6), fosfat sòdic (pH 6-7), tris-HCl (pH 7-9), glicina sòdica (pH 9-10) i s'incuben durant una hora (Prim *et al.*, 2000) a temperatura ambient. Passat aquest temps, per realitzar l'assaig s'utilitza una alíquota de les dilucions de les fraccions i es mesura l'activitat lipolítica residual a la temperatura i pH òptims d'activitat determinats prèviament.

3.7. Seguiment i determinació del creixement cel·lular

Per tal d'analitzar la producció de polihidroxicanoats (PHA), ramnolípid (Rhls) i àcids grassos hidroxilats (AG-OH) al llarg del temps en cultius de les soques parentals *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 i 42A2 i dels seus respectius mutants negatius per la producció de PHAs, és necessari avaluar el creixement dels cultius mitjançant el seguiment d'alguns paràmetres bàsics com ara la biomassa i/o la proteïna, el pH i el nitrogen residual.

3.7.1. Quantificació de la biomassa

En general, la biomassa dels cultius bacterians es determina per espectrometria, a través del registre de l'absorbància a 600 o 450nm. Pel que fa a

la biomassa cel·lular, aquesta es quantifica pel pes sec de les cèl·lules d'una alíquota de 5 mL de cultiu tractada durant 24h a 100°C (Abalos, 2001).

3.7.2. Quantificació de proteïna en cultiu

La determinació de proteïnes cel·lulars pel seguiment dels cultius s'ha dut a terme sobre alíquotes d'1 mL pressos cada 24h dels cultius mitjançant el mètode espectrofotomètric de Lowry modificat per Hartree (Hartree, 1972) que es basa en la reacció de Folin.

3.7.3. Determinació del pH

Es mesura en un potenciòmetre (Radiometer, pHmeter 28) el pH del sobrenedant dels cultius resultant de la centrifugació a 7500 xg a 15°C durant 20 minuts, d'alíquotes de 5 mL pressos cada 24h de cultiu.

3.7.4. Determinació de nitrats i nitrits

La valoració de NaNO_3 i NaNO_2 residuals als cultius s'ha portat a terme respectivament amb els Kits colorimètrics Aquamerck 8032 i Aquamerck 11118 (Merck).

3.8. Anàlisi qualitativa i quantitativa dels PHAs

3.8.1. Observació microscòpica dels grànuls de PHAs

Per tal d'observar de manera directa les inclusions lipídiques de PHAs amb el **microscopi òptic de fluorescència**, es fa servir la tinció dels lípids cel·lulars amb Roig Nil (*Red Nile*, Sigma, EEUU). Així, s'observa l'acumulació intracel·lular dels grànuls de PHAs (Spiekermann *et al.*, 1999).

Per tal de portar a terme la tinció s'empra una alíquota de 2 mL de cultiu líquid o bé es resuspenen 4 colònies d'un cultiu en placa en 2 mL de Ringer ¼ (Scharlau, Espanya), es col·loquen dins un tub eppendorf® (Alemanya) i s'afegeixen dues gotes d'una dissolució mare del reactiu de Roig Nil (0,25 mg/mL DMSO). Seguidament s'agita amb el vòrtex i es centrifuga 5 minuts a 4°C i 14000 rpm. Es decanta el sobrenedant i es renta la biomassa amb 2 mL de MgCl_2 (10 mM) per eliminar l'excedent de Roig Nil. Es torna a centrifugar en les mateixes condicions i el sediment es resuspèn en 1 mL de MgCl_2 (10 mM). Finalment, les

mostres s'observen al microscopi òptic d'epifluorescència (BX-40 Olympus, Alemanya) utilitzant filtres per fluorescència vermella (excitació a 515-560 nm; emissió major que 590 nm).

Un altre mètode per la detecció de la presència o absència d'inclusions lipídiques de PHAs consisteix en utilitzar tècniques de **microscòpia electrònica de transmissió (MET)**. Mitjançant aquesta tècnica es poden observar els grànuls de PHA processant les cèl·lules de diferent manera sense la necessitat de tenyir les inclusions amb RN. Donat que les inclusions lipídiques són intracel·lulars, per la observació d'aquestes cal fixar, tenyir i sotmetre les cèl·lules a talls ultrafins que deixin en evidència l'interior cel·lular.

La fixació de la mostra es realitza sobre 1 mL de cultiu al qual s'hi addiciona 1 mL de glutaraldehyd (5%) doblement concentrat en tampó fosfat (0,2 M), deixant la mostra i el fixador en contacte durant 10 minuts. Transcorregut aquest temps, es centrifuga suaument a 1000-2000 rpm a 4°C durant 5 minuts, tot evitant la lisi cel·lular. Es decanta el sobrenedant i es resuspèn la biomassa novament en glutaraldehyd però ara a un 2,5% (glutaraldehyd 5% + tampó fosfat 0,1 M). Aquesta operació es repeteix fins a tres vegades i a l'últim procés de fixació es deixa la biomassa dues hores en contacte amb el fixador (2,5%) com a mínim. Seguidament es procedeix a fer rentats amb tampó fosfat (0,1 M), deixant la biomassa en contacte amb el tampó durant 10 minuts i centrifugant de la mateixa manera. El sobrenedant es decanta i es repeteix el procés fins a quatre vegades.

La tinció es realitza addicionant a la mostra fixada una dissolució d'un 1% d' OsO_4 i 0,8% de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ fins a cobrir totalment la biomassa i deixant-la en gel durant 2 hores coberta amb paper d'alumini. Passat el temps de tinció, es centrifuga la suspensió, es decanta el sobrenedant i es renten les cèl·lules quatre vegades amb una dissolució tampó fosfat (0,1M).

Finalment, les cèl·lules tenyides s'inclouen en agar pur (Difco, EEUU) al 2,5% mitjançant el mètode de la bombolla i es deshidraten emprant un gradient creixent d'acetona pura anhidra (del 50 fins al 100%). S'inclouen les mostres en reïna Spurr (casa comercial) i es deixa polimeritzar durant 48 hores a 60°C (Spurr, 1969). Seguidament es realitzen talls ultrafins (30-90 nm) amb una fulla de diamant (Diatome, Suïssa) en un Ultramicròtom Ultracut FC4E (Reichert-Jung (LEICA), Alemanya). Es col·loquen els talls en reixetes de coure i s'aplica acetat d'uranil durat 30 minuts.

Els talls ultrafins tenyits s'han observat en un microscopi electrònic de transmissió Phillips EM 301 (Holanda) amb un voltatge d'acceleració de 60 kV, i les

imatges s'adquireixen amb una càmera Megaview III i un programa de digitalització d'imatges (SoftImaging).

3.8.2. Determinació citomètrica de cèl·lules productores de PHAs

La citometria de flux és una tècnica destinada a la detecció de components o característiques estructurals de les cèl·lules, fonamentalment mitjançant mètodes òptics. Tot i que les mesures són realitzades sobre cèl·lules individuals i per unitat de temps, aquesta tècnica permet processar milers de cèl·lules en pocs segons. La citometria de flux es pot utilitzar per l'anàlisi dels diferents tipus cel·lulars en una barreja o suspensió, en base a la particularitat que els diferents tipus cel·lulars es poden distingir mitjançant quantificació de les característiques estructurals i de mida (Herzenberg *et al.*, 2002).

En el moment de realitzar les mesures en el citòmetre de flux, les cèl·lules han d'estar en suspensió cel·lular i en forma de cèl·lula única. Se les obliga a passar alineades una a una davant del feix de làser mitjançant un flux continu, a mode d'un corrent prim de la suspensió cel·lular. Si tenyim les cèl·lules amb un colorant fluorescent, cada cèl·lula, a la vegada que dispersa la llum, emet fluorescència com a conseqüència de l'excitació làser a la que es veu sotmesa (en el nostre cas el colorant amb el que tenyim les cèl·lules és el colorant lipídic Roig Nil (RN) (Vidal-Mas *et al.*, 2001)). Els paràmetres que típicament es mesuren de forma simultània per a cada cèl·lula són (Huerta *et al.*, 2006):

1. Dispersió frontal de la llum a 2^o FS (*forward scatter*), valor proporcional a la mida cel·lular.
2. Dispersió de la llum ortogonal SS (*side scatter*), proporcional a la quantitat d'estructures granulars o la complexitat de la cèl·lula.
3. Intensitats de fluorescència a diferents longituds d'ona.

La dispersió de la llum per sí mateixa resulta ser de bastant utilitat. Normalment s'utilitza aquest paràmetre per a l'exclusió de cèl·lules mortes, agregats cel·lulars, restes cel·lulars, així com per reduir el soroll de fons en la mesura de la fluorescència.

Convencionalment, les intensitats de fluorescència es determinen a diferents longituds d'ona i de manera simultània per cada una de les cèl·lules, fet pel qual es poden fer servir diverses sondes fluorescents (fluorocroms).

Mitjançant la tècnica de conjugació amb fluorocroms es poden analitzar mitjançant sondes fluorescents específiques diferents tipus de components intracel·lulars. El Roig Nil és un colorant lipofílic que tenyeix els lípids intracel·lulars

i és intensament fluorescent. S'excita a 485 nm, emet a 525 nm i es fa servir per tenyir el contingut lipídic cel·lular, permetent estudis de poblacions productores o no de PHAs (Vidal-Mas *et al.*, 2001). De manera que aquesta tècnica ens pot servir com a mètode de discriminació de les cèl·lules recombinants i possibles mutants negatius per la producció de PHAs de *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 i 42A2. Les anàlisis citomètriques s'han realitzat als Serveis Científic Tècnics de la Universitat de Barcelona amb el citòmetre de flux Cytomics FC500 MPL (Beckman Coulter, EEUU).

3.8.3. Extracció i purificació dels PHAs

Per tal de poder quantificar i caracteritzar els polímers de PHAs és necessari processar abans les mostres. Així, la biomassa obtinguda de cultius de 24, 48, 72 i 96 hores en medi mínim amb oli de fregits (50% oliva: 50% gira-sol) com a font de carboni, es fracciona mitjançant liofilització per obtenir el material cel·lular, per després procedir a la purificació dels PHAs per precipitació en metanol fred.

Donat que els PHAs s'acumulen en grànuls intracel·lulars, la mostra a processar és el sediment de cèl·lules resultant de la centrifugació del cultiu a 7500 xg a 4°C durant 20 minuts en una centrífuga Centrikon T-124 (Kontron, Italia). Seguidament es realitzen una sèrie de rentats d'aquesta biomassa amb aigua o una barreja aigua/hexà (9:1, v/v) en cas que quedi oli i sigui necessari. Un cop la biomassa és neta es dissol en un volum mínim d'aigua destil·lada i es congela a -20°C. Les mostres congelades es liofilitzen a -50°C i 10^{-2} mbar de pressió en un liofilitzador Cryodos-50 (Telstar, Espanya).

Seguidament s'extreu el polímer del liofilitzat amb cloroform i amb temperatura creixent, seguint el mètode descrit per Valentin *et al.* (2000). Per fer-ho es reparteix la biomassa liofilitzada en tubs de vidre Pyrex® amb tap de rosca de 16 mm d'amplada per 160 mm d'alçada (Viví Sterilin Ltd, Anglaterra) i s'afegeix cloroform (aproximadament uns 10 mL de cloroform per cada 0,2 g de cèl·lules liofilitzades). S'incuben a 80°C en un bloc tèrmic (Boeckel Scientific, EEUU) durant 3 hores. Passat el temps d'extracció, es deixa refredar i es filtra amb paper de cel·lulosa, eliminant així les restes cel·lulars. El filtrat es concentra a sequedat al rotavapor (Rotavapor-R, Büchi, Suïssa) a 50°C i 600 mm Hg.

Els polímers de PHAs retinguts al filtrat són purificats per precipitació en metanol i fred (-20°C). El concentrat de polímers es resuspèn en la mínima quantitat de cloroform i s'addiciona aquesta dissolució de polímers/CHCl₃ gota a gota sobre el metanol fred en un baló de vidre i en agitació (la relació CHCl₃/MeOH és $\geq 1/10$ (v/v)). Els polímers purificats queden precipitats al fons del baló.

Seguidament es decanta el metanol, i es renten els PHAs precipitats amb metanol fred (Huijberts *et al.*, 1992). Finalment, els PHAs purificats s'assequen en una estufa al buit a 30°C i 30 mbar de pressió durant 24h, o bé sota corrent de N₂ (Carburos Metálicos, Espanya). Els polímers purificats s'han d'emmagatzemar sota atmosfera inert (N₂) a -20°C abans de procedir a la seva quantificació i caracterització.

3.8.4. Anàlisi dels PHAs per Ressonància Magnètica Nuclear (RMN)

En aquest treball s'utilitza la Ressonància Magnètica Nuclear per comprovar la presència o absència de PHAs a les possibles soques mutants defectives per la producció de PHAs. Però la RMN ens pot arribar a donar també informació estructural dels polímers de PHAs (Serafim *et al.*, 2002).

Per tal de portar a terme l'assaig monodimensional d'un protó ¹H-RMN de les mostres de PHAs purificades, es dissolen 10 mg de cada polímer purificat en 0,7 mL de cloroform deuterat (CDCl₃), emprant tetrametilsilà (TMS) com a substància de referència.

Per dur a terme aquestes anàlisis s'ha emprat l'equip Mercury-400F (400 MHz, Facultat de Farmàcia, SCT-UB) del Servei de Ressonància dels Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona. Els espectres d'RMN obtinguts pels diferents polímers produïts per cadascuna de les soques analitzades s'han processat emprant els softwares XWin32 (StarNet Comunicacions Corp., EEUU) i MestRec (Mestrelab Research S.L., EEUU).

3.8.5. Quantificació gravimètrica de PHAs

S'ha realitzat la quantificació gravimètrica de la producció de PHAs en les soques mutants i parentals de *P. aeruginosa* 42A2 i 47T2, realitzant extraccions dels polímers en tubs de vidre amb tap hermètic, tal i com descriuen Valentin *et al.* (2000).

Partint d'un volum conegut de cultiu cel·lular (50 mL de cultiu), es recullen les cèl·lules per centrifugació a 7500 g, a 4°C, durant 15 minuts (Centricon t-124, Suïssa). El sobrenedant es reserva per l'anàlisi dels ramnolípids, mentre que les cèl·lules del sediment es renten dues vegades amb aigua destil·lada. Un cop rentades, es resuspenen en el mínim volum d'aigua destil·lada, es congelen a -20°C durant 24 h i es liofilitzen amb el liofilitzador Cryodos (Telstar, Espanya) a -40°C i 10⁻² mbars de pressió.

La extracció es realitza seguint el protocol de l'apartat 3.8.3 descrit per Valentin *et al.* (2000) i a continuació s'eliminen les restes de dissolvent assecant sota corrent de N₂ (Carbuos metàlics, Espanya).

Finalment es determina la quantitat de PHAs gravimètricament. El pes del vial amb el producte menys la tara del vial reflecteix el pes del producte (mg), que dividit pel volum de cultiu (50 mL), ens dóna el valor de la concentració de PHAs en g/L.

3.9. Anàlisi qualitativa i quantitativa dels Rhls

3.9.1. Obtenció i purificació de Rhls

La soca *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 produeix ramnolípids i els secreta al medi extracel·lular (Haba *et al.*, 1999). Per tal d'estudiar les propietats dels seus ramnolípids, primer es recuperen els sobrenedants del cultius per centrifugació en una centrífuga Centrikon T-124 (Kontron, Italia) a 7500 xg durant 20 minuts. Un cop separats els sobrenedants és necessari reduir el volum de treball per fer la purificació dels ramnolípids; per això es realitza una extracció mitjançant precipitació àcida tenint en compte la presència del grup carboxil en les molècules de ramnolípids. Així el sobrenedant obtingut s'acidifica amb àcid sulfúric concentrat fins a pH 1-2 aproximadament. La dissolució acidificada es conserva a 4°C durant 24 hores i el precipitat, constituït majoritàriament pels ramnolípids, es recupera per centrifugació (7500 g, 20 minuts, 15°C) i es renta diverses vegades amb aigua destil·lada acidificada amb àcid sulfúric concentrat (Abalos, 2001).

La purificació que s'ha dut a terme en aquest treball és una modificació del mètode descrit per Reiling (Reiling *et al.*, 1986), que utilitza una columna d'adsorció cromatogràfica. Per seguir aquest mètode s'omple una columna de vidre amb Amberlita XAD-2 (Sigma, EEUU) dissolta en un volum conegut d'aigua destil·lada. Es deixa el temps suficient per a que l'amberlita es compacti i la columna s'empaqueti i després es procedeix a extreure l'aigua sobrant, de manera que es pugui conèixer el volum mort del sistema. A continuació es carrega la columna amb una dissolució de NaOH 1M fins arribar a un pH de 14, condicions que afavoreixen la ionització de l'Amberlita XAD-2. A continuació es renta la columna amb aigua destil·lada a pH 6.1 i després es tampona amb tampó fosfat a pH 6.1. i es deixa preparada per la cromatografia.

El volum resultant de la precipitació àcida dels sobrenedants es porta a un pH de 6,1 i es diposita en la columna d'adsorció d'Amberlita XAD-2 preparada com

s'ha descrit per fer-lo córrer i seguidament eluir els Rhls retinguts per l'amberlita amb metanol (100%).

3.9.2. Anàlisi qualitativa dels diversos components dels Rhls

La identificació dels components dels tensioactius produïts per *P. aeruginosa* 47T2 permet fer un seguiment del procés d'extracció i una quantificació relativa dels diferents components d'aquests tensioactius.

3.9.2.1. Identificació per cromatografia en capa fina dels components lipídics i sucres dels sobrenedants

La cromatografia en capa fina (TLC: *thin layer chromatography*), s'ha usat com a tècnica qualitativa, ja que és una forma simple i ràpida d'obtenir informació del perfil de la composició de l'extracte orgànic dels sobrenedants dels cultius. També contribueix a la determinació de les condicions òptimes per realitzar la separació dels diferents compostos de les mostres. És una tècnica de cromatografia líquid-sòlid o d'adsorció plana per determinar i separar els diferents components d'un extracte orgànic (Christie, 2003).

Les TLCs s'han realitzat en cromatoplaques AL TLC de silicagel G60 de 0,25 mm de gruix i de 20 x 20 cm de mida (Merck, Alemanya). Primerament, cal activar les plaques uns 30 minuts introduint-les en una estufa a 100°C embolicades en paper d'alumini. A continuació s'apliquen les diferents mostres per contacte amb la placa mitjançant un tub capil·lar que conté cadascuna de les mostres prèviament dissoltes en un dissolvent orgànic. Un cop el dissolvent de la mostra aplicada s'ha evaporat i assecat, la placa es col·loca verticalment en un tanc de vidre tancat i saturat amb els vapors de la mescla de dissolvents que conformen la fase mòbil. Com a fase mòbil s'ha utilitzat la següent mescla de dissolvents: cloroform:metanol:àcid acètic en proporcions 65:35:5. Seguidament s'ha procedit al desenvolupament de la cromatografia i un cop el dissolvent ha superat dues terceres parts de la placa, es retira del tanc i s'asseca.

Per al revelat per nebulització de les plaques s'han utilitzat dos reveladors diferents:

- Àcid fosfomolíbdic: s'obté diluint àcid fosfomolíbdic (Fluka, Suïssa) al 10% en etanol absolut (Panreac, Espanya). Un cop nebulitzada la placa s'escalfa amb un assecador de mà i s'observa l'aparició de taques de color blau-verd fosc corresponents als diferents compostos (Christie, 2003).

- Reactiu de Molish: s'obté diluint α -naftol en etanol al 15 % i barrejant 21 ml d'aquesta dissolució amb 13 ml de H_2SO_4 i 81 ml d'etanol absolut. Un cop nebulitzada la placa s'escalfa amb un assecador de mà i s'observa l'aparició de taques de color marró rosat corresponents als diferents compostos (Nicky *et al.*, 2005).

3.9.2.2. Identificació de l'extracte de Rhls per cromatografia líquida d'alta resolució i espectrometria de masses (HPLC/EM)

Per tal d'identificar els diferents ramnolípidis que constitueixen els tensioactius produïts per *P. aeruginosa* 47T2 es fa servir la tècnica cromatogràfica HPLC/ESI-MS (Cromatografia líquida d'alta resolució/Ionització per *ElectroSpray* – Espectrometria de Masses) (Déziel *et al.*, 1999).

A partir d'una dissolució a 10 mg/ml dels Rhls purificats, en metanol grau HPLC s'han analitzat 10 μ l en un HPLC Waters 2690 acoblat a un detector de masses. La separació cromatogràfica en mode de fase reversa (la fase mòbil és més polar que la estacionària) s'ha dut a terme en les següents condicions (Haba *et al.*, 2003): columna C_{18} (Spherisorb ODS2) de 150 x 4,6 mm i 0,5 μ m de ϕ_i (Teknochroma, Espanya); fase mòbil: Acetonitril/aigua (AcN/ H_2O) amb un 0,1 % (v/v) d'àcid acètic en cada dissolvent; gradient de fase mòbil: es va iniciar amb un 30% de AcN durant 2 minuts, incrementant-se la concentració d'AcN fins al 100 % en 30 minuts i mantenint aquesta concentració durant 5 minuts; velocitat de flux: 1 ml/minut; sistema de *split*: 1:50. Per l'elució total de la mostra s'addicionen, un cop acabat el recorregut, 200 μ l/minut d'acetona a través d'una bomba de xeringa Phoenix 20. La fase mòbil i l'acetona es mesclen en una vàlvula T (Valco).

L'espectre de masses s'ha obtingut en un quadrupol VG Platform II (Micromass, Anglaterra) proveït d'una font d'*electrospray*. Les condicions de l'*electrospray* han estat: mode *Electrospray* negatiu (N-ES); assecat amb nitrogen a 100°C; introducció al capil·lar a una velocitat de flux de 400 L/h; potencial aplicat al capil·lar: -3.5 KV; voltatge d'extracció de -35 V per la detecció de les molècules, i -80 V per la visualització de possibles fragmentacions (Déziel *et al.*, 1999). Les dades espectrals han estat obtingudes en un escaneig de masses des de m/z 100 a 750. La integració dels pics s'obté utilitzant el software MassLynx (Waters Corp., EEUU).

3.9.3. Determinació quantitativa dels Rhls

La quantificació de ramnolípids s'ha fet de manera indirecta quantificant per Espectroscòpia d'Absorció Molecular la quantitat de ramnosa dels sobrenedants de les soques de *P. aeruginosa* motiu d'estudi d'aquest treball. Per determinar la quantitat de ramnosa s'ha fet servir el mètode espectrofotomètric de desenvolupament de color amb recta de calibratge com a procediment de càlcul. S'ha fet servir un banc de dilucions de ramnosa com a patró, amb concentracions que van de 0 a 40 µg/mL (Chandrasekaran *et al.*, 1980).

Les mostres emprades per determinar la concentració de ramnosa són fraccions de sobrenedants resultants de la centrifugació a 7500 g, a 4°C, durant 15 minuts dels cultius de *P. aeruginosa*, tant de les soques parentals com dels clons recombinants mutants per la producció de PHAs. El protocol seguit per la quantificació de ramnosa en les mostres és el següent: es barreja 1 mL de sobrenedant amb 4,5 mL de la dissolució A (6 mL d'àcid sulfúric concentrat i 1 mL d'aigua destil·lada). Aquesta barreja es deixa uns 10 minuts en un bany d'aigua a 100°C, es refreda en aigua freda i se li afegeixen 0,1 mL de la dissolució B (0,1 mL d'àcid tioglicòlic en 2,9 mL d'aigua destil·lada), es manté 3 hores en foscor total a temperatura ambient i després s'enregistra l'absorbància amb l'espectrofotòmetre a 400 i 430 nm i es calcula la diferència entre aquestes dues longituds d'ona, sempre usant un blanc com a referència. Les dues mesures són necessàries ja que la 6-deoxihexosa (ramnosa) té molt baixa absorbància comparada amb l'hexosa quan es valora a 430 nm, així amb la lectura a 400 nm es pot fer la correcció per la presència d'altres sucres. Els valors obtinguts a l'espectrofotòmetre es substitueixen a la recta patró i s'obté la concentració de ramnosa de cada mostra.

El contingut en ramnolípids es calcula multiplicant el contingut de ramnosa pel factor 3, factor que representa la correlació ramnolípid/ramnosa (Itoh *et al.*, 1971).

3.10. Determinació dels paràmetres fisicoquímics dels Rhls

La caracterització físico-química dels Rhls s'ha realitzat determinant els següents paràmetres: tensió superficial (γ_{TS}), concentració micel·lar crítica (CMC), solubilitat en diferents solvents, emulsificació (E_{24}), i realitzant diagrames ternaris de fases amb 4 olis diferents.

3.10.1. Determinació de la tensió superficial

Per tal de determinar la tensió superficial (TS) dels sobrenedants resultants de la centrifugació dels cultiu de *Pseudomonas aeruginosa* en una centrífuga Centrikon T-124 (Kontron, Itàlia) a 7500 xg durant 15 minuts, s'utilitza el mètode De Nöuy de l'anell (Zajic *et al.*, 1984). Aquest mètode consisteix en omplir un cristal·litzador amb 25 ml de mostra i deixar-lo estabilitzar durant 3 hores. A continuació situar el cristal·litzador al suport del tensiòmetre (Krüss K9, Finlàndia, Figura 3.1), ajustar l'aparell a zero i introduir completament l'anell del tensiòmetre al líquid problema. El valor de la tensió superficial màxima obtinguda es determina enretirant lentament l'anell del líquid de manera que aquest no es separi brusquement de la superfície lliure del líquid. Amb aquest mètode es determina la força necessària per separar un anell de platí de la superfície d'un líquid. L'anell ha de tenir un angle de contacte 0 sobre la superfície del líquid problema i és essencial que reposi sobre una superfície tranquil·la, per això les mostres es deixen estabilitzant durant 3 hores dins dels cristal·litzadors abans de fer la mesura.



Figura 3.1. Tensiòmetre Krüss K9 a l'esquerra i detall de l'anell i sobrenedant en un cristal·litzador a la dreta.

Per tal de calibrar l'aparell s'ha de tenir en compte el valor de referència de tensió superficial de l'aigua destil·lada (72 mN/m a 25°C). Tot el material de vidre utilitzat es neteja acuradament amb mescla cròmica i l'anell de platí s'esterilitza amb alcohol a la flama abans de cada medicació.

3.10.2. Concentració micel·lar crítica (CMC)

Per tal de determinar la concentració micel·lar crítica (CMC) dels biotensioactius formats pels ramnolípidés és necessari realitzar un banc de dilucions dels Rhls purificats, per tal d'assajar a partir de quina concentració no varia la tensió superficial i comencen a formar-se micel·les. Aquest banc de dilucions consisteix en el nostre cas en set dilucions en aigua destil·lada dels biotensioactius. Cal preparar un mínim de 10 ml de cada dilució per poder mesurar la tensió superficial de cadascuna pel mètode de l'anell (Zajic *et al.*, 1984).

Les concentracions de les dilucions realitzades són les següents (mg/mL): 10, 50, 100, 150, 200, 250, 500 i 1000. Es mesura la tensió superficial de cada dilució i el resultat s'expressa en una gràfica de manera que s'observen dos grups de punts ben diferenciats, un on la tensió superficial és dependent de la concentració de tensioactiu, i un altre on la tensió superficial n'és independent.

Es fa una recta de regressió per cadascun d'aquests grups de punts i seguidament es busca el punt de tall entre les dues rectes de regressió. Aquest punt ve definit per una tensió superficial i per una concentració de tensioactiu, essent aquesta concentració la CMC.

3.10.3. Capacitat d'emulsificació dels Rhls

Els assajos d'emulsificació dels Rhls purificats per columna d'adsorció s'han portat a terme amb diferents fases hidrofòbiques de composició química diversa: miristat d'isopropil, petroli de Casablanca, oli d'oliva i oli de soja.

Les emulsions s'han preparat per pes (1g final), barrejant prèviament els Rhls amb la fase hidrofòbica i agitant vigorosament durant 1 minut. Després s'afegeix la fase aquosa i es torna a agitar fortament un minut més. Es deixen reposar, sense posterior agitació, durant 24h a temperatura ambient, i passat aquest temps es calcula el percentatge d'emulsificació (E_{24}) (Prieto *et al.*, 2008).

$$E_{24} (\%) = (\text{Alçada de l'emulsió} / \text{Alçada total}) \times 100$$

3.10.4. Elaboració de diagrames de fases ternaris

Entenem com a fase cada una de les parts o zones homogènies d'un sistema. Per tal d'estudiar el comportament fàsic dels sistemes de tipus aigua/tensioactiu/component hidrofòbic (A / Rhls / O) s'han elaborat diagrames ternaris de fases a temperatura constant (25°C) (Rivas *et al.*, 1999; Sadurní *et al.*,

2005). El mètode emprat és el de valoració, que consisteix en addicionar successivament un dels components, normalment l'aigua, als altres dos –tensioactiu i component oliós– a una temperatura determinada. Els components oliosos assajats han estat: miristat d'isopropil, petroli de Casablanca, oli d'oliva i oli de soja.

Es parteix d'uns punts triats consistents en una sèrie de barreges de composicions diferents, amb la mateixa concentració de Rhls (es considera que una concentració inferior seria insuficient i una concentració major seria innecessària per a un bon emulgent), i es varien les concentracions de partida del component oliós. Les composicions es preparen pesant els components a la vegada en vials de vidre que es taquen per tal d'evitar la possible evaporació de la mostra. Un cop feta cada barreja, s'homogeneïtzen les mostres mitjançant un agitador vòrtex. Per tal de mantenir constant la temperatura es treballa amb un bany a 25°C, i després de cada addició d'aigua, les mostres són agitades vigorosament, per tal d'homogeneïtzar-les de nou, i deixades en el bany durant 24h amb l'objectiu que puguin assolir la separació de fases. Totes les mostres s'observen cada 24 hores abans de cada addició d'aigua, tenint en compte que les addicions diàries d'aigua fan variar les concentracions finals de cada component en la barreja.

Els intervals de concentració assajats per cada component del sistema van ser: fase hidrofòbica 5-90%, aigua 0-75% i ramnolípidos 10-20%.

3.10.5. Assajos de solubilitat dels Rhls

Pels assajos de solubilitat dels Rhls purificats per columna d'adsorció s'han utilitzat 10 dissolvents entre orgànics i inorgànics dissolent aproximadament 100 mg de Rhls en 1 mL dissolvent.

Els dissolvents emprats per estudiar la solubilitat són els següents:

H ₂ O	Metanol (CH ₃ OH)
Àcid clorhídric (HCl)	Acetat d'etil (CH ₃ COOCH ₂ CH ₃)
Àcid sulfúric (H ₂ SO ₄)	Èter etílic (CH ₃ CH ₂ OCH ₂ CH ₃)
Hidròxid sòdic (NaOH)	Cloroform (CHCl ₃)
Hidrogenarbonatsòdic (NaHCO ₃)	Hexà (C ₆ H ₁₄)

3.11. Anàlisi qualitativa i quantitativa dels àcids grassos monohidroxilats (MHOD) i dihidroxilats (DHOD)

Pseudomonas aeruginosa 42A2 produeix àcids grassos hidroxilats al medi extracel·lular (Culleré *et al.*, 2001). Per tal d'estudiar les propietats d'aquests àcids grassos primer es recuperen els sobrenedants del cultius per centrifugació en una Centrikon T-124 (Kontron, Itàlia) a 7500 xg durant 20 minuts i s'extreuen per extracció orgànica (Culleré *et al.*, 2001).

3.11.1. Extracció dels àcids grassos hidroxilats

Un cop separats els sobrenedants dels cultius dels microorganismes es procedeix a la seva acidificació mitjançant àcid clorhídric (HCl, Panreac Química S.A., Espanya) concentrat al 37 %, fins arribar a un pH de 2 aproximadament. La dissolució acidificada es conserva a 4°C durant 8 h i passat aquest temps es realitzen dues extraccions orgàniques amb cloroform (CHCl₃, Panreac Química S.A., Espanya). Es separa la fase orgànica amb un embut de decantació i es filtra amb sulfat sòdic anhidre (Na₂SO₄ anhidre, Panreac Química S.A., Espanya) per tal d'absorbir les possibles restes d'aigua. Finalment, s'evapora el dissolvent mitjançant rotaevaporació al buit (BÜCHI RE 111, Suïssa) i es recuperen els àcids grassos hidroxilats (Culleré *et al.*, 2001).

3.11.2. Identificació i quantificació dels àcids grassos hidroxilats

La identificació i quantificació dels Rhls es pot portar a terme per diferents tècniques cromatogràfiques. Les més simples com la cromatografia en capa fina (TLC) que només és qualitativa només ens serveixen per la identificació, mentre que amb tècniques més sofisticades com la cromatografia de gasos (CG) i cromatografia líquida (HPLC) també ens serveixen per quantificar.

3.11.2.1. Identificació per cromatografia en capa fina (TLC)

Es segueix el protocol de TLC descrit a l'apartat 3.9.2.1 canviant la fase que està constituïda per cloroform, metanol i àcid acètic (CHCl₃, MeOH, HAc, Panreac Química S.A., Espanya) en la següent proporció: 45,0:6,0:0,5 (Kuo *et al.*, 1998). El revelat de la fase estacionària es realitza mitjançant la nebulització d'una dissolució concentrada d'àcid fosfomolíbdic (Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Alemanya)

en etanol absolut (Panreac Química S.A., Espanya), seguida d'una exposició de la capa fina a un corrent d'aire calent.

3.11.2.2. Identificació per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC)

Per tal d'identificar els àcids grassos hidroxilats per mitjà de cromatografia líquida d'alta resolució és necessari dissoldre les mostres extretes en 1 mL d'acetonitril (AcN, Panreac Química S.A., Espanya) o en metanol de qualitat HPLC (MeOH HPLC, Panreac Química S.A., Espanya).

Per a l'anàlisi s'utilitza un cromatògraf LC-9A (Shimadzu, Japó) amb un detector de llum dispersa Sedex 55 (Sedere, França). La columna analítica utilitzada és de fase reversa, Tracer Excel 120 C8 5 μm (15 cm x 0,46 cm i.d.; Teknokroma, Espanya). La fase mòbil utilitzada està composta per aigua Mili-Q i acetonitril, acidificats tots dos amb àcid acètic al 0,1 % (v/v), i el programa utilitzat per l'anàlisi és (en percentatge d'acetonitril): 30 %, 0 minuts; 100 %, 10-15 minuts; 30 %, 20 minuts; 30 %, 25 minuts (Culleré *et al.*, 2000). Els cromatogrames obtinguts es processen amb el programa informàtic LabSolutions LCsolution (Shimadzu, Japó).

La identificació dels productes a les mostres es realitza mitjançant patrons comercials, àcid ricinoleic (Fluka, Alemanya), i/o compostos purificats al laboratori.

3.11.2.3. Quantificació per cromatografia de gasos (CG) dels àcids grassos hidroxilats

Per tal d'analitzar els àcids grassos hidroxilats per cromatografia de gasos és imprescindible que aquests siguin volàtils, per això és necessari sotmetre'ls primer a un procés de metilació.

Les mostres es metilen amb diazometà (CH_2N_2) en dissolució etèria diluïda per treballar amb seguretat i així obtenir els èsters metílics dels respectius àcids grassos. Es dissolen 10 mg de la extracció orgànica dels àcids grassos hidroxilats en 1 mL d'èter dietílic (Panreac Química S.A., Espanya) i seguidament s'afegeixen unes gotes del diazometà fins observar una coloració groguenca. Passats 15 minuts el dissolvent s'evapora i es fa passar un corrent de nitrogen sobre la mostra per tal de conservar-la lliure d'humitat per evitar la pèrdua del grup metòxid. És recomanable sotmetre les mostres a metilació en el moment en que han de ser sotmeses a la cromatografia de gasos ja que no són gaire estables.

Per la cromatografia de gasos es fa servir un cromatògraf GC-14A (Shimadzu, Japó) amb una columna TRB-1 (15 m x 0.32 mm x 0,25 μm ;

Teknokroma, Espanya). El programa utilitzat és el següent: 190°C (1 minut); 2°C/minut; 204°C (0 minuts); 5 °C/minut; 230°C (6 minuts); la temperatura del detector (FID) és de 250°C i la de l'injector és de 240°C. Es fa servir heli (He ultra pur, Carbuos Metálicos, Espanya) com a gas portador, a 1,34 mL/minut de cabal volumètric i s'injecta 1 µL de mostra en cada ocasió. Els cromatogrames obtinguts són tractats amb l'integrador C-R4A (Shimadzu, Japó) i es processen amb el programa informàtic LabSolutions GCsolution (Shimadzu, Japó) (Culleré *et al.*, 2000).

La quantificació de les mostres es realitza mitjançant una recta de calibrat externa obtinguda a partir de dissolucions de diferents concentracions d'un patró comercial estandarditzat, el ricinoleat de metil (Fluka, Alemanya) (Culleré *et al.*, 2000).

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

El present treball s'emmarca dins l'àmpli marc de la recerca i estudi de substàncies tensioactives d'origen biològic que porta a terme el grup d'investigació de biotransformació de residus oleaginosos a la Unitat de Microbiologia de la Facultat de Farmàcia de la UB en col·laboració amb el Departament de Microbiologia de la Facultat de Biologia de la UB (Projecte: Biocatalizadores para la producción de emulsionantes poliméricos: optimización del sistema y desarrollo de nuevos productos CTQ 2007-60749/PPQ). La clau per trobar aquests biotensioactius és buscar microorganismes en mostres de sòls o aigües contaminades amb residus olivosos. D'aquesta manera va ser com en 1989 es van aconseguir aïllar les soques que s'estudien en aquest treball –*P. aeruginosa* 47T2 i *P. aeruginosa* 42A2 (Robert, 1989)–, la primera, per la seva capacitat de produir Rhls, i la segona, per ser capaç de transformar olis residuals en àcids grassos hidroxilats i polimeritzar-los a estòlids gràcies a la seva activitat enzimàtica.

Fins l'any 1989, el grup d'investigació va anar fent diversos estudis destinats inicialment a l'aïllament d'aquestes soques com a productores de biotensioactius i, en segon lloc, a la identificació de les soques dins del gènere *Pseudomonas* i l'espècie *aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 i *Pseudomonas sp.* 42A2 NCIB 40005 (Robert, 1989). Finalment la soca 42A2 va ser identificada taxonòmicament a nivell molecular mitjançant l'anàlisi de la seqüència del gen que codifica per l'rRNA 16S com a *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 (Rodríguez, 2006).

El gènere *Pseudomonas* està constituït per un grup de bacteris molt diversos i de gran ubiqüitat ecològica, fet que suggereix una gran capacitat d'adaptació fisiològica i genètica. Es poden trobar espècies de *Pseudomonas* en grans quantitats a la major part dels ambients naturals, tant nínxols terrestres com aquàtics, i tenen la capacitat d'associar-se amb plantes i animals així com amb d'altres bacteris formant biopel·lícules (Spiers *et al.*, 2000). Són un grup de microorganismes aeròbics, no formadors d'espores i bacils rectes o lleugerament corbats d'1.5-5 µm de llarg i 0.5-1 µm d'ample. El seu metabolisme és estrictament respiratori amb l'oxigen com acceptor final d'electrons tot i que algunes soques són capaces de créixer sota condicions anaeròbiques utilitzant nitrat o arginina com a acceptor final d'electrons. Poden presentar un o més flagels polars que atorguen capacitat de moviment al microorganisme (Kiska *et al.*, 2003).

És també un grup divers pel que fa a la morfologia de la colònia i a la pigmentació. Es poden observar, principalment, dos tipus de colònies produïdes per aquests microorganismes en medi sòlid comú com pot ser el TSA: una és llarga, suau, amb límits llisos i el centre elevat, i l'altra colònia és petita rugosa i convexa.

El material clínic és una bona font per al primer tipus de colònia mentre que el segon tipus sovint és obtingut de fonts naturals. Un tercer tipus de colònia (mucosa) es pot obtenir de les vies respiratòries i urinàries (Kiska *et al.*, 2003). Pel que fa a la pigmentació, *Pseudomonas* produeix pioverdina i piocianina (pigments verds i marrons respectivament) i algunes soques poden produir pigments vermell fosc corresponents a melanines. Algunes espècies es poden multiplicar a 4°C però la majoria són mesòfiles, amb temperatures òptimes de creixement d'entre 30 i 37°C (Kiska *et al.*, 2003).

L'espècie *Pseudomonas aeruginosa* (Fig.1.1) no només destaca per la seva versatilitat mediambiental, sinó també per la seva capacitat de causar malalties en individus susceptibles per tractar-se d'un patogen oportunista que afecta persones immunodeprimides, i per la seva resistència a molts antibiòtics.



Figura 4.1. Tinció de gram de les cèl·lules de *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 (Microscopi Leica DM100, Alemanya).

P. aeruginosa produeix el biotensioactiu ramnolípíd com a part de la resposta del sensor de quòrum RhIR (Ochsner *et al.*, 1994). En condicions de laboratori aquest bacteri produeix dues formes d'aquest glicolípid, una conté una molècula de ramnosa i l'altra en té dues. És un bacteri capaç de fer servir un ampli rang de compostos orgànics com a nutrients i fonts de carboni, incloent compostos aromàtics, derivats halogenats i residus orgànics recalcitrants (Stainer *et al.*, 1966). És això el que li dóna l'excel·lent habilitat de colonitzar fins i tot nínxols ecològics on els nutrients són limitats. Així, *P. aeruginosa* és àmpliament estudiat no només per la seva capacitat de causar malalties com a patogen oportunista i resistir als antibiòtics, sinó també per la seva capacitat metabòlica i la seva versatilitat mediambiental.

4.1. Estudi comparatiu del sistema lipolític de la soca *P. aeruginosa* 47T2 amb la soca tipus *P. aeruginosa* PA01

Estudis previs realitzats al nostre laboratori van aconseguir identificar taxonòmicament les dues soques utilitzades en aquest treball (*P. aeruginosa* 47T2 i 42A2) i detectar la seva capacitat de produir biotensioactius. El següent pas, per tant, va consistir en fer l'anàlisi i caracterització d'aquests productes per tal de determinar la seva estructura i les seves característiques biològiques i fisicoquímiques. Però al llarg d'aquesta investigació no només s'han anat caracteritzant aquests productes, sinó que s'ha descobert de manera paral·lela que existeixen trets diferenciadors a nivell de metabolisme lipídic entre ambdues soques i probablement no només entre elles sinó també amb la soca tipus *P. aeruginosa* PA01. Mentre que *P. aeruginosa* 47T2 té la capacitat de produir ramnolípid (Rhl) com a tret característic de l'espècie (Lang *et al.*, 1999), *P. aeruginosa* 42A2 no en produeix, però en canvi és capaç de transformar els olis residuals en àcids grassos hidroxilats (mono-, di- i trihidroxilats) i polimeritzar-los gràcies a la seva activitat lipolítica (Peláez *et al.*, 2003).

Existeixen molts factors que poden influir en el metabolisme dels lípids i, en conseqüència, en els productes derivats de la seva bioconversió. A nivell mediambiental, tant les condicions de cultiu com la composició del medi de creixement i la font de carboni són factors determinants que poden fer variar els productes del metabolisme, tant del central com del lipídic. Factors ambientals com ara la temperatura o el pH, poden fer augmentar o disminuir l'activitat metabòlica cel·lular i afavorir l'acció d'uns o altres enzims (Berg *et al.*, 2007). La limitació de nutrients com ara el nitrogen o el fòsfor i un excés de font de carboni pot fer que el bacteri acumuli PHAs en forma de grànuls intracel·lulars, biopolímers que actuen com a reservori de font de carboni i poder reductor per la cèl·lula. A nivell biotecnològic, aquests factors són molt importants i alguns estudis anteriors realitzats al grup d'investigació es van centrar precisament en optimitzar la producció dels biopolímers de PHAs, modificant les condicions de cultiu (Rodríguez, 2006), o bé en la modificació de la composició dels PHAs amb diferents fonts de carboni (Bassas, 2007).

Però els factors ambientals no són totalment determinants, ja que a igualtat de condicions el metabolisme lipídic de dues soques de la mateixa espècie pot funcionar de manera diferent depenent del seu contingut genètic. El fet que l'ADN del bacteri contingui o no una sèrie de gens i/o operons marca la dotació enzimàtica d'aquests que serà, en últim terme, determinant també pel metabolisme. Així, el nombre i la mida dels grànuls de PHAs per exemple és

depenent de cada microorganisme, en funció de la seva dotació genètica i enzimàtica (Anderson *et al.*, 1990). Podem dir que, en funció de les PHA sintases, la font de carboni utilitzada i les rutes metabòliques implicades en la producció dels grànuls (Madison *et al.*, 1999; Rehm *et al.*, 1999), la composició dels PHAs també serà diferent. En la producció de RhIs (biotensioactius de naturalesa glucolípidica) per exemple, a igualtat de condicions de temperatura, pH, aireig, nutrients i font de carboni, *P. aeruginosa* 47T2 és capaç de produir-los i secretar-los al medi de cultiu, mentre que en la soca *P. aeruginosa* 42A2 no s'ha descrit mai la producció d'aquests biotensioactius.

Així doncs, donada la importància de la dotació gènica i enzimàtica del bacteri sobre el metabolisme i havent detectat diferències en el seu metabolisme lipídic entre les soques utilitzades en aquest treball, s'ha considerat convenient començar la investigació fent l'estudi del sistema lipolític de les dues soques per veure si les diferències detectades a nivell de producció de polímers extracel·lulars té alguna relació amb possibles diferències a nivell enzimàtic i/o genètic relacionades amb la producció d'enzims lipolítics (Wilhelm *et al.*, 2007).

4.1.1. Activitat lipasa de *P. aeruginosa* 47T2 i *P. aeruginosa* PA01

L'activitat lipasa es caracteritza per mitjà de diferents proves, assajos en gels d' SDS-Page i zimogrames, estudis de preferència de substrat, estudis de temperatura i pH òptims i d'estabilitat al pH i a la temperatura.

Donat que al grup de recerca ja s'ha iniciat l'estudi de l'activitat lipasa de la soca *P. aeruginosa* 42A2 (Bofill *et al.*, 2009), en aquest treball s'ha decidit realitzar la caracterització del sistema lipolític de la soca *P. aeruginosa* 47T2, comparant-la amb la soca tipus *P. aeruginosa* PA01, a través de l'estudi de l'activitat lipasa tant d'extractes cel·lulars (activitat intracel·lular) com en mostres de medi de cultiu (activitat secretada).

4.1.1.1. Detecció de l'activitat lipolítica de les soques mitjançant proves en paper i zimograma

Per tal de saber si aquestes soques són lipolíticament actives a nivell intra i/o extracel·lular, a partir de cultius de 12 hores de les soques *P. aeruginosa* 47T2 i *P. aeruginosa* PA01, es procedeix a l'obtenció de les fraccions extracel·lulars mitjançant centrifugació i recuperació dels sobrenedants dels cultius, i a l'aïllament dels extractes cel·lulars per sonicació i lisi de les cèl·lules crescudes, tal com es

descriu a l'apartat 3.6.1. Totes dues fraccions –intra i extracel·lular– es concentren abans d'avaluar-ne l'activitat lipolítica a través de diferents aproximacions.

Un cop obtingudes les diferents fraccions, els extractes cel·lulars (10X) per una banda i els sobrenedants (50X) per l'altra, és necessari comprovar si tenen o no activitat lipolítica i això es realitza mitjançant una prova ràpida qualitativa de detecció d'activitat en paper utilitzant MUF-butirat com a substrat i les dilucions 1/50 en tampó fosfat pH 7 10mM de les dues fraccions (Diaz *et al.*, 1999).

Aparentment totes dues fraccions són lipolíticament actives si les comparem amb els controls ja que mostren fluorescència en entrar en contacte amb el MUF-butirat (Fig. 4.2). Però el fet que ambdues soques de *Pseudomonas* siguin intrínsecament fluorescents degut a la producció de pigments (Kiska *et al.*, 2003), podria portar a resultats confusos i són necessaris altres tipus d'anàlisi per confirmar-ho. Així, es realitza l'anàlisi electroforètica de proteïnes en condicions desnaturalitzants i una anàlisi zimogràfica tant dels sobrenedants com dels extractes cel·lulars de les dues soques *P. aeruginosa* PA01 i 47T2.

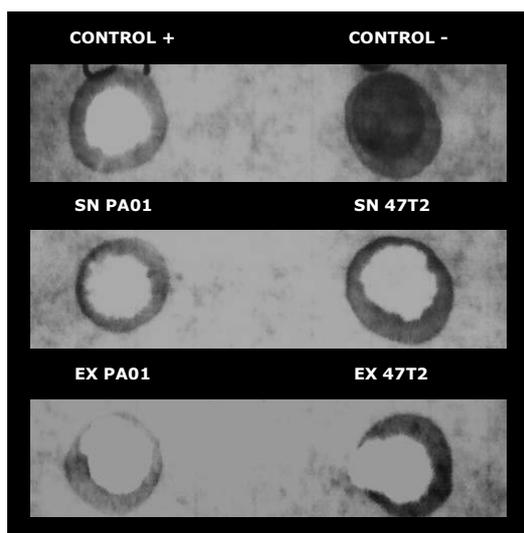


Figura 4.2. Detecció d'activitat lipolítica en suport de paper de filtre sobre MUF-butirat. **CONTROL+:** lipasa comercial (Lipoprotein lipase, de *Pseudomonas* sp., Sigma-Aldrich, EEUU) com a control positiu d'activitat lipolítica; **CONTROL-:** tampó fosfat com a control negatiu (pH7, 50mM); **SN PA01:** sobrenedant 50X concentrat de *P. aeruginosa* PA01; **SN 47T2:** sobrenedant 50X concentrat de *P. aeruginosa* 47T2; **EX PA01:** extracte concentrat 10X de *P. aeruginosa* PA01; **EX 47T2:** extracte concentrat 10X de *P. aeruginosa* 47T2.

Amb l'anàlisi electroforètica de proteïnes per tinció amb Coomassie s'obté el patró típic corresponent a l'extracte cel·lular i el sobrenedant de *Pseudomonas*, on les proteïnes presenten una mobilitat anòmala quan no han estat desnaturalitzades per ebullició, però amb aparició de bandes ben definides després del tractament tèrmic. Aquesta tinció de proteïnes no es mostra per no tenir suficient rellevància en l'estudi de lipases i esterases, ja que no es detecten amb aquesta tinció donat que es produeixen en baixa quantitat en relació a altres proteïnes de l'extracte i el sobrenedant. Per aquest motiu es realitzen zimogrames de les mostres que sí que ens permeten detectar aquest tipus d'enzims perquè són molt actius.

El zimograma de les dues soques mostra bandes amb activitat lipolítica sobre MUF-butirat tant al sobrenedant com a l'extracte cel·lular cru (fig. 4.3).

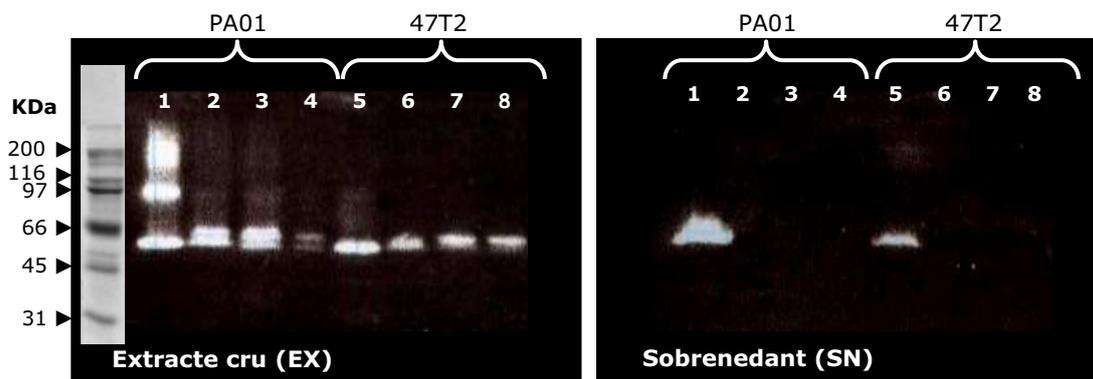


Figura 4.3. Zimograma del contingut proteic del sobrenedant (EX) i l'extracte cru (SN) de les soques *P. aeruginosa* 47T2 i *P. aeruginosa* PA01. **1.** EX i SN PA01 sense bullir. **2.** EX i SN PA01 després de bullir-lo 30 segons. **3.** EX i SN PA01 després de bullir-lo 5 minuts. **4.** EX i SN PA01 després de bullir-lo 10 minuts. **5.** EX i SN 47T2 sense bullir. **6.** EX i SN 47T2 després de bullir-lo 30 segons. **7.** EX i SN 47T2 després de bullir-lo 5 minuts. **8.** EX i SN 47T2 després de bullir-lo 10 min. L'activitat lipolítica de les proteïnes separades per SDS-PAGE es detecta mitjançant anàlisi zimogràfica amb MUF-butirat previ a la tinció de Coomassie (Diaz *et al.*, 1999).

Al zimograma de l'extracte cel·lular de la soqueta *P. aeruginosa* PA01 (figura 4.3. EX carril 1) s'observa un patró de bandes amb mobilitat molt dispersa que inicialment semblen agregats enzimàtics, fet extensament descrit en referència als enzims lipolítics (Diaz *et al.*, 1999; Prim *et al.*, 2006; Bofill *et al.*, 2009) i que fa que la major part de l'activitat es trobi localitzada a la meitat superior del gel. Quan es procedeix a bullir les mostres de les dues soques a diferents temps per tal d'aconseguir un patró més ben diferenciat de les proteïnes que presenten activitat lipolítica (carrils 2, 3 i 4 on s'ha sotmès l'extracte a un tractament tèrmic de 100°C durant 30 segons, 5 minuts i 10 minuts respectivament), s'observa el procés de desagregació amb aparició de dues bandes entre 60 i 66 kDa, que perden intensitat i, per tant, activitat a mida que augmenta el temps d'ebullició, probablement per la desnaturalització dels enzims causada pel tractament tèrmic. La pèrdua d'intensitat a mesura que s'incrementa el temps d'ebullició és més evident sobre la banda de major mobilitat (60kDa), mentre que aparentment, la disminució d'intensitat d'aquesta banda contribueix a incrementar la intensitat de fluorescència de la banda de menor mobilitat (66kDa). Aquest és un fet observat amb freqüència en l'anàlisi zimogràfica d'enzims lipolítics, on sovint apareixen bandes que redueixen la seva intensitat després del tractament tèrmic a expenses de provocar un increment en la intensitat de fluorescència de bandes amb una mobilitat lleugerament superior

o inferior. Això probablement sigui degut a que en fer un tractament tèrmic suau de les mostres, la desagregació produïda sobre els enzims lipolític no arriba a mostrar la forma totalment desnaturalitzada de l'enzim i això li provoca una mobilitat anòmala, encara que propera a la real (Bofill *et al.*, 2009). Pel que fa al patró del zimograma corresponent a extractes de la soca *P. aeruginosa* 47T2, només s'observa una de les dues bandes, al voltant de 60 kDa en la mostra sense bullir (figura 4.3. EX carril 5), mentre que als diferents temps d'ebullició (figura 4.3. EX carrils 6,7 i 8) s'observa únicament la presència de la banda de mobilitat inferior (66 kDa), confirmant les observacions prèvies. A més a més, cal destacar que la quantitat d'agregats és major en la soca PA01 que en la 47T2 (figura 4.3. EX carrils 1 i 5) i que també mostren més intensitat en general les bandes de 60 i 66 kDa que apareixen en els carrils on s'ha bullit la mostra (figura 4.3. EX carrils 2 i 3 respecte 6 i 7). Això podria ser degut a una major producció d'enzims lipolítics en la soca PA01 que en la 47T2, i el fet que la concentració d'enzims amb tendència a l'agregació sigui major pot dificultar la desagregació de les proteïnes provocada pel tractament tèrmic. De nou aquest fet justificaria l'aparició simultània de les dues bandes de 60 i 66 kDa en les mostres d'extracte corresponents a la soca PA01, que no apareixen simultàniament en els extractes de la soca 47T2 degut a que s'hi ha carregat una menor quantitat d'enzim.

Tot i que es podria pensar que les bandes de 60 i 66 kDa corresponen a dos enzims diferents, aquest mateix efecte s'ha observat en ocasions anteriors per a lipases i esterases purificades, on s'ha demostrat clarament que la banda de mobilitat lleugerament superior apareix en mostres no bullides i puja cap a zones de mobilitat inferior quan es fa un suau tractament tèrmic (Prim *et al.*, 2006; Bofill *et al.*, 2009). D'acord amb la bibliografia, les esterases intracel·lulars descrites per *Pseudomonas aeruginosa* presenten una mida de 58-67kDa, mida que s'ajusta plenament al pes molecular observat en els zimogrames dels extractes cel·lulars de les dues soques (Wilhelm *et al.*, 1999; Sugihara *et al.*, 2002).

Pel que fa als sobrenedants, no s'observen diferències en quant al número de bandes amb activitat lipolítica sobre MUF-butirat entre la soca tipus (PA01) i la soca salvatge (47T2), ambdues soques mostren una única banda d'uns 60 kDa en mostres no bullides mentre que l'activitat desapareix totalment quan es realitza un tractament tèrmic, encara que aquest sigui molt suau. Normalment en un zimograma de sobrenedant de *Pseudomonas aeruginosa* apareixen precisament bandes d'activitat lipolítica de 58-60 kDa, corresponents a dímers de les lipases (Bofill *et al.*, 2009). La forma monomèrica de les lipases secretades per *Pseudomonas aeruginosa* té una mida de 30 kDa, però aquesta forma monomèrica no es detecta en el zimograma ja que la forma activa és el dímer, que desapareix

quan es fa una ebullició superior a 1 minut (Jaeger *et al.*, 1999; Martínez *et al.*, 2001, Bofill *et al.*, 2009). També podem destacar una major intensitat de fluorescència a la banda corresponent a la soca tipus *P. aeruginosa* PA01 respecte a la soca 47T2 (Figura 4.3 SN carrils 1 (PA01) i 5 (47T2)), que pot ser degut a la producció d'una major concentració d'enzims extracel·lulars o bé a que aquests siguin més actius. Per altra banda, cal comentar que l'enzim o complex enzimàtic al qual correspon la banda de 60kDa observada és molt més termosensible que el de l'extracte ja que només bullint a 100°C 30 segons els SN (Figura 4.3 SN carrils 2 i 6) ja no es detecta activitat.

Globalment, i atenent a les diferències observades en la intensitat de fluorescència de les bandes amb activitat sobre MUF-butirat, sembla que, per cultius de 12 hores amb similar densitat òptica, la soca *P. aeruginosa* 47T2 té menys activitat lipolítica que la soca tipus PA01. Aquest resultat es confirma quan calculem les unitats d'activitat enzimàtica per mg de proteïna tant a nivell d'extracte com de sobrenedant, on s'observa que mentre que a *P. aeruginosa* PA01 es troben 11,2 mU/mg de proteïna a l'extracte i 10,2 mU/mg de proteïna al sobrenedant, *P. aeruginosa* 47T2 mostra 9,2 mU/mg de proteïna a l'extracte i 9,3 mU/mg de proteïna al sobrenedant.

Els patrons electroforètics observats tant en tinció de Coomassie com en zimograma per a extractes i sobrenedants de les soques PA01 i 47T2 són molt similars als que es troben quan s'analitzen extractes cel·lulars i sobrenedants de la soca *P. aeruginosa* 42A2 crescuda en les mateixes condicions, que mostra els mateixos efectes d'agregació i mobilitat anòmala detectats en els extractes cel·lulars, amb bandes d'activitat de 60 i 66kDa, i una única banda amb activitat de 60kDa en les mostres de sobrenedant (Bofill *et al.*, 2009).

L'anàlisi del sistema lipolític de la soca *P. aeruginosa* 47T2 mitjançant gels d' SDS-PAGE i zimogrames dels extractes cel·lulars i dels sobrenedants realitzats en aquesta tesi, juntament amb les mateixes anàlisis portades a terme per un altre membre del nostre grup de recerca amb la soca *P. aeruginosa* 42A2 (Bofill *et al.*, 2009), indiquen l'existència en totes dues soques d'un sistema lipolític complex, constituït per almenys un enzim intracel·lular d'uns 66kDa i un o més enzims extracel·lulars que només mostren activitat en zimograma quan les mostres no han estat tractades a 100°C i amb una mida aparent de 60kDa, que tal com s'ha vist en el cas de la soca *P. aeruginosa* 42A2, correspon a la forma dimèrica de les lipases LipA i LipC. La forma monomèrica d'aquestes dues lipases no mostra activitat en zimogrames (Bofill *et al.*, 2009). Probablement els enzims amb activitat lipolítica detectats en aquestes anàlisis es corresponguin amb lipases i/o esterases que participen del metabolisme dels lípids a la cèl·lula. Amb aquestes evidències per

tant, es procedeix a realitzar la caracterització bioquímica de l'activitat lipolítica de la soca *P. aeruginosa* 47T2, realitzant assajos de rang de substrats, pH i temperatura òptima, i estabilitat, sempre comparant-los amb la soca tipus *Pseudomonas aeruginosa* PA01.

4.1.1.2. Determinació de l'especificitat de substrat

El rang de substrats del sistema lipolític de les soques estudiades es determina mitjançant l'assaig colorimètric descrit a l'apartat 3.6.4.2. de Materials i Mètodes, utilitzant els extractes cel·lulars i els sobrenedants preparats com s'ha descrit anteriorment, a 37°C de temperatura i a pH 7.

Per determinar l'especificitat de substrat es fan servir una sèrie de derivats del *p*-NP de longitud de cadena variable: *p*-NP-acetat (C₂), *p*-NP-butirat (C₄), *p*-NP-valerat (C₅), *p*-NP-caproat (C₆), *p*-NP-caprilat (C₈), *p*-NP-caprat (C₁₀), *p*-NP-laurat (C₁₂), *p*-NP-palmitat (C₁₆), *p*-NP-estereat (C₁₈), dissolts en isopropanol.

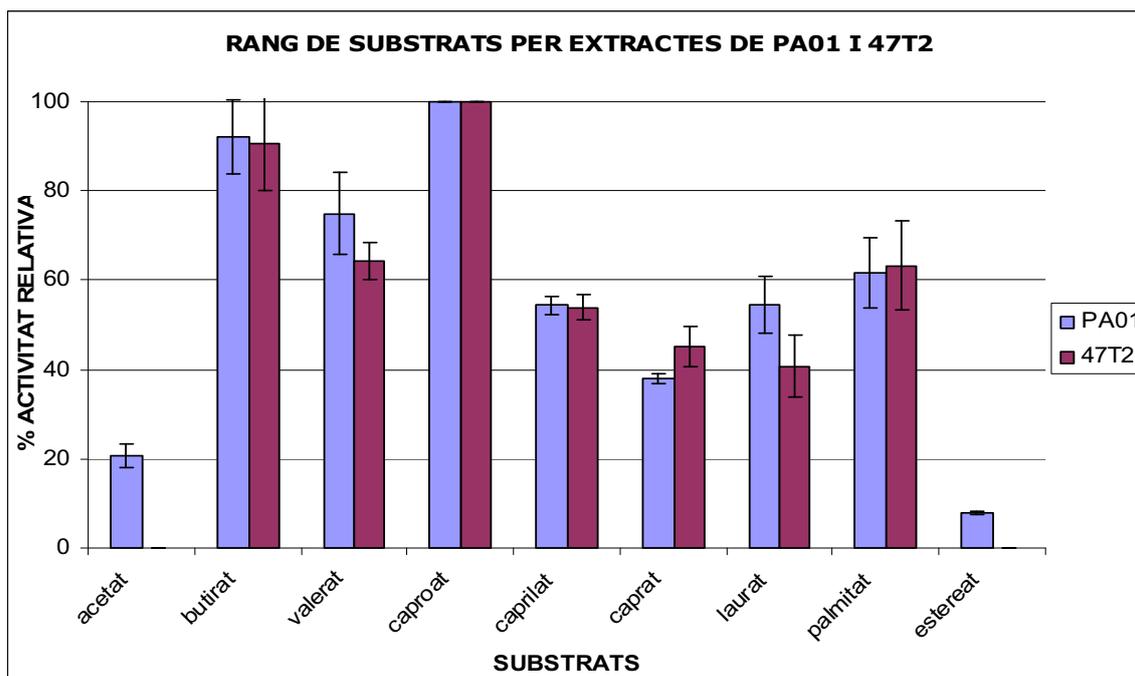


Figura 4.4. Rang de substrats dels extractes de *P. aeruginosa* PA01 i 47T2.

Com es pot observar a la figura 4.4, l'activitat lipolítica als l'extractes tant de la soca PA01 com la de la soca 47T2 és més efectiva per substrats d'entre 4 carbonis *p*-NP-butirat (92-90%) i 6 carbonis *p*-NP-caproat (100-100%), mantenint en el cas de la soca PA01 un 75% de l'activitat sobre el substrat de 5 carbonis *p*-NP-valerat, mentre que la soca 47T2 només conserva un 64% de l'activitat sobre aquest mateix substrat. En canvi, l'activitat lipolítica intracel·lular disminueix per

sota del 65% quan fem servir substrats de cadena mitja-llarga (PA01-47T2: *p*-NP-caprilat (C₈) 54-54%, *p*-NP-caprat (C₁₀) 38-45%, *p*-NP-laurat (C₁₂) 54-41%, *p*-NP-palmitat (C₁₆) 62-63%), arribant a desaparèixer sobre el *p*-NP-estereat (C₁₈) a la soca 47T2 i ser residual en el cas de la PA01 (8%).

Així, l'activitat lipolítica dels extractes d'ambdues soques presenta una clara preferència sobre substrats d'entre 4 i 6 carbonis, típica de les esterases que trenquen preferencialment enllaços èster d'àcids grassos de cadena curta, i la seva activitat enzimàtica es veu restringida a èsters solubles en aigua (Fojan *et al.*, 2000; Chahinian *et al.*, 2002; Prim *et al.*, 2006). En general, les esterases microbianes són enzims de localització intracel·lular de funció fisiològica desconeguda, ja que no semblen ser essencials pel creixement tot i que es creu que juguen un paper important en el metabolisme cel·lular dels lípids i en l'arquitectura de les membranes (Schmid *et al.*, 1998). Tenint en compte això i donat que les esterases descrites prèviament per *Pseudomonas aeruginosa* mostren capacitat d'autotransport cap a la membrana de la cèl·lula (Wilhelm *et al.*, 2007) després de ser produïdes a l'interior cel·lular (Arpigny *et al.*, 1999), es pot pensar que l'activitat lipolítica que es detecta als extractes correspon efectivament a una activitat esterasa. Però per confirmar-ho, seria necessari clonar el gen que codifica per aquesta activitat i fer els assajos corresponents amb els respectius enzims purificats.

Pel que fa a l'activitat trobada al sobrenedant, les preferències de substrat canvien (Fig. 4.5) amb respecte a l'especificitat detectada a la fracció intracel·lular. En sobrenedants la preferència és per substrats de cadena mitja-llarga, essent del 100% sobre el *p*-NP-caprilat (C₈), i disminuint per sota del 70% de l'activitat en la resta de substrats assajats: 70-48% en el *p*-NP-caproat (C₆), 54-60% en el *p*-NP-caprat (C₁₀), 40-61% en el *p*-NP-laurat (C₁₂) i 55-58% en el *p*-NP-palmitat (C₁₆), observant-se els mateixos resultats per les dues soques assajades (PA01-47T2 respectivament). Per contra, amb substrats de cadena curta, en tots dos casos l'activitat disminueix per sota del 55% (*p*-NP-butirat (C₄) 54-36%, *p*-NP-valerat (C₅) 45-16%). Aquesta preferència de substrats és més pròpia de les lipases que hidrolitzen preferentment àcids grassos de cadena mitja/llarga insolubles en aigua i tenen poca capacitat per hidrolitzar àcids grassos de cadena curta (Jaeger *et al.*, 1999; Chahinian *et al.*, 2002). Justament això és el que s'espera trobar en els sobrenedants ja que generalment les lipases són enzims secretats al medi de cultiu (Nthangeni *et al.*, 2001) i en el cas de *Pseudomonas aeruginosa* les lipases descrites són extracel·lulars (Wohlfarth *et al.*, 1992; Arpigny *et al.*, 1999; Castro *et al.*, 2004). No obstant caldria clonar el gen que codifica per cada enzim i fer-ne els assajos d'activitat corresponents per corroborar-ho.

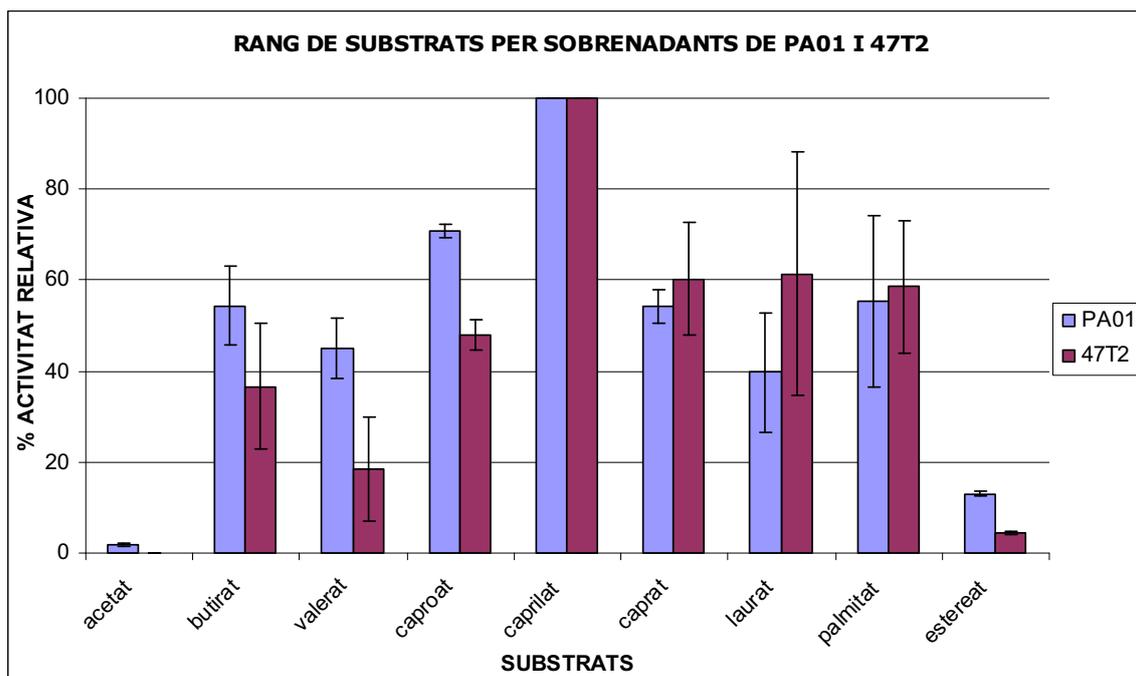


Figura 4.5. Rang de substrats dels sobrenedants de *P. aeruginosa* PA01 i 47T2.

A la vista dels resultats obtinguts pel que fa a l'especificitat de substrats podem dir que no existeixen diferències significatives entre les preferències dels complexos lipolítics de sobrenedant i extracte entre la soca tipus *P. aeruginosa* PA01 i la soca aïllada de mostres d'aigües contaminades amb residus oliosos 47T2.

S'han trobat resultats similars d'especificitat de substrat per la soca *P. aeruginosa* 42A2, que presenta preferència per *p*-NP-caproat en extractes cel·lulars i per *p*-NP-caprilat en sobrenedants, i mostra una resposta molt semblant pel que fa als altres substrats (Bofill *et al.*, 2009).

4.1.1.3. Determinació de la temperatura òptima

Per tal de determinar la temperatura òptima d'actuació del sistema lipolític tant intracel·lular com extracel·lular de les dues soques i poder-les comparar entre elles i amb la de *P. aeruginosa* 42A2, s'analitza l'activitat lipolítica sobre els substrats de preferència per cada fracció, *p*-NP-caproat en els extractes i *p*-NP-caprilat en els sobrenedants, en un rang de temperatures de 4°C a 60°C. Els assajos es realitzen a pH neutre, tal i com s'ha descrit en l'apartat 3.6.4.2.

La temperatura òptima d'activitat lipolítica en els extractes cel·lulars és similar en ambdues soques (Fig.4.6), que mostren els seus màxims d'activitat al voltant dels 40°C, tot i que a 50°C mantenen encara un 94% (PA01) i 95% (47T2) d'activitat. Per sobre d'aquesta temperatura l'activitat disminueix bruscament de

manera que a 60°C PA01 conserva tan sols un 26% d'activitat i 47T2 un 13%.

És de destacar la considerable activitat que totes dues soques mostren a temperatures inferiors a 30°C, fet que suggereix l'existència d'algun enzim lipolític capaç d'actuar en condicions psicròfiles.

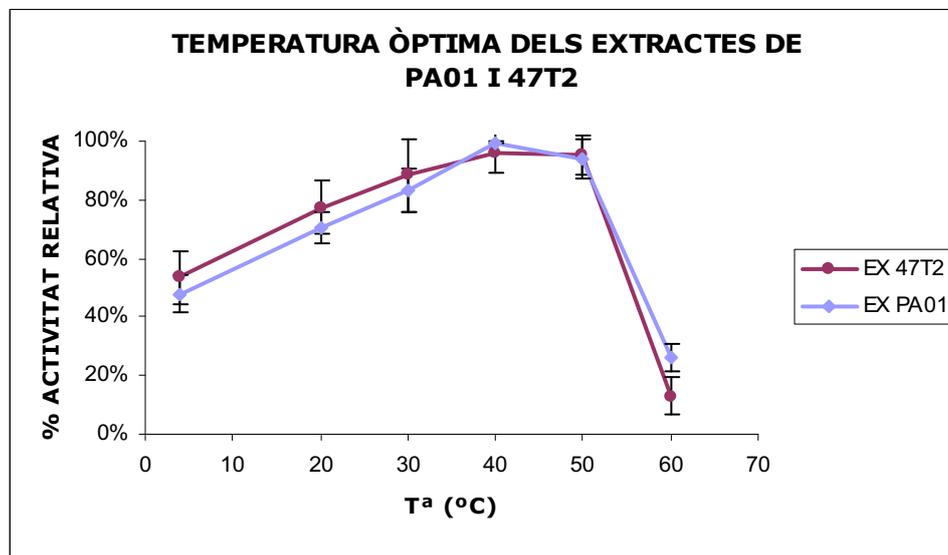


Figura 4.6. Efecte de la temperatura sobre l'activitat lipolítica dels extractes cel·lulars de *P. aeruginosa* PA01 i *P. aeruginosa* 47T2.

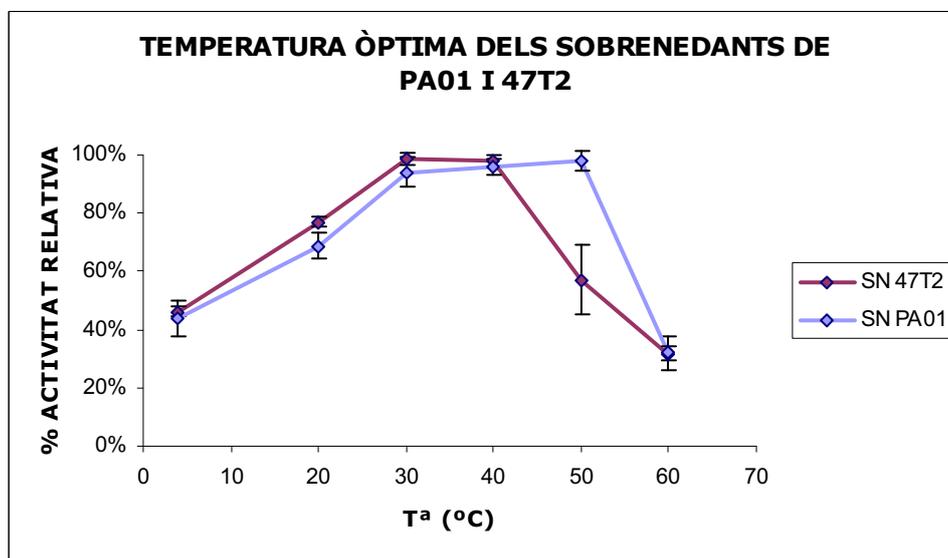


Figura 4.7. Efecte de la temperatura sobre l'activitat lipolítica dels sobrenedants de *P. aeruginosa* PA01 i *P. aeruginosa* 47T2.

Pel que fa a la temperatura òptima d'actuació en els sobrenedants aquesta es troba entre 30°C i 40°C en *P. aeruginosa* 47T2 i entre 40°C i 50°C en la soca tipus *P. aeruginosa* PA01 (Fig. 4.7). Cal destacar que entre el rang de temperatures

de 20°C a 50°C, l'activitat lipolítica és superior al 50% en ambdues soques i que a 40°C els sobrenedants de la soca *P. aeruginosa* 47T2 conserven un 98% de la seva activitat, encara que aquesta cau per sota del 60% a 50°C, tot i que es manté elevada en sobrenedants de la soca *P. aeruginosa* PA01. En aquest cas també es manté relativament elevada l'activitat a temperatures baixes, suggerint la presència en els sobrenedants d'una lipasa amb activitat a baixes temperatures.

El fet que els gràfics de temperatura òptima no siguin els típics obtinguts amb enzims purificats, amb un clar pic de preferència de temperatura, i que fins i tot a 4°C tant en els extractes com en els sobrenedants es mantingui l'activitat lipolítica detectada al voltant del 50%, fa pensar que estan actuant més d'un enzim amb diferents temperatures òptimes d'actuació. Si comparem aquests assajos amb els realitzats amb la soca *P. aeruginosa* 42A2, efectivament només en el sobrenedant s'han clonat i caracteritzat dos tipus de lipases –LipA i LipC– que en ser analitzades a nivell individual després de ser purificades mostren dues temperatures òptimes d'actuació diferents, al voltant dels 30°C la lipasa LipA i prop dels 4°C la lipasa LipC (Bofill *et al.*, 2009), fet que justificaria els resultats trobats per les soques PA01 i 42A2, de patró lipolític gairebé idèntic.

A grans trets es pot afirmar que no es detecten diferències significatives entre les temperatures òptimes d'actuació del complex lipolític de l'extracte entre *P. aeruginosa* PA01 i la soca aïllada de mostres de sòls contaminats amb residus oliosos 47T2. Pel que fa al sobrenedant, es detecten petites diferències, una major temperatura d'actuació de les lipases de *P. aeruginosa* PA01. Tot i que es podria arribar a parlar d'enzims termòfils, per poder-ho confirmar seria necessària la clonació dels gens que codifiquen per cada enzim i fer els assajos d'activitat corresponents amb els enzims purificats.

4.1.1.4. Determinació del pH òptim

La determinació del pH òptim es porta a terme estudiant l'efecte del pH sobre l'activitat enzimàtica del sistema lipolític de les soques *P. aeruginosa* PA01 i 47T2 tant a nivell intracel·lular com extracel·lular per comparar-los. S'analitza la seva activitat lipolítica sobre els substrats de preferència per cada fracció, *p*-NP-caproat en els extractes i *p*-NP-caprilat en els sobrenedants, a 37°C de temperatura i en un rang de pH d'entre 3 i 12, tal i com s'ha descrit a l'apartat 3.6.4.2.

En els extractes cel·lulars l'activitat lipolítica es detecta dins un estret rang de pH, localitzant-se el pH òptim d'actuació a pH 9 amb tampó Tris-HCl, tot i que a pH 8 d'aquest mateix tampó *P. aeruginosa* 47T2 manté un 97% d'activitat i la soca PA01 manté el 85% de l'activitat màxima. L'activitat disminueix fins al 50% a pH

neutre i es veu completament inhibida entre els pH assajats de 3 a 6 amb els tampons citrat i succinat, i de 9 a 12 amb el tampó glicina (Fig. 4.7). Els enzims lipolítics intracel·lulars de les soques PA01 i 47T2 mostren una major activitat en el rang de pH bàsic, mentre que altres esterases intracel·lulars bacterianes presenten màxima activitat a pH entre 5,5 i 7,5 (Zock *et al.*, 1994, Fojan *et al.*, 2000).

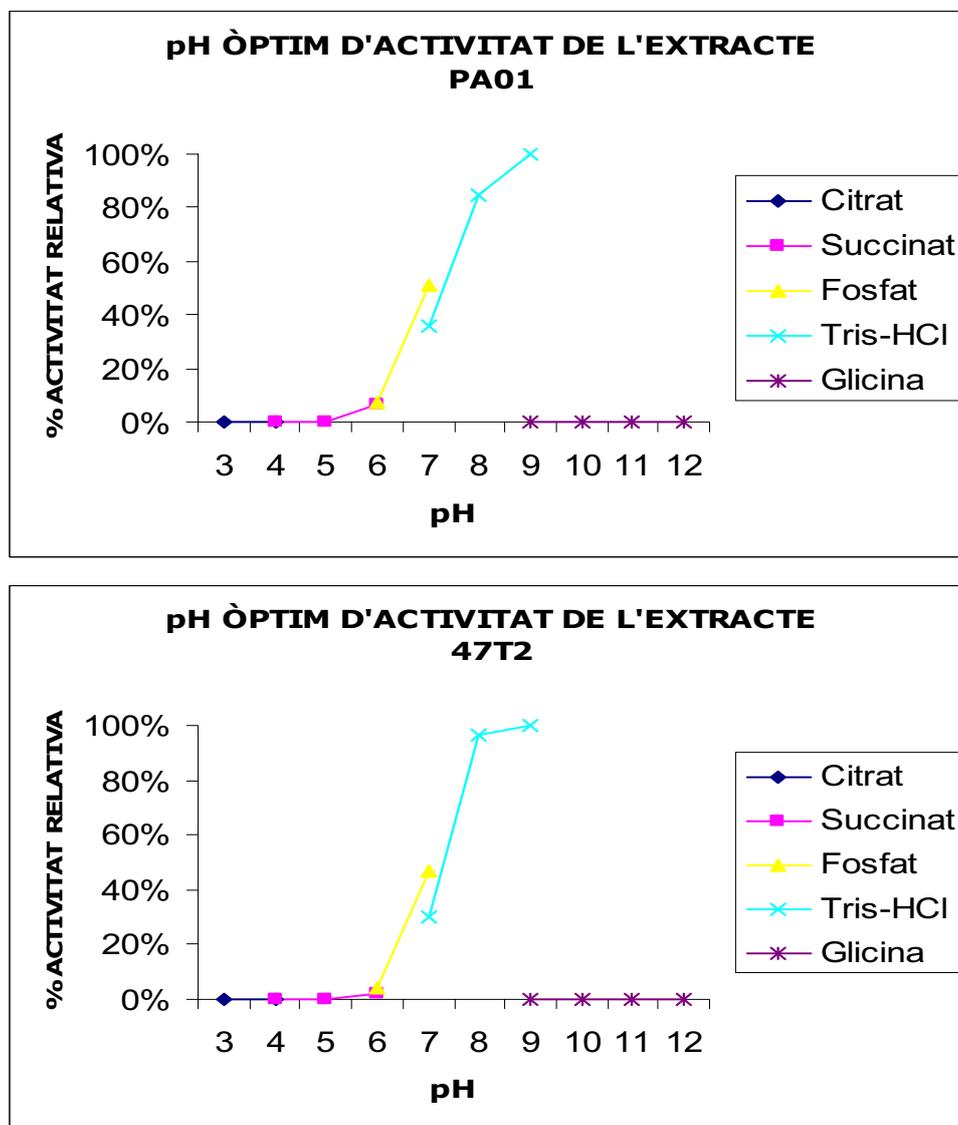


Figura 4.8. Efecte del pH sobre l'activitat lipolítica dels extractes cel·lulars de *P. aeruginosa* PA01 i *P. aeruginosa* 47T2.

Els sobrenedants, tant el de la soca tipus PA01 com el de la soca 47T2, mostren major activitat lipolítica en un rang de pH al voltant del neutre, entre 6 i 8, amb un màxim d'activitat a pH 8. Les lipases d'espècies de *Pseudomonas* descrites a la bibliografia mostren un màxim d'activitat en un rang de pH entre 7.0 i 9.0 (Gilbert *et al.*, 1991; Wahaba *et al.*, 1999), molt proper al trobat en aquest treball.

A més a més, la soca tipus PA01 manté gairebé el 100% de l'activitat a pH 6 i 7, mentre que la soca 47T2 a pH 6 del tampó succinat manté un 90% de l'activitat i, en canvi, a pH 7 amb Tris-HCl disminueix per sota del 80%. Per sobre i per sota d'aquest rang, es detecta molt poca activitat (Fig. 4.8).

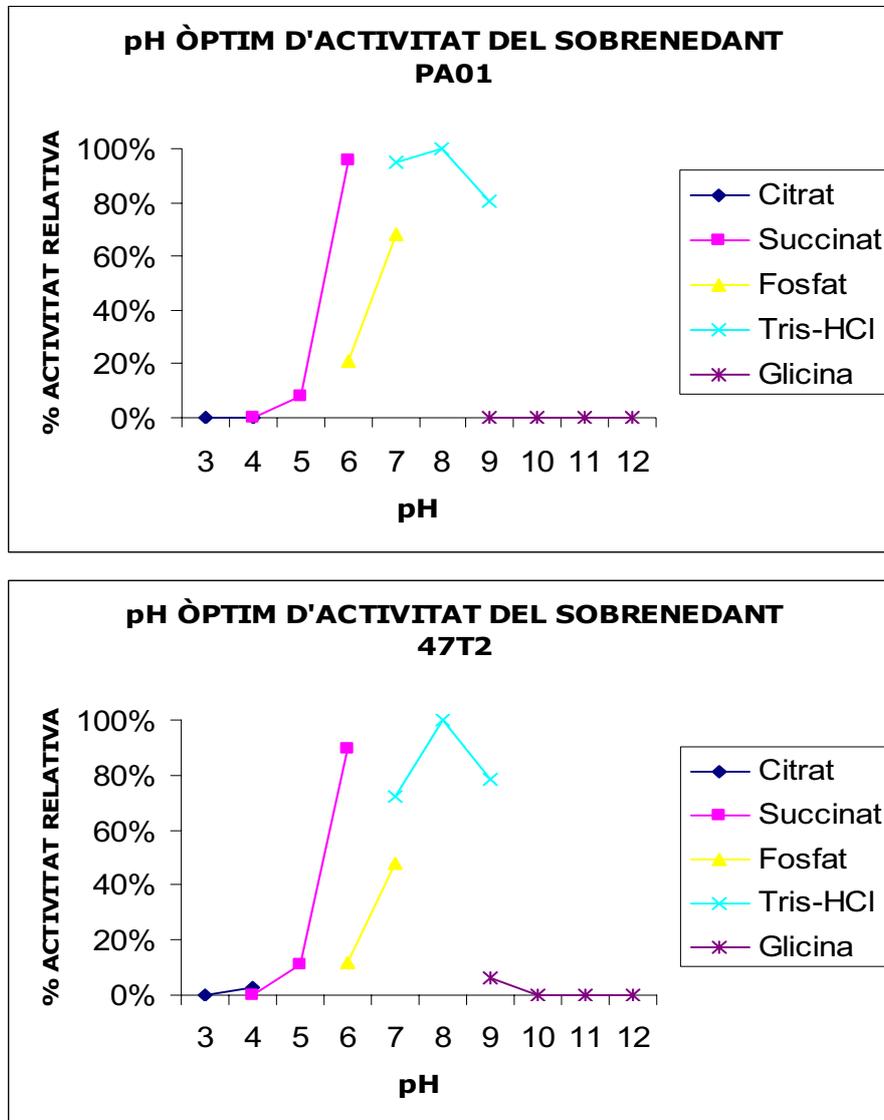


Figura 4.9. Efecte del pH sobre l'activitat lipolítica dels sobrenedants de *P. aeruginosa* PA01 i *P. aeruginosa* 47T2.

Podem dir que no existeixen diferències significatives entre el pH òptim d'actuació de la soca tipus *P. aeruginosa* PA01 i la soca aïllada de mostres d'aigües contaminades amb residus oliosos *P. aeruginosa* 47T2, tant en el cas de l'extracte cel·lular com en el sobrenedant. I pel que fa a la soca *P. aeruginosa* 42A2, la determinació del pH òptim d'actuació ha resultat també ser la mateixa que a les

dues soques estudiades en aquest treball tant a l'extracte com al sobrenedant (Bofill *et al.*, 2009).

4.1.1.5. Determinació de la termoestabilitat

Per tal d'estudiar l'efecte de la temperatura sobre l'estabilitat de l'activitat lipolítica de les dues fraccions (extracte i sobrenedant) d'ambdues soques (*P. aeruginosa* 47T2 i PA01), les fraccions intra i extracel·lulars obtingudes s'han incubat a sis temperatures diferents: 4°C, 20°C, 30°C, 40°C, 50°C i 60°C durant diferents temps. En aquest tipus d'assaig s'agafen alíquotes a diferents intervals de temps i es determina l'activitat lipolítica residual seguint el protocol d'assaig descrit en els apartats 3.6.4.2. i 3.6.4.6., sobre el substrat de preferència de cada fracció, *p*-NP-caproat pels extractes i *p*-NP-caprilat en el cas dels sobrenedants.

En el cas dels extractes cel·lulars de *P. aeruginosa* PA01, a les 24 hores d'incubació a temperatures de 4°C, 20°C, 30°C, encara es manté més d'un 60% de l'activitat lipolítica i a 40°C un 58,7%. Per la seva part, els extractes de *P. aeruginosa* 47T2 a les 24h a totes les temperatures perden més del 50 % de l'activitat (Fig. 4.10), suggerint una menor estabilitat tèrmica dels enzims lipolítics intracel·lulars produïts per aquesta soca. Aquest efecte presenta una correspondència directa amb l'observació d'una menor intensitat de fluorescència en els zimogrames (apartat 4.1.1.1) quan s'analitzaven les mostres d'extracte de la soca 47T2 a diferents temps d'ebullició, on s'observava que en tots els casos mostraven una intensitat menor que les mostres d'extracte de la soca PA01 tractades a les mateixes condicions. Els resultats d'estabilitat tèrmica obtinguts en aquest apartat estarien també d'acord amb el fet de trobar una temperatura òptima d'actuació més elevada en sobrenedants de la soca PA01 que en la soca 47T2, tal com s'ha observat en l'apartat anterior (4.1.1.3).

Per tant, podem dir que els enzims del complex lipolític de l'extracte de la soca *P. aeruginosa* 47T2, són més sensibles a la temperatura, fet que suggereix que per treballar amb ells el més adequat seria produir-ne cada vegada que s'haguessin de fer servir per evitar pèrdues innecessàries d'activitat. En canvi, el complex lipolític de l'extracte de la soca tipus PA01 tolera molt millor les diferents condicions de temperatura i podria ser emmagatzemat refrigerat sense pèrdues significatives d'activitat.

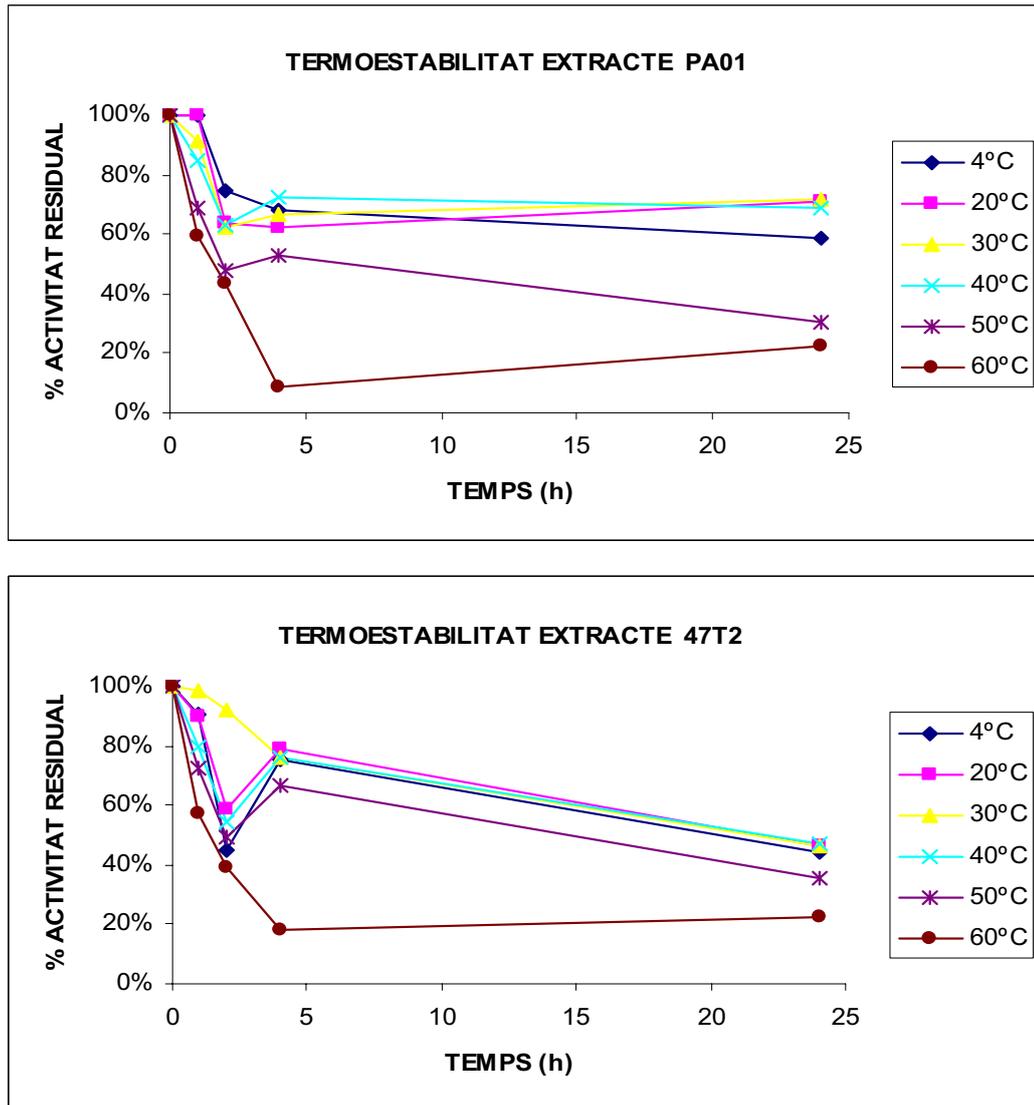


Figura 4.10. Efecte de la temperatura sobre l'estabilitat de l'activitat lipolítica a l'extracte de *P. aeruginosa* PA01 i *P. aeruginosa* 47T2. Activitat residual sobre *p*-NP-caproat després de diferents temps d'incubació a diverses temperatures, de 4°C a 60°C.

En el cas dels sobrenedants, a les 24 hores d'incubació, *P. aeruginosa* PA01 manté més d'un 60% de l'activitat lipolítica a 4°C, 20°C, 30°C i 40°C i manté entre un 30% i un 20% de l'activitat a temperatures de 50°C i 60°C, respectivament. Pel que fa la soca *P. aeruginosa* 47T2 manté al voltant del 60% de l'activitat després d'una incubació de 24h a 4°C, 20°C i 30°C, però l'activitat disminueix fins a un 40% a 40°C i gairebé perd tota l'activitat a 50°C i 60°C (Fig. 4.11), confirmant una menor estabilitat tèrmica dels enzims lipolítics produïts per aquesta soca, que presenten propietats de termoestabilitat molt semblants a les de la soca *P. aeruginosa* 42A2 (Bofill *et al.*, 2009).

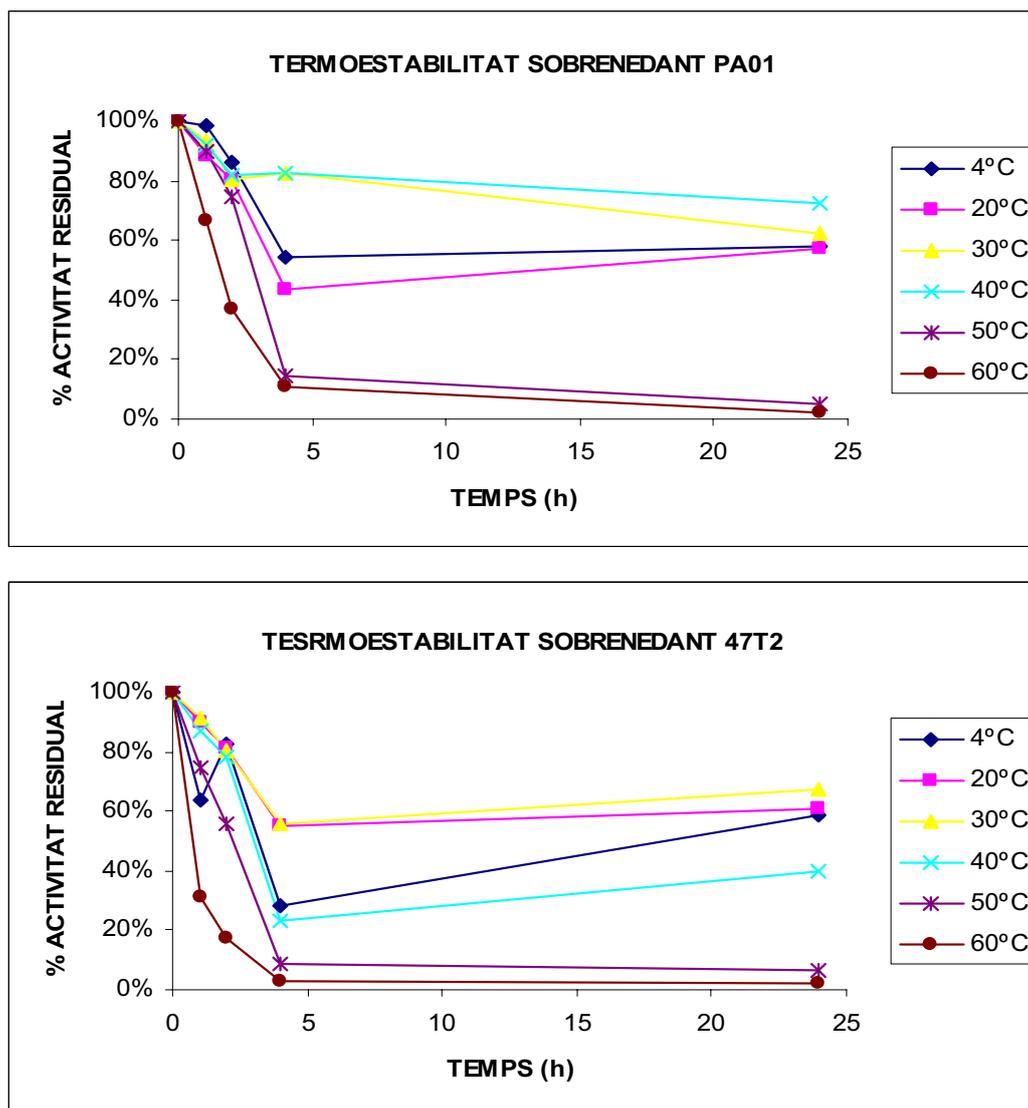


Figura 4.11. Efecte de la temperatura sobre l'estabilitat de l'activitat lipolítica al sobrenedant de *P. aeruginosa* 47T2 i *P. aeruginosa* PA01. Activitat residual sobre *p*-NP-caprilat després de diferents temps d'incubació a diverses temperatures, de 4°C a 60°C.

En les mesures que s'han pres a 1h i 2h els gràfics de termoestabilitat mostren baixades i pujades brusques en l'activitat residual registrada, això pot ser degut al diferent estat d'agregació dels enzims lipolítics en base a la desagregació que causen les temperatures més elevades. En funció de la quantitat i la resistència dels enzims, són més o menys marcades les fluctuacions, per exemple, als extractes i sobrenedants de PA01, el zimograma mostra més activitat (Fig. 4.3) i possiblement més quantitat d'enzims i els gràfics de termoestabilitat no mostren tantes irregularitats entre 0 i 4 hores.

4.1.1.6. Determinació de l'estabilitat a diferents pHs

Amb l'objectiu d'avaluar comparativament l'estabilitat de l'activitat lipolítica de les dues soques en front al pH es realitzen incubacions durant 1 hora a temperatura ambient dels extractes cel·lulars i dels sobrenedants de les dues soques –*P. aeruginosa* PA01 i 47T2– en dissolucions tamponades entre pH 3 i 12, tal com s'explica a l'apartat 3.6.4.7. Posteriorment es va analitzar l'activitat residual dels extractes sobre *p*-NP-caproat i dels sobrenedants sobre *p*-NP-caprilat, a 37°C i pH 7, mitjançant l'assaig colorimètric habitual descrit a l'apartat 3.6.4.2.

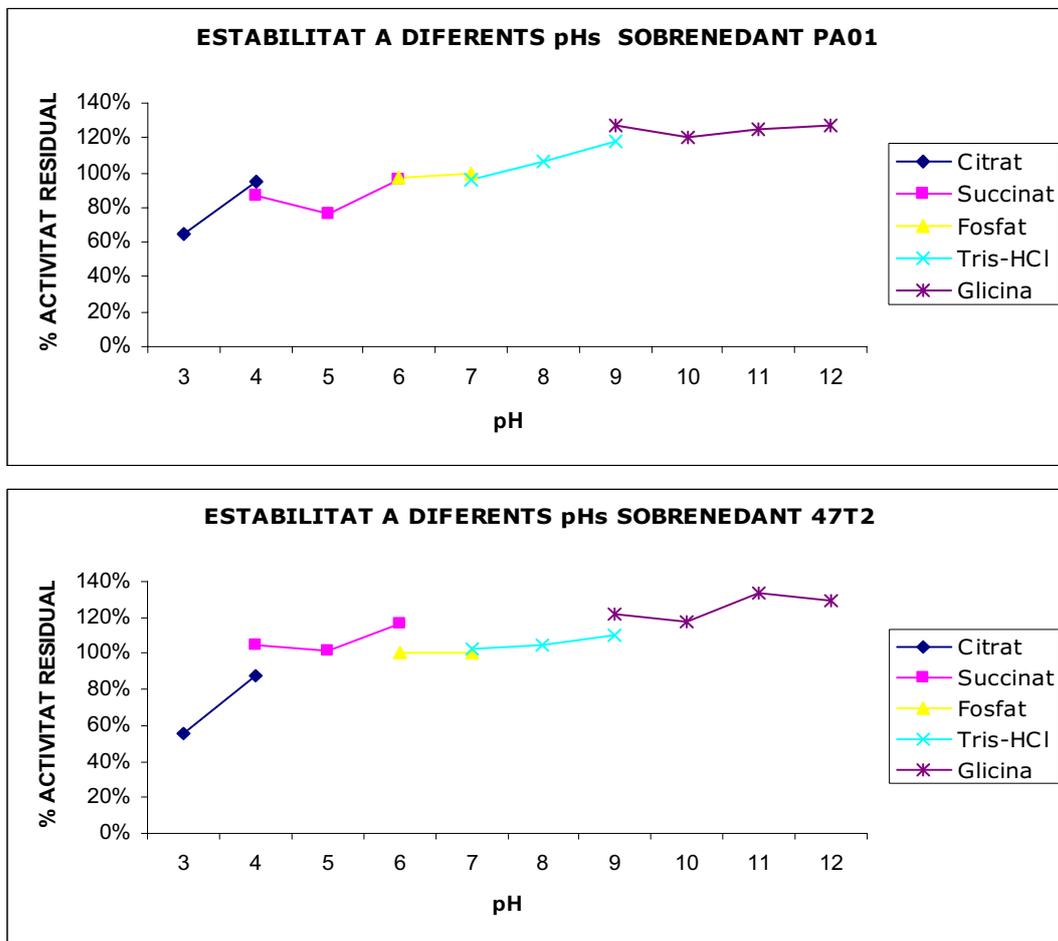


Figura 4.12. Efecte del pH sobre l'estabilitat de l'activitat lipolítica a l'extracte de *P. aeruginosa* 47T2 i *P. aeruginosa* PA01. Activitat residual sobre *p*-NP-caproat després d'una hora d'incubació a diferents pHs.

Com podem observar a la figura 4.12 dels assajos sobre extractes cel·lulars, tant la soca tipus PA01 com l'aïllat natural 47T2 mostren un complex lipolític molt estable a pH neutres i alcalins, i disminueixen considerablement la seva estabilitat (per sota del 60% de l'activitat màxima) als pH àcids de 3 i 4. A pH 5 i 6 difereixen

una mica, ja que mentre que *P. aeruginosa* PA01 manté un 80% de l'activitat a aquests pHs, els enzims de la soca natural 47T2 es desestabilitzen més i veuen reduïda la seva activitat al voltant del 60%.

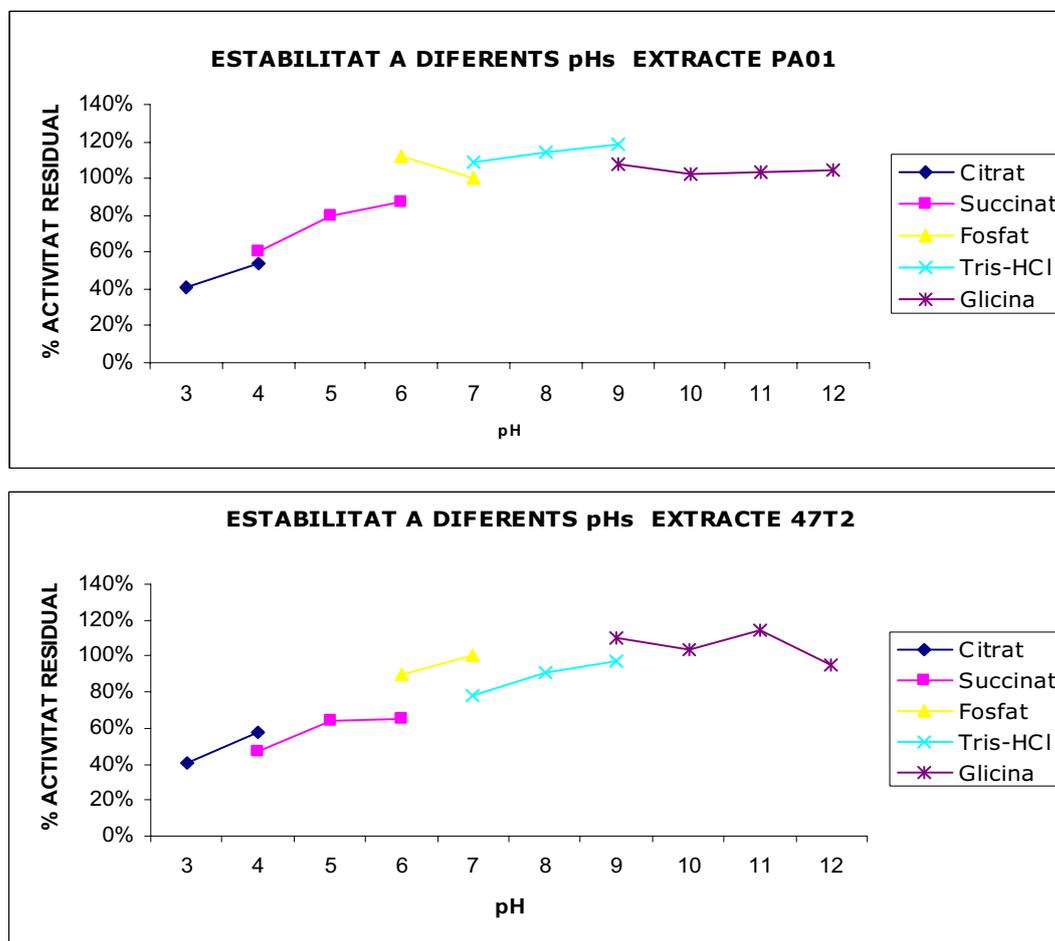


Figura 4.13. Efecte del pH sobre l'estabilitat de l'activitat lipolítica al sobrededant de *P. aeruginosa* 47T2 i *P. aeruginosa* PA01. Activitat residual sobre pNP-caprilat després d'una hora d'incubació a diferents pHs.

Pel que fa als sobrededants, el patró d'estabilitat al pH també és molt similar en les dues soques, si bé la soca salvatge 47T2 és ara la que està dotada d'un complex lipolític extracel·lular més estable en general. Manté el 100% de l'activitat en pHs de 4 a 12 i només es desestabilitza perdent més del 40% de l'activitat a pH molt àcid de 3. La soca tipus *P. aeruginosa* PA01, manté el 100% de l'activitat a pHs entre 6 i 12, mantenint al voltant del 80 % de l'activitat a pH 4 i 5 i a pH 3 el seu complex lipolític conserva el 60% de l'activitat. També en aquest cas, els resultats obtinguts pel que fa a l'estabilitat al pH de les lipases extracel·lulars de la soca *P. aeruginosa* 42A2 són molt similars (Bofill *et al.*, 2009).

Els resultats obtinguts a partir de la caracterització bioquímica del sistema lipolític intra i extracel·lular de les soques *P. aeruginosa* PA01 i *P. aeruginosa* 47T2 suggereixen que hi ha poques diferències significatives entre la soca tipus PA01 i la soca salvatge 47T2, exceptuant algunes petites diferències en la tolerància a la temperatura i el pH. Tampoc s'han observat diferències amb la soca aïllada *P. aeruginosa* 42A2 pel que fa al sistema lipolític, fet que ens indicaria que els enzims lipolítics no serien els responsables de les diferències observades pel que fa a la producció diferencial de Rhls i àcids grassos hidroxilats entre les dues soques salvatges. Així doncs, si bé també es va voler avaluar la possibilitat que es poguessin trobar diferències en els sistemes lipolítics de les dues soques aïllades – 47T2 i 42A2– amb la soca tipus PA01 que poguessin justificar les diferències trobades pel que fa a la producció o absència de ramnolípid i àcids grassos hidroxilats, els resultats obtinguts indiquen que no existeixen diferències significatives en quant als enzims lipolítics d'aquestes soques, suggerint que l'activitat lipolítica, tot i estar implicada en el metabolisme dels lípids, no sembla ser la responsable directa de que es produeixi una síntesi diferencial de polímers extracel·lulars entre les dues soques.

4.2. Obtenció de mutants negatius per la producció de PHAs de *P. aeruginosa* 42A2 i 47T2

Com s'ha pogut observar a l'apartat anterior 4.1, les diferències en el sistema lipolític de les soques estudiades no són molt notables i no justificarien la producció de polímers tan diferents (Rhls i àcids grassos hidroxilats). En conseqüència, i prenent com a referència els productes del metabolisme comuns i diferents en les dues soques de *P. aeruginosa* 42A2 i 47T2, es decideix fer un estudi a nivell d'enzims relacionats més directament amb aquests productes.

No es coneixen al 100% les rutes metabòliques que comporten la producció de PHAs, Rhls i AG hidroxilats en *Pseudomonas aeruginosa*, però sí se sap que existeix una relació metabòlica entre les seves vies de biosíntesi ja que comparteixen intermediaris comuns com es detalla a l'apartat 1.4 de la Introducció (Campos-García *et al.*, 1998; Rehm *et al.*, 2001; Déziel, 2003; Soberón-Chávez *et al.*, 2005). Tenint en compte aquesta relació, es decideix actuar a nivell metabòlic interrompent la producció d'un d'aquests productes d'interès biotecnològic per tal d'estudiar com afecta a la resta dels productes. Per fer-ho, es modifiquen els gens que codifiquen pels enzims de polimerització dels PHAs per tal de generar mutants negatius per la seva producció.

4.2.1. Mutagènesi aleatòria

Inicialment, i basant la decisió en antecedents bibliogràfics (Dutta *et al.*, 2006; O'Leary *et al.*, 2005), s'intenten obtenir els mutants fent servir tècniques de mutagènesi aleatòria, actuant sobre les soques *P. aeruginosa* 42A2 i *P. aeruginosa* 47T2. S'utilitzen dues metodologies: en primer lloc, la irradiació amb ultraviolat generant mutacions puntuals que la soca és incapaç de reparar (Gerhardt *et al.*, 1994; Dutta *et al.*, 2006), i en segon lloc, la mutació per transposició que genera mutants per interrupció dels gens amb la intercalació dels transposons (De Lorenzo, 1990; Rehm *et al.*, 2001; O'Leary *et al.*, 2005).

4.2.1.1. Mutants obtinguts per exposicions controlades a llum ultraviolada

Després de realitzar les exposicions controlades a llum UV (veure apartat 3.5.9.1.1 de Materials i Mètodes) s'ajusta el temps de radiació a uns 7-8 segons (Figura 4.14) per tal d'obtenir mutants, arribant a un equilibri entre el número de cèl·lules viables ($8 \cdot 10^5$ - $9 \cdot 10^5$ cèl·lules supervivents/ml) i les mutacions ocasionades en aquestes. Una dosi d'UV que dona lloc al voltant d'un 0,1-1,1% de supervivència

de la població bacteriana genera una òptima producció de mutants (Murray *et al.*, 1997).

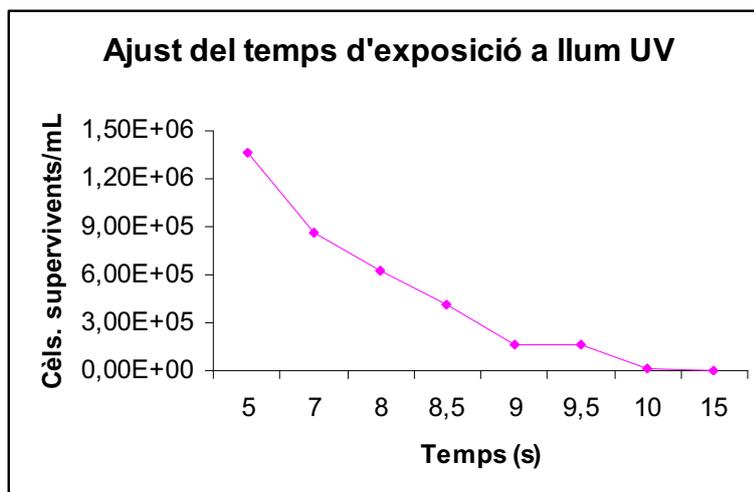


Figura 4.14. Supervivència a l'exposició a llum UV de cèl·lules de *P. aeruginosa* 47T2.

4.2.1.1.1. Selecció i comprovació dels mutants obtinguts per irradiació amb llum UV

Per tal de seleccionar els mutants negatius per la producció de PHAs es ressemblen les colònies supervivents en plaques de TSA/RN, un mètode per la detecció *in vivo* descrit per Spikermann *et al.* en 1999. Aquest mètode es basa en l'ús del colorant lipofílic Roig Nil (*Red Nile*, Sigma, EEUU) addicionat al medi de cultiu, que tenyeix els bacteris productors de PHAs i que en ser irradiats amb llum UV (312 nm) emeten una fluorescència taronja. La detecció de colònies productores de PHAs mitjançant l'ús d'aquests colorant RN, està descrit per *Azinetobacter calcoaceticus*, *Azotobacter vinelandii*, *Ralstonia eutropha*, *Rhodococcus opacus* i *Pseudomonas putida* (Spikerman *et al.* en 1998) però no s'ha descrit per la detecció en colònies de *Pseudomonas aeruginosa*, i en provar d'irradiar les plaques de TSA/RN sembrades amb els microorganismes irradiats no s'observa cap colònia taronja, si bé totes les colònies emeten una fluorescència groga-verda a causa dels pigments intrínsecs del bacteri (Kiska *et al.*, 2003).

Es decideix doncs provar de fer la selecció mitjançant plaques MM/RN (Figura 4.15). Es tracta de plaques de medi mínim suplementades amb àcid oleic com a font de carboni per tal de potenciar la producció de PHAs i així fer més evidents les diferències en l'emissió de fluorescència a les quals s'hi ha afegit el colorant lipofílic.

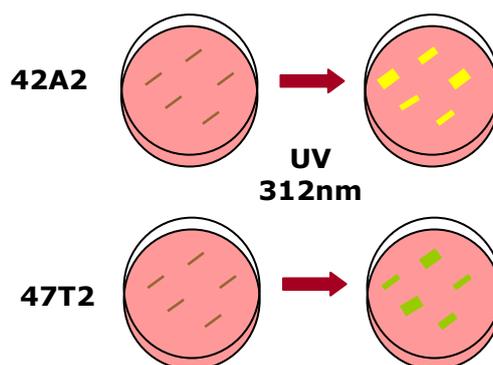


Figura 4.15. Sembrada en placa de medi mínim amb un 2% d'àcid oleic amb Roig Nil i observació de com s'acumula el colorant a les cèl·lules productores de PHA amb una làmpada de UV a 312 nm.

Tot irradiant amb llum UV (312nm) aquestes plaques, es segueix sense observar la fluorescència taronja esperada en irradiar amb UV les colònies crescudes en el medi MM/RN, segurament com a conseqüència de la fluorescència pròpia de les soques. Tanmateix, sembla que es percep una diferència d'intensitat entre algunes colònies, i per això es seleccionen les menys fluorescentes com a possibles mutants defectius per a la producció de PHAs.

Donat que els resultats no són conclouents degut a la interferència de la fluorescència intrínseca del bacteri, es decideix comprovar aquests possibles mutants determinant la producció de PHAs per gravimetria tal i com s'explica a l'apartat 3.8.5 de Materials i Mètodes (Taula 4.1).

Taula 4.1. Quantificació gravimètrica dels PHAs produïts per les soques parentals i els possibles mutants seleccionats a les 30h de cultiu en medi mínim mineral suplementat amb olis de fregit residuals a 30°C i 100 rpm.

	PHAs (g/L)	PES SEC (g/L)	% Acumulació
42A2	0,47	3,53	13,96
clon A2.1	0,38	2,68	14,66
clon A2.2	0,46	3,41	13,17
clon A2.3	0,37	2,86	13,29
47T2	0,34	2,52	13,48
clon T2.20	0,52	3,17	16,42
clon T2.22	0,39	3,85	10,69
clon T2.27	0,45	3,29	13,15

Comparant els percentatges d'acumulació de les soques parentals, *P. aeruginosa* 42A2 i *P. aeruginosa* 47T2, amb els dels possibles mutants seleccionats, no s'aprecien diferències significatives entre la soca 42A2 i en els seus clons obtinguts per irradiació. En canvi, per la soca 47T2, el clon T2.22 sí que sembla

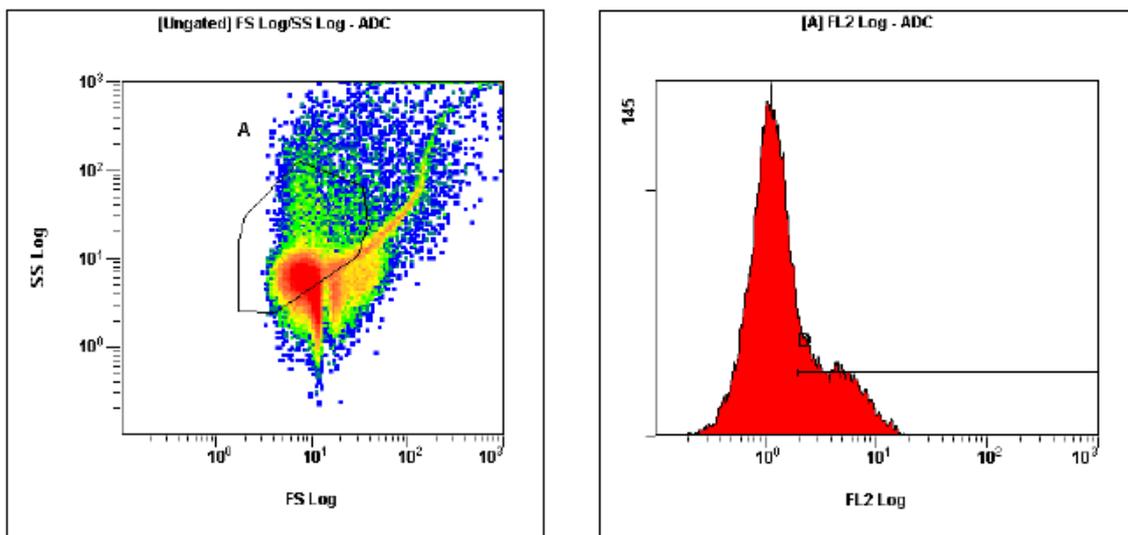
presentar lleugerament disminuïda la seva producció de PHAs. Aquesta disminució podria ser deguda a que la mutació ocasionada per la irradiació amb llum UV no elimini totalment la producció de PHAs. Així dins el mateix cultiu líquid, on es quantifica gravimètricament la producció de PHAs, hi haurien bacteris més productors no mutats, o bé on ha actuat el sistema de reparació de l'ADN del bacteri, i d'altres bacteris menys productors o que no en produeixin. Com ja s'ha descrit per *P. aeruginosa* 47T2, en un mateix cultiu pot donar-se heterogeneïtat entre les cèl·lules productores de PHAs (Vidal-Mas *et al.*, 2001) i més si els cultius són inoculats a partir d'una estria en placa i no d'una única colònia, com és el cas.

Per comprovar aquesta segona hipòtesi s'intenten seleccionar i separar les possibles cèl·lules productores de les no productores de PHAs pel sistema de tria (*cell sorting*) de citometria de flux (Herzenberg *et al.*, 2002) complementada amb la tinció amb RN (Vidal-Mas *et al.*, 2001). Aquesta tècnica ens servirà per estudiar la heterogeneïtat dels cultius productors de PHAs. Es decideix sotmetre a aquest procediment els possibles mutants menys productors de PHAs d'ambdues soques, el clon A2.1 per la soca 42A2 i el clon T2.22 per la soca 47T2. Es fan créixer els mutants i les soques parentals en condicions òptimes per a la producció de PHAs i es tenyeix amb Roig Nil una alíquota de cada cultiu i es renta amb tampó per passar-les pel citòmetre de flux (apartat 3.8.2 de materials i Mètodes). D'aquesta manera el contingut lipídic intracel·lular dels bacteris es tenyeix amb el RN en suspensió. Les cèl·lules entren a la càmera de flux d'una en una i en passar pel davant del feix de llum del làser, emeten llum fluorescent i dispersat, que és separat d'acord a la seva longitud d'ona pels filtres adequats. Aquests senyals lumínics són recollits per detectors i s'utilitzen per realitzar els citogrames i poder seleccionar així els bacteris menys tenyits i poder destriar-los com a veritables mutants per a la producció de PHAs.

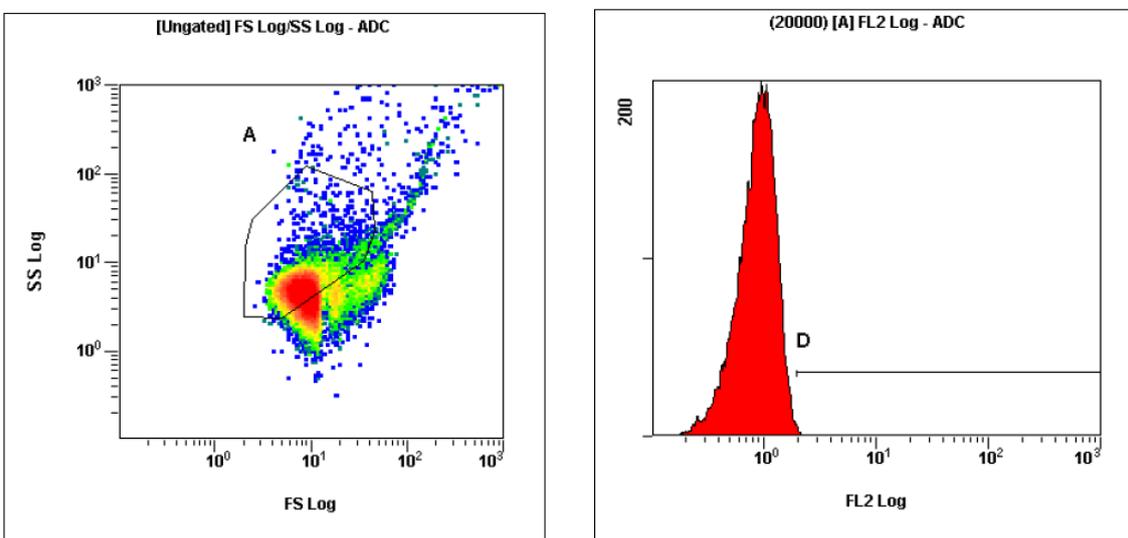
En el decurs de la selecció per citometria de flux, les poblacions cel·lulars, representades per agrupacions homogènies de punts, es situen en funció de les seves característiques físiques de dispersió i de fluorescència sobre el diagrama FS/SS. L'eix de les X correspon al *Forward Scatter* (FS, dispersió frontal en funció de la mida), on les cèl·lules col·locades més a la dreta són les més grans, mentre que les situades més a l'esquerra seran més petites, com seria el cas de les que no contenen PHAs. L'eix de les Y correspon al *Side Scatter* (SS), indicador de l'equivalent de complexitat. Així, les cèl·lules situades més amunt són més complexes i les situades més avall menys complexes, com correspondria a les que no continguin PHAs. A més a més, dins el diagrama FF/SS s'ha fet una selecció (**A**, *gating*) d'una fracció de la població cel·lular segons la mida i la complexitat cel·lular, que es representa en un altre gràfic o histograma a través d'un únic

paràmetre, la fluorescència. Aquest histograma dóna informació del nombre de cèl·lules que produeixen fluorescència deguda al colorant RN (Y) i la intensitat amb la qual l'expressen (X).

La intensitat de fluorescència per sota de la qual les cèl·lules es consideren com a negatives es fixa per comparació amb els controls de les soques parentals marcades també amb RN, indicant aquest nivell amb la barra **D**.



Citogrames de la soca parental *P. aeruginosa* 47T2 tenyida amb RN



Citogrames del clon T2.22 de la soca *P. aeruginosa* 47T2 tenyit amb RN

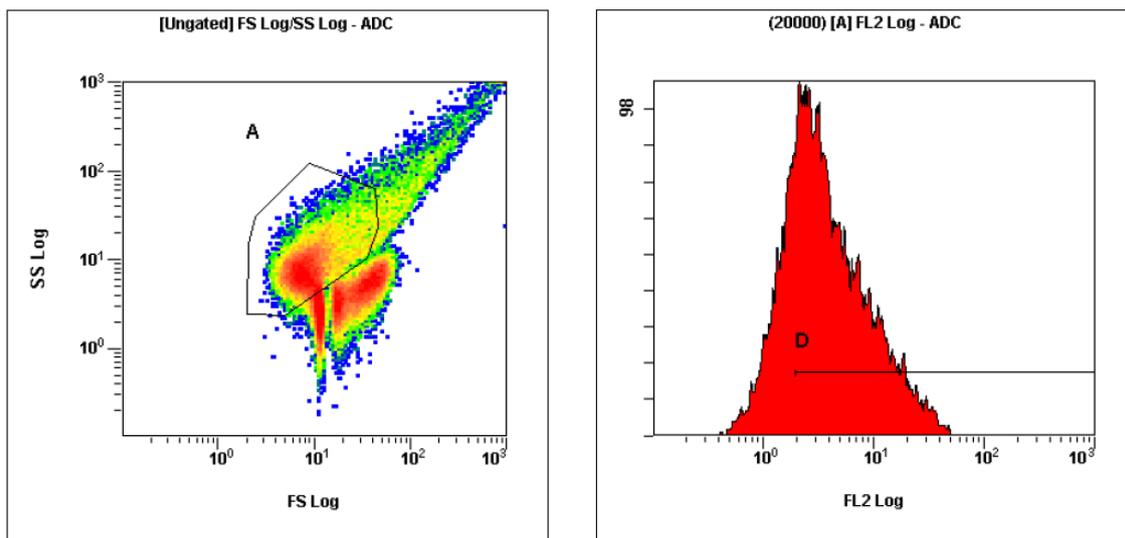
Figura 4.16. Citogrames FF/SS a l'esquerra i a la dreta els histogrames monoparamètrics de fluorescència corresponents a la finestra d'anàlisi marcada sobre el diagrama (A). A dalt es mostren els citogrames de la soca parental *P. aeruginosa* 47T2, i a baix els del clon T2.22 possible mutant PHA negatiu de la mateixa soca.

El primer citograma correspon a la soca parental *P. aeruginosa* 47T2 i el segon, al possible mutant defectiu per la producció de PHA de la mateixa soca (clon T2.22) amb els corresponents histogrames a partir de la finestra seleccionada A (Figura 4.16). Si comparem les finestres de la soca parental amb la del possible mutant T2.22, a simple vista sembla que les cèl·lules de la soca parental són més grans i de més complexitat o granulositat com cal esperar de cèl·lules que acumulen PHAs, ja que trobem gran densitat de punts (cèl·lules) a la zona superior-dreta de la finestra.

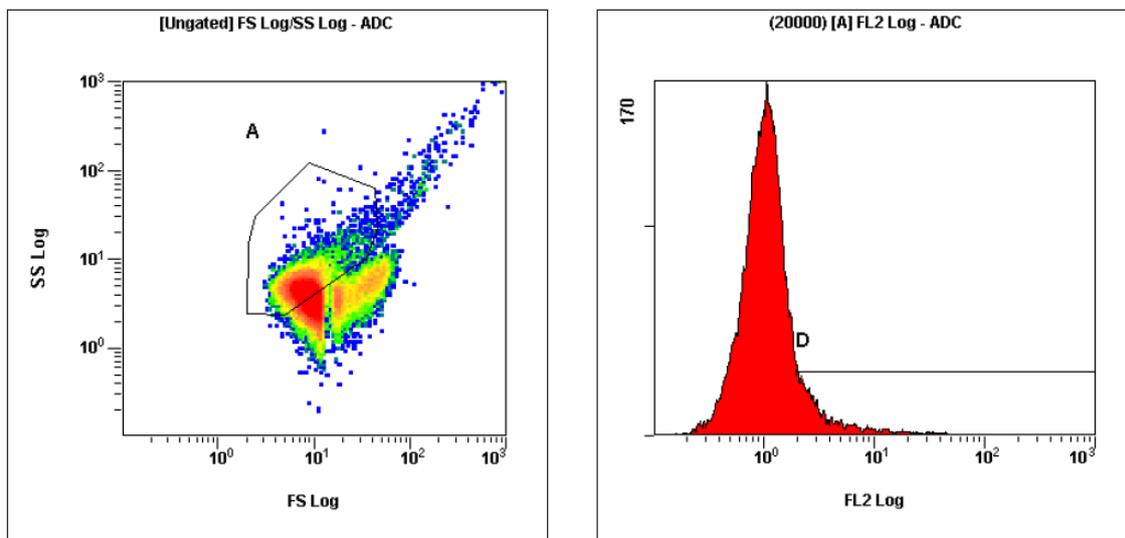
Si ens fixem en els histogrames monoparamètrics, s'observa que en la soca parental hi ha un major número de cèl·lules que expressen una major fluorescència respecte a l'histograma del possible mutant, fet que en principi representa un major número de cèl·lules en el clon que tenen menys grànuls de PHA tenyits amb RN o bé que no en tenen (Vidal-Mas *et al.*, 2001).

La Figura 4.17 correspon als citogrames de la soca parental *P. aeruginosa* 42A2 i del possible mutant defectiu per la producció de PHAs de la mateixa soca – clon A2.1– amb els corresponents histogrames monoparamètrics obtinguts a partir de la finestra seleccionada A en els diagrames FF/SS. També s'observa en aquest cas que les cèl·lules de la soca parental són més grans i granuloses, i en aquest cas encara és més acusada la diferència entre els histogrames donat que la soca parental presenta moltes més cèl·lules amb més intensitat de fluorescència que el possible clon defectiu per la producció de PHAs.

Finalment, mitjançant la citometria de flux i a partir dels histogrames de fluorescència proporcionats pel sistema de *cell sorting* basat en la fluorescència emesa pels grànuls de PHAs tenyits amb RN, s'aconsegueixen destriar aquelles cèl·lules menys fluorescents, que se suposen amb menys PHAs acumulats o sense PHAs. A partir de les cèl·lules seleccionades dels dos possibles clons mutants defectius per la producció de PHAs, es tornen a fer cultius per tal de quantificar mitjançant tècniques de gravimetria els PHAs d'aquests possibles mutants. Tanmateix, en l'anàlisi per gravimetria no s'aconsegueixen valors de % d'acumulació de PHAs molt diferents a aquells dels quals s'havia partit en les soques parentals (Taula 4.1).



Citogrames de la soca parental *P. aeruginosa* 42A2 tenyida amb RN



Citogrames del clon A2.1 de la soca *P. aeruginosa* 42A2 tenyit amb RN

Figura 4.17. Citogrames FF/SS amb l'histograma corresponent a la finestra d'anàlisi marcada sobre el diagrama. A dalt es mostren els citogrames de la soca parental *P. aeruginosa* 42A2, i a baix els del clon A2.1 possible mutant PHA negatiu de la mateixa soca.

4.2.1.2. Mutants obtinguts per inserció amb el transposó del pUT mini-*Tn5*

Atès que els possibles mutants obtinguts mitjançant irradiació amb llum UV no són concloents, es decideix utilitzar un altre sistema basat en la disrupció aleatòria dels gens implicats en la síntesi dels PHAs, utilitzant el transposó pUT mini-*Tn5* (De Lorenzo *et al.*, 1990, O'Leary *et al.*, 2005). Amb aquest objectiu, s'assaja amb diferents vectors dotats de diferents gens de resistència a antibiòtics

per acoblar el sistema de mutagènesi per inserció amb el transposó del pUT mini-*Tn5* a *P. aeruginosa*, ja que la resistència de les soques 47T2 i 42A2 als diferents antibiòtics dificulta la posterior selecció dels mutants. Els resultats corresponents a les CMI's d'aquestes soques enfront de diferents antibiòtics es mostren en la Taula 4.2.

Taula 4.2. Concentració mínima inhibidora (CMI en µg/mL) pels antibiòtics Cloramfenicol (Cm), Tetraciclina (Tc) i Estreptomicina (Sm) de les soques de *P. aeruginosa* 42A2 i 47T2 i dels diferents vectors pUT mini-*Tn5* en la soca *E. coli* S17.1.

CMI (µg/mL)	Cm	Tc	Sm
<i>P. aeruginosa</i> 42A2	200	300	200
<i>P. aeruginosa</i> 47T2	600	400	200
<i>E. coli</i> S17.1 pUT mini- <i>Tn5</i>	500	500	500

Donada l'elevada resistència de les dues soques de *P. aeruginosa* als diferents antibiòtics (Kiska *et al.*, 2003), sobretot en la soca 47T2 (Taula 4.2), es decideix emprar per a la mutagènesi el vector pUT mini-*Tn5* Sm/Sp ja que és l'únic que es pot fer servir en totes dues soques a una concentració d'antibiòtic de 200 µg/mL.

Després de realitzar la conjugació entre la soca *E. coli* λ *pyr* S17.1 pUT mini-*Tn5* Sm/Sp i les dues soques de *P. aeruginosa* 42A2 i 47T2, tal com s'ha descrit a l'apartat 3.5.7.2.1 de Materials i Mètodes (De Lorenzo *et al.*, 1990; Vrionis *et al.*, 2002), s'obtenen bastantes colònies resistents a estreptomicina, és a dir, colònies en les quals suposadament s'ha produït la integració del transposó en el cromosoma de la soca a través d'una recombinació homòloga. La freqüència d'inserció obtinguda és aproximadament de 10^{-2} .

Però quan es volen seleccionar aquells mutants que han inserit el transposó en algun punt del cromosoma que afecti a la producció de PHAs es dóna el mateix problema que en la mutagènesi per irradiació amb UV. No existeix una bona metodologia de contraselecció per mutants defectius en la producció de PHAs en soques de *Pseudomonas aeruginosa* productores de compostos pigmentats i/o fluorescents, ja que tant la metodologia en plaques basada en l'ús del colorant fluorescent RN, com la de la tria per citometria de flux no han resultat efectives per a les soques 42A2 i 47T2. L'única manera de comprovar els mutants d'aquestes soques és la quantificació gravimètrica de PHAs, però aquest mètode no serveix per seleccionar sinó més aviat per comprovar la taxa de producció de PHAs dels mutants seleccionats, ja que seria necessari fer cultius líquid a partir de cada possible mutant i això requereix una despesa massa important de temps i material.

Donades les limitacions de selecció que presenten els dos mètodes anteriors de cara a l'obtenció de mutants negatius per a la producció de PHAs en les soques de *P. aeruginosa* pigmentades/fluorescents 42A2 i 47T2, s'opta per la utilització d'un sistema de mutagènesi dirigida (Pham *et al.*, 2004).

4.2.2. Mutagènesi dirigida

P. aeruginosa és un model de gran interès i per això és un dels bacteris més estudiats a nivell molecular. El seu genoma ha estat totalment seqüenciat, prenent-se com a soca tipus *P. aeruginosa* PA01 aïllada d'un pacient amb otitis mitja (Stover *et al.*, 2000). La seqüència completa del genoma de *P. aeruginosa* PA01 es troba disponible en bases de dades públiques (www.pseudomonas.com) i la seva anàlisi es va publicar l'any 2000 (Stover *et al.*, 2000). La mida aproximada de l'únic cromosoma circular que forma el genoma d'aquest bacteri és de prop de 6,3 milions de parells de bases (6.264.403 pb, www.pseudomonas.com), i va ser amb diferència el genoma més gran seqüenciat pel que fa a bacteris, seguit del d'*Escherichia coli* amb 4,6 milions de parells de bases. Aquesta soca (PA01), igual que molts altres aïllats de *P. aeruginosa*, no conté plasmidis. Presenta un percentatge elevat de Guanina-Citosina en el seu DNA, aproximadament un 67,2%, tret característic de *Pseudomonas* que sovint dificulta la manipulació genètica i el clonatge del seu ADN (Palleroni *et al.*, 1984; West *et al.*, 1988; Hauser *et al.*, 1998). L'anàlisi de la seqüència del seu genoma ha permès identificar gens involucrats en la mobilitat, el transport i utilització de nutrients, l'extracció d'antibiòtics de la cèl·lula, així com sistemes implicats en el *quòrum sensing* i la resposta a canvis ambientals (Stover *et al.*, 2000). També s'han identificat els gens involucrats en la biosíntesi dels PHAs (Witholt *et al.*, 1999; Hoffman *et al.*, 2004), localitzats en un mateix operó *phaC1ZC2D* en el qual s'hi inclouen diversos gens tal com es mostra a la Figura 4.18:

- Els gens ***phaC1*** i ***phaC2*** codifiquen per la **PHA sintasa**.
- El gen ***phaZ*** codifica per una **PHA depolimerasa intracel·lular**.
- El gen ***phaD*** codifica per un putatiu **regulador transcripcional**.
- El gen ***phaF*** codifica per una **proteïna estructural associada als grànuls de PHA**. També és considerada com un **regulador negatiu dels gens de biosíntesi de PHA**.
- El gen ***phaI*** codifica per **proteïna estructural associada als grànuls de PHA**.

- El gen ***phaG*** codifica per **transacil·lases** que uneixen la biosíntesi d'àcids grassos amb la biosíntesi de PHAs.

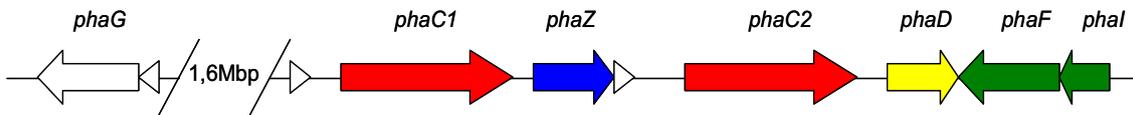


Figura 4.18. Esquema adaptat de Hoffman i Rhem, 2004: amb fletxes es representen els gens més rellevants en la biosíntesi de PHAs en *P. aeruginosa* PA01. Els triangles blancs indiquen la localització dels putatius promotors dels corresponents gens/operons.

Donat que les PHA sintases o polimerases són els enzims amb activitat polimeritzant (Hoffman *et al.*, 2004), per tal de generar mutants per a la producció dels polímers de PHAs es decideix actuar sobre aquests gens per evitar el consum dels substrats naturals dels enzims sintasa pels quals codifiquen, que són intermediaris comuns a la producció dels altres metabòlits d'interès en les dues soques estudiades (Deziel, 2003).

L'estratègia seguida per la mutagènesi dirigida es basa en la inactivació de gens cromosòmics per recombinació homòloga amb fragments d'ADN de zones de la mateixa regió obtinguts per PCR. Amb aquesta metodologia és possible deleccionar un fragment de l'operó que intervé en la síntesi dels PHAs (apartat 1.3.3.2), substituint-lo mitjançant recombinació homòloga per uns fragments d'ADN que no continguin l'operó complet.

Els dos gens PHA-sintasa, *phaC1* i *phaC2* identificats i caracteritzats a *Pseudomonas aeruginosa*, es troben separats entre sí pel gen *phaZ* (Timm i Steinbüchel, 1992) com es mostra a la Figura 4.18, i és a nivell d'aquests locus (*phaC1ZC2*) que es decideix provocar la mutació per a l'obtenció d'un mutant isogènic deleccionat Δ *phaC1-phaZ-phaC2*. Es pretén, tal i com s'indica a la Figura 4.19, provocar una delecció de la seqüència cromosòmica marcada en verd, corresponent a uns 4695 parells de bases i que conté la zona 3' del gen *phaC1*, el gen *phaZ* sencer i la regió 5' del gen *phaC2*. Tota aquesta regió és substituïda pel gen de resistència a l'antibiòtic gentamicina (Gm).

Per tal de promoure aquesta recombinació homòloga es fan servir fragments d'ADN amplificats per PCR, homòlegs als extrems de la zona dels gens a deleccionar, és a dir, homòlegs a l'extrem 5' de *phaC1* i a la regió 3' de *phaC2*. Al conjunt d'aquests fragments d'ADN se'ls lliga entremig el gen de resistència a Gm.

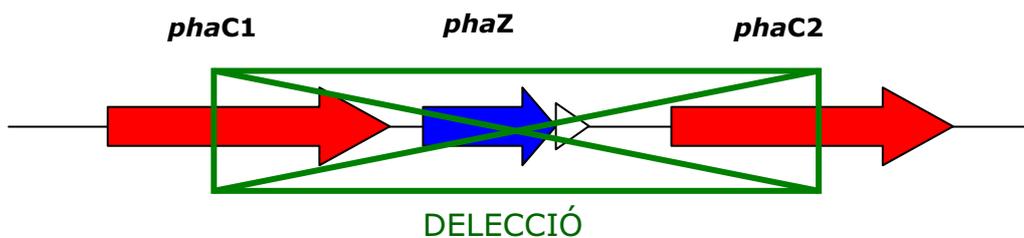


Figura 4.19. Delecció que es vol realitzar per tal d'aconseguir el mutant PHA negatiu. El procés implica eliminar part dels gens *phaC1* i *phaC2* i el gen *phaZ* sencer a més d'un promotor putatiu (Timm *et al.*, 1992).

Per començar aquest procés s'amplifiquen els fragments homòlegs als extrems 5' i 3' dels gens *phaC1* i *phaC2*, respectivament, fent servir els encebadors detallats a la Taula 4.3, amb la intenció d'aconseguir la seqüència codificant per la PHA-sintasa truncada.

Taula 4.3. Encebadors dissenyats per amplificar l'extrem 5' de *phaC1* (A i B) i l'extrem 3' de *phaC2* (C i D). Els encebadors B i C contenen extrems complementaris entre ells per una posterior fusió dels fragments obtinguts per PCR. A més a més, en unir-se els dos fragments contenen una diana de restricció *BamHI* marcada en vermell.

Nom	Seqüència
(A) U58	5' GCGAATTCGATGAGTCAGAAGAAC 3'
(B) L555 BamHI	5' CGGATCC TGTCTACAGTAGCTCGTTGTTCCACCAGGTCCTTG 3'
(C) U3973 BamHI	5' ACCAACTGTAGACA GGATCC GGCCGGCAACTGCGCAAGGTCAG 3'
(D) L4730	5' GGCCGAAGCTTTCAGCGTATATGC 3'

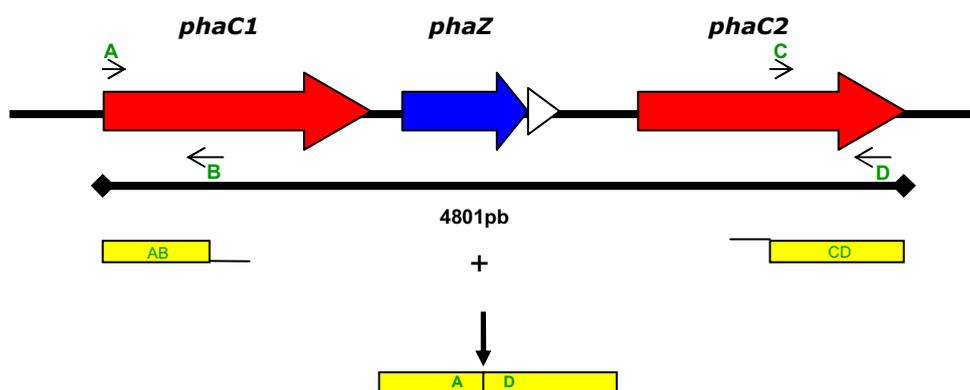


Figura 4.20. Procés d'obtenció del fragment AD a partir del genoma de *P. aeruginosa* 42A2 i 47T2. El fragment AB (538pb) amplificat per PCR presenta un extrem complementari a l'extrem de CD (757 pb). El fragment final AD (1295pb) resulta de la PCR de fusió usant els encebadors A i D i els fragments AB i CD com a motlle.

A partir de l'ADN genòmic de *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 y 47T2 s'amplifica per PCR el fragment AB d'uns 538 pb amb els encebadors **A** i **B** i el fragment CD de 757 pb amb els encebadors **C** i **D** (Taula 4.3., Figura 4.20). Seguidament, es genera el fragment AD resultant d'una PCR de fusió dels dos fragments gràcies als extrems complementaris dels encebadors **B** i **C**, fent servir com a ADN motlle els propis fragments AB i CD i els encebadors **A** i **D** (Figura 4.20). Així, s'obté un fragment final d'uns 1295 pb que conté una zona d'homologia a la regió 5' del gen *phaC1* de *Pseudomonas aeruginosa*, una seqüència diana per l'enzim de restricció *Bam*HI i seguidament una segona zona d'homologia, aquesta vegada amb la zona 3' del gen *phaC2* de *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 4.20). Per poder treballar amb aquest fragment, s'introdueix AD en el vector comercial de clonació pGEM®-T seguint les instruccions de la casa comercial de manera ràpida i eficient (Promega, Espanya 1999) i transformem sobre *E. coli* DH5α (Hamahan, 1983, apartat 3.5.7.1 de Materials i Mètodes).

Del clon obtingut, *E.coli* DH5α pGEM-TAD, s'extreu i purifica el vector i seguidament es digereix pGEM-TAD amb l'enzim de restricció *Eco*RI (Figura 4.21) per tal d'obtenir la seqüència AD flanquejada per la diana de restricció *Eco*RI.

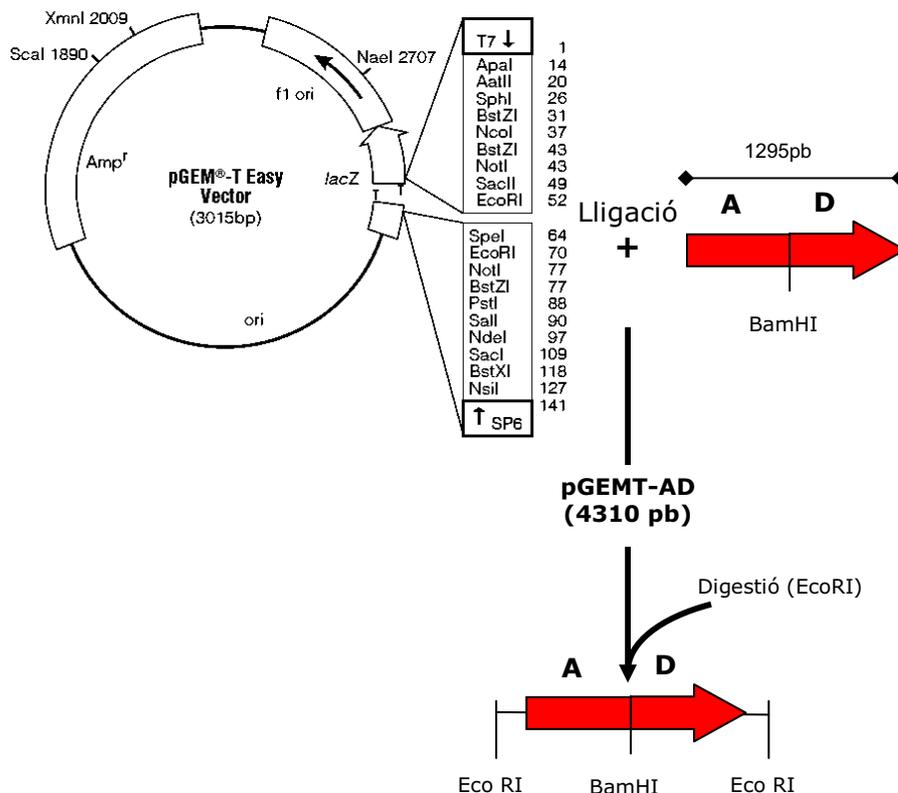


Figura 4.21. Lligació del fragment d'ADN AD al vector comercial pGEM-T i posterior digestió del vector pGEM-TAD per tal d'obtenir el fragment d'ADN -AD- amb la diana *Eco*RI a banda i banda.

Paral·lelament es digereix també amb *EcoRI* el plasmidi pEX100Tlink (Quénéée *et al.*, 2005) per tal de lligar-hi el fragment AD flanquejat per dues dianes *EcoRI* i seguidament introduir entre el fragment A i el D el gen de resistència a Gm.

Per incorporar al fragment AD la resistència a Gm, el gen *aacC1* s'extreu del plasmidi pUCGm/ox per digestió amb l'enzim de restricció *BamHI*. En aquest vector el gen *aacC1* es troba flanquejat per les seqüències *lox* i per un MCS (*multiple cloning site*) palindròmic (Quénéée *et al.*, 2005) que permet l'alliberament de la seqüència completa *lox-aacC1-lox* per restricció amb *BamHI*. S'obté així el gen de resistència flanquejat per les seqüències *lox* (Figura 4.22).

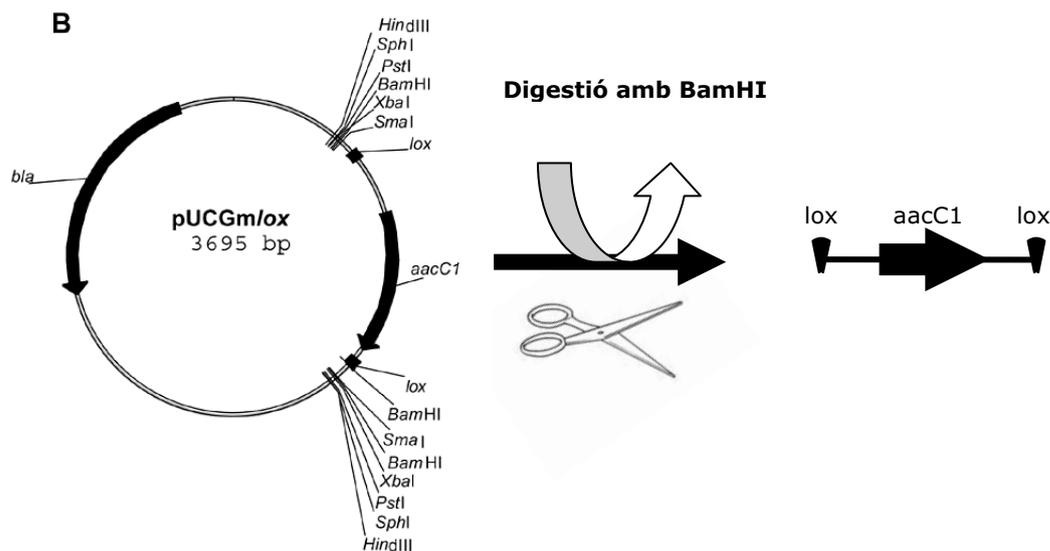


Figura 4.22. Esquema de la digestió del vector pUCGm/ox amb l'enzim de restricció *BamHI* per extreure el gen de resistència a la Gm (*aacC1*) flanquejat per les repeticions *lox*.

Finalment, es lliga el gen de resistència a Gm flanquejat per les seqüències *lox* al vector pEX100TAD digerit amb *BamHI*, que obre el vector separant AD gràcies a la diana de restricció introduïda amb els encebadors. Així, s'aconsegueix el fragment d'ADN que substituirà la regió cromosòmica -AloxGmloxD-, un fragment de 2238 pb a l'interior de pEX100Tlink (Fig 4.23 i 4.24). Aquest ha de substituir per recombinació homòloga una part de la regió cromosòmica de *P. aeruginosa* que codifica per la PHA-sintasa.

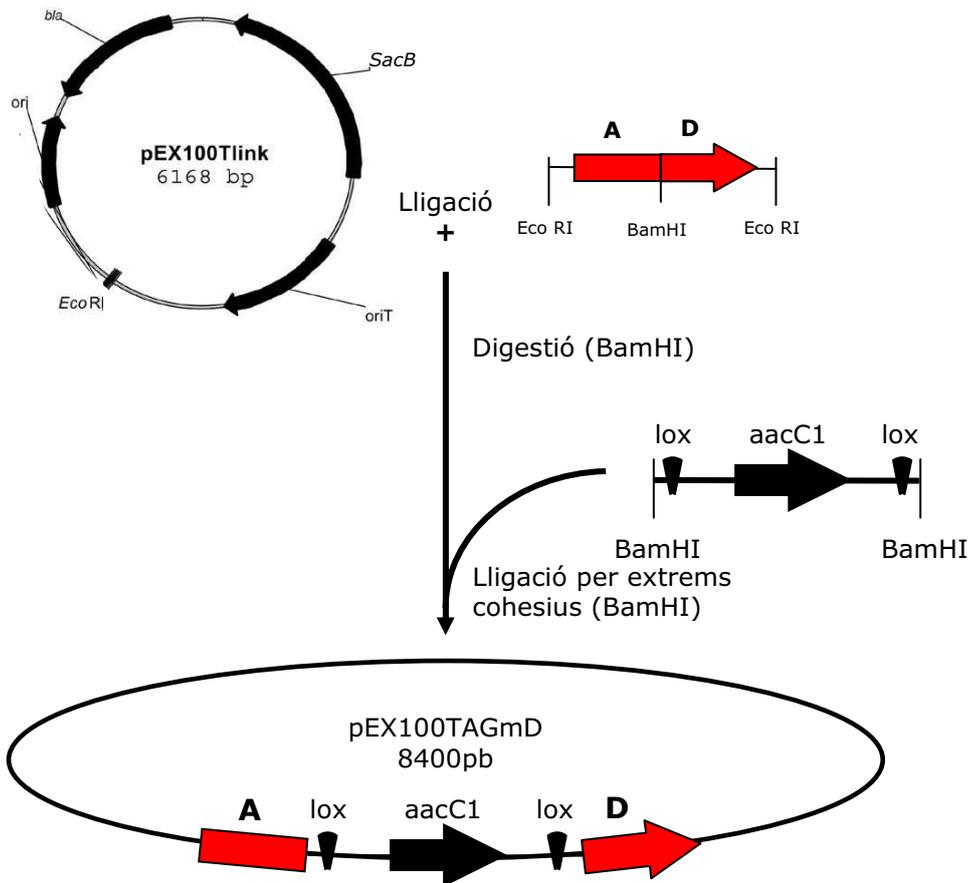


Figura 4.23. Procés de construcció del fragment de PCR que substituirà la regió cromosòmica de 2238 pb -AloxGmloxD- dins el plasmidi pEX100Tlink.

Seguidament s'introdueix aquest plasmidi pEx100TAGmD per transformació dins l'*E. coli* S17.1 conjugativa (apartat 3.5.7.1 de Materials i Mètodes) i es realitza la conjugació d'*E. coli* S17.1 pEX100TAGmD amb les soques *P. aeruginosa* 47T2 i 42A2 (apartat 3.5.7.2.2 de Materials i Mètodes) per tal que es doni la doble recombinació homòloga.

Els transconjugants es seleccionen per resistència a Gm, donat que pEx100Tlink és un vector suïcida que no té origen de replicació a *Pseudomonas* (Quénéé *et al.*, 2005) i només sobreviuen aquells clons que han incorporat el gen *aaaC1* al cromosoma per recombinació homòloga. Pot ser que el plasmidi s'incorpori en la seva totalitat, o bé que es doni la doble recombinació homòloga desitjada, dels dos fragments d'ADN complementaris que s'han generat per PCR (A i D) amb el cromosoma de *P. aeruginosa* 42A2 i 47T2 i s'introdueixi només AloxGmloxD de 2238pb substituint els 4801 pb de l'operò *phaC1phaDphaC2* (Figura 4.25). Per assegurar la selecció dels dobles recombinants, mutants defectius per la síntesi de PHAs on es produeix l'escissió del vector, és necessària una segona contraselecció amb sacarosa, ja que el plasmidi conté també el gen *sacB* que és un gen que

codifica per la levansucrosa que transforma la sacarosa en un tòxic. Si el vector continués inserit en la seva totalitat en el cromosoma, el producte gènic del gen *sacB* faria que les cèl·lules no hi poguessin créixer (Quénée *et al.*, 2005; Figura 4.24).

Figura 4.24. Esquema del vector pEx100T (Quénée *et al.*, 2005) que conté l'insert -loxGmlox-, el gen de Gm (negre) flanquejat per A (un fragment de l'extrem 5' de *phaC1*) i D (un fragment de l'extrem 3' de *phaC2*) en vermell.

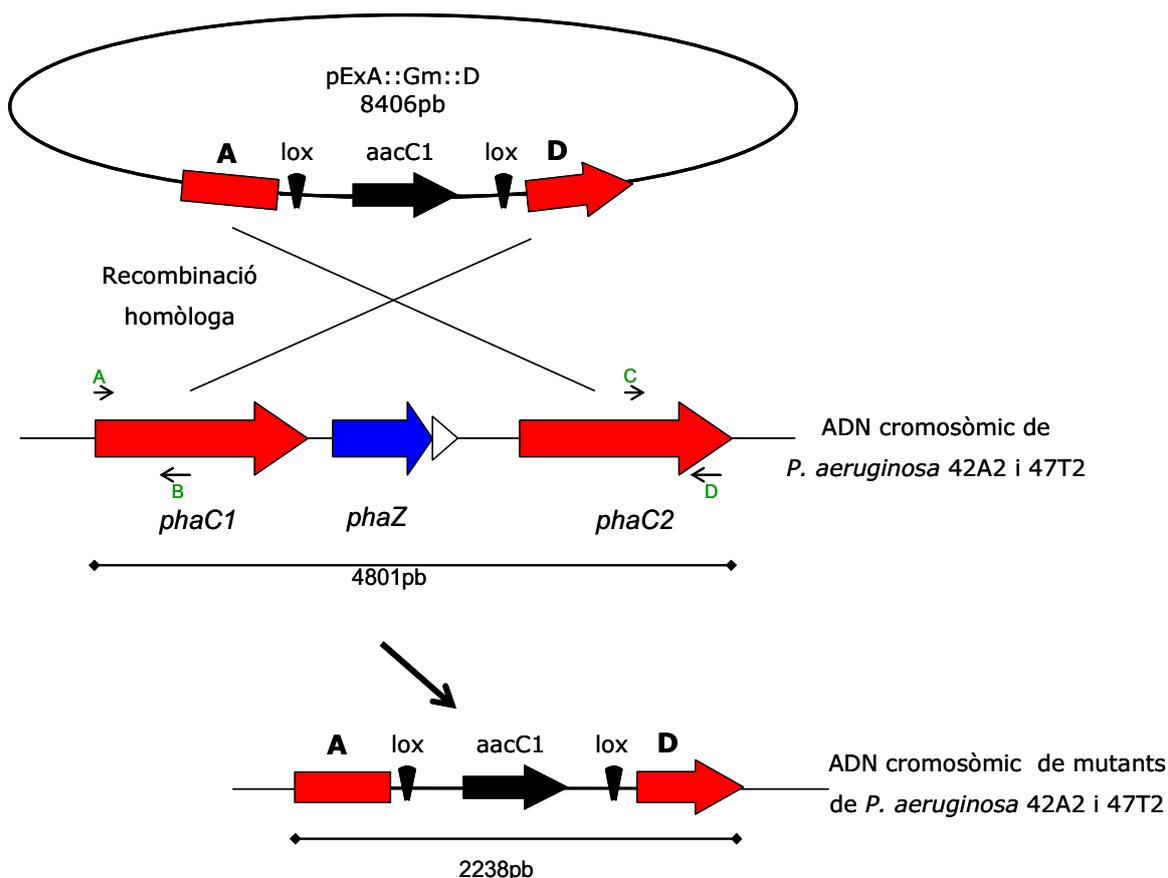
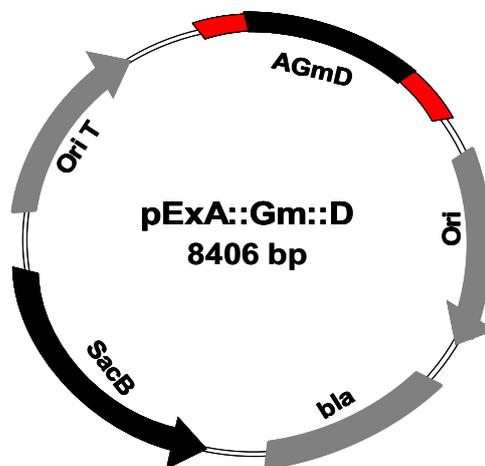


Figura 4.25. Esquema de la recombinació homòloga amb la que es generen els mutants amb els gens de les PHA-sintases defectius.

Els mutants dobles recombinants obtinguts s'analitzen per PCR fent servir els encebadors **E** i **F** (Taula 4.4) corresponents als extrems 5' i 3' del gen *phaZ* (Figura 4.26). A partir dels mutants no s'obté producte de PCR mentre que apareix una banda de 0,8 kb a partir de totes dues soques parentals, indicant que realment els mutants provenen de la doble recombinació en la qual la regió gènica *phaC1-phaZ-phaC2* ha quedat interrompuda pel gen de resistència a Gm.

Taula 4.4. Encebadors dissenyats per amplificar el gen *phaZ* (**E** i **F**) que serviran per confirmar la obtenció dels mutants PHA negatius per la producció de PHAs com a resultat de la doble recombinació.

Nom	Seqüència
(E) U 11	5' CTTCGTCTCCGGACCATC 3'
(F) L 823	5' GGAACGGACGAGGGTGCAT 3'

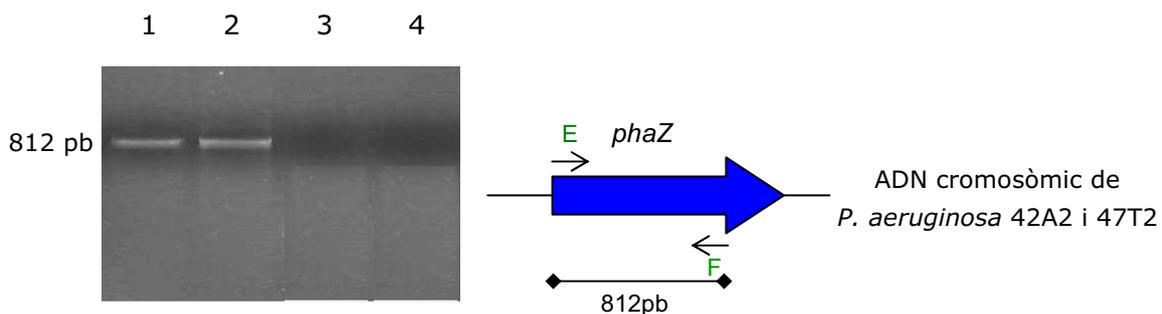
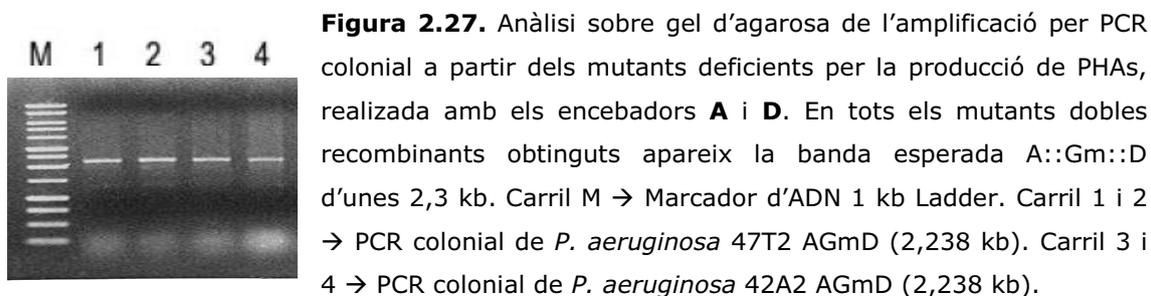


Figura 4.26. Gel d'agarosa sobre el qual s'ha fet una electroforesi i s'ha tenyit amb bromur d'etidi per tal d'observar com corren les bandes d'ADN amplificades per PCR. Els carrils 1 i 2 corresponen a l'amplificació del gen *phaZ* a partir del genoma de les soques parentals *P. aeruginosa* 47T2 i *P. aeruginosa* 42A2, mentre que els carrils 3 i 4 corresponen a la mateixa amplificació realitzada a partir de l'ADN cromosòmic dels respectius mutants PHA negatius que tenen deleccionat el gen *phaZ*. Per a l'amplificació es van utilitzar els encebadors E i F, específics pels extrems 5' i 3' del gen *phaZ*.

Seguidament per acabar de corroborar l'obtenció dels mutants negatius per la producció de PHAs, es comprova la seqüència de la regió gènica que comprendria les PHA-sintases dels clons obtinguts (*phaC1-phaZ-phaC2*) mitjançant una segona amplificació específica per PCR a partir dels encebadors **A** i **D** (Taula 4.3). Com és d'esperar, l'amplificació en els clons dona lloc a un fragment d'ADN de 2,238 kb (Figura 2.27).

Amb el resultat d'aquestes dues PCRs ens assegurem que s'ha produït la doble recombinació i la delecció desitjada, ja que si només s'amplifica amb **A** i **D**

podria ser que s'hagués integrat al cromosoma el vector sencer o que la recombinació s'hagués donat en una regió gènica errònia i s'obtingués igualment la banda AloxGmloxD per PCR. En canvi, el fet que en els mutants no s'amplifiqui el gen *phaZ* confirma novament, juntament amb la contraselecció amb sacarosa, la delecció i per tant la doble recombinació a la regió gènica desitjada.



La darrera comprovació consisteix en seqüenciar l'amplicó AloxGmloxD de 2238 pb obtingut de la PCR colonial (apartat 3.5.5 de Materials i Mètodes) a partir dels mutants *P. aeruginosa* 42A2 ΔAGmD i *P. aeruginosa* 47T2 ΔAGmD, defectius per la producció de PHAs i resistents a Gm (Figura 4.28).

Es retallen les bandes obtingudes i s'extreu l'ADN del gel d'agarosa per tal de poder-lo fer servir com a ADN motlle i poder seqüenciar-lo (apartat 3.5.4 de Materials i Mètodes). Aquesta seqüenciació es fa primer amb l'encebador **A** (Taula 4.3) i després amb l'encebador **D** (Taula 4.3), de manera que s'aconsegueix determinar la seqüència final que queda en el cromosoma de les dues soques després de la doble recombinació.

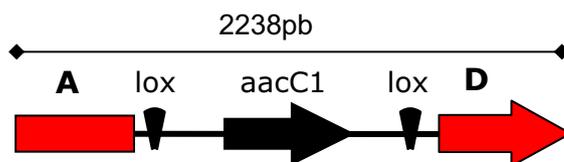


Figura 4.28. Amplicó AloxGmloxD de 2,238 kb tal com queda incorporat al cromosoma de les soques de *P. aeruginosa* 42A2 i 47T2 un cop provocada la delecció per la doble recombinació homòloga, fet que anul·la la capacitat de les soques de síntesi (polimerització) i per tant acumulació de PHAs.

En aquesta seqüència (Taula 4.5) es localitzen tant els encebadors emprats per obtenir el fragment **AD**, com la seqüència corresponent al fragment A (extrem 5' del gen *phaC1*), la seqüència corresponent al fragment D (extrem 3' del gen *phaC2*), els llocs de reconeixement de la recombinasa Cre (*lox*), i el gen de resistència a Gm (*aacC1*) emprat per dur a terme la selecció dels transconjugants.

Taula 4.5. Seqüència d'AloxGmloxD, on es localitzen per ordre, les següents seqüències: l'encebador **A** de color en groc, el fragment A (extrem 5' del gen *phaC1*) de color vermell, l'encebador **B** en groc, un lloc de reconeixement de la recombinasa Cre (*lox*) en verd, el gen de resistència a Gm (*aacC1*) en blau, l'altre lloc *lox* de reconeixement de la recombinasa en verd, l'encebador **C** en groc, el fragment D (extrem 3' del gen *phaC2*), i l'encebador **D** en groc. Els requadres són les dianes de restricció BamHI reconstruïdes per on s'ha digerit –AD– i s'ha lligat la resistència a Gm.

```

CGGAATTCGA TGAGTCAGAA GAACAATAAC GAGCTTCCCA AGCAAGCCGC GGAAAACACG CTGAACCTGA ATCCGGTGAT
CGGCATCCGG GCACAAGGACC TGCTCACCTC CGCGCGCATG GTCCTGCTCC AGGCGGTGCG CCAGCCGCTG CACAGCGCCA
GGCACGTGGC GCATTTAGC CTGGAGCTGA AGAACGTCTT GCTCGGCCAG TCGGAGCTAC GCCCAGGCGA TGACGACCGA
CGCTTTTCCG ATCCGGCCTG GAGCCAGAAT CCACTGTACA AGCGTACAT GCAGACCTAC CTGGCCTGGC GCAAGGAGCT
GCACAGCTGG ATCAGCCACA GCGACCTGTC GCCGAGGAC ATCAGTCGTG GCCAGTTCGT CATCAACCTG CTGACCGAGG
CGATGTCGCC GACCAACAGC CTGAGCAACC CGGCGGCGGT CAAGCGCTTC TTCGAGACCG GCGGCAAGAG CCTGCTGGAC
GGCCTCGGCC ACCTGGCCAA GGACCTGGTG AACACGAGC TACTGTAGAC AGGATCCTAG GGGCCCATGG CTCGAGAAGT
CGACATGTTA ACCATGGTAC CTACGTATAC CGCCGGCGTA TTGAAGCATA TCGTATGTAA TATGCTTCAA TAGATCGCGC
AGCTGTATTC GGACAAGCCA AGCATTGAC ATTACGTTCA TCGCATACGC GAGTGCCTTG ACCAGGTCTT GGAAGTGGCT
TGCGTCGCCA CCATTGCCGC GTCACCGCCA AAAGTACCGA ACAATACTGA CAAAAAACA TGTCAGATAC GGAGCCCGTA
GGTTCGTCGT TCGCGCAATG CGGCACCCAG CTACAAACTA CAATACCTCG TCGTTGCTAC AATGCGTCGT CGTTGCTACA
ATGCGTCGTC CCGTCAGCGG GATTTTGTTC CAATCCACCG AGTTCATACC CGTAGTAAGC GTGTACATCC GAGCCGGGAC
TGTTTCAGTT TAGGTACGCC CGACGAGAAC TAGAAAAGCC AGCACTCAAG CCTCTGCATC GGTGGATGAG GGTGTAGTTC
GGCCTGAGG TAATGGAGCC CTTGAACGAG GCATCATTCT GTAAGTAGCG CGAACGACGG AAGCTGGTTC TTCGCCAACA
ACCGCGAGAG CGCCGAATGC AAGACGGGTC CAAACTCGTC GCGCATCAC TCTAGATATA GATACTAGAG CGTCAGAGGC
CGCTCGTGGC CTCCGTCCCG TAACGGTGGC GCGAGTAGTT AGAGGAGTTC GTACTCCGGT TCGCGAACC ACGAATACAC
TAGATGCACG TTCGTCTAAT GCCACTGCTA GGGCGTCACC GACACATATG TTCAACCCG TATGCCCTTC TTCACTACGT
GAACTATAG CTGGGTTTCA GCGGTGGAC TGTTAAGCAA GTTCGGCTCT AGCCGAAGGG CCGGCTGCGC GTACTATTGA
AGTATATCGT ATGTAATATG CTTCAATACC TGGATCGGC CGGCAACTGC GCAAGGTCAG TAGCGTCACC TACCTGGTCA
GCCTGCTCGA CAGCCAGATG GAAAGCCCGG CGATGCTCTT CGCCGACGAG CAGACCCTGG AGAGCAGCAA GCGCCGCTCC
TACCAGCATG CCGTCTGGA CGGGCGGAC ATGGCCAAGG TGTTCGCTG GATGCGCCC AACGACCTGA TCTGGAAC TA
CTGGGTCAAC AACTACCTGC TCGGCAGGCA GCCGCCGGC TTCGACATCC TCTACTGGAA CAACGACAAC ACGCGGCTGC
CCGCGGCGTT CCACGCGGAA CTGCTCGACC TGTCAAGCA CAACCCGCTG ACCCGCCCGG GCGCGCTGGA GGTCAGCGGG
ACCGCGGTGG ACCTGGGCAA GGTGGCGATC GACAGCTTCC ACGTCGCGG CATCACCGAC CACATCACGC CCTGGGACGC
GGTGTATCGC TCGGCCCTCC TGCTGGGCG CCAGCGCCG TTCATCCTGT CCAACAGCGG GCACATCCAG AGCATCCTCA
ACCTCCCGG AAACCCCAAG GCCTGCTACT TCGAGAACA CAAGTGTAGC AGCGATCCAC GCGCCTGGTA CTACGACGCC
AAGCGGAAG AGGGCAGCTG GTGGCCGGTC TGGCTGGGCT GGCTGCAGGA GCGCTCGGG GAGCTGGGCA ACCCTGACTT
CAACCTTGGC AGCGCGCGC ATCCGCCCT CGAAGCGGCC CCGGCACCT ACGTGCATAT ACGTGAAG CTTCGGCC

```

Un cop comprovats els clons, és possible reciclar del cromosoma el gen de resistència a gentamicina pel sistema *cre-lox* (Quénee *et al.*, 2005) i així deixar els

mutants negatius per la producció de PHAs sense cap tipus de resistència a antibiòtics diferent de les intrínseques a la soca (Kiska *et al.*, 2003), cosa que permet generar altres mutacions. El procés d'eliminació de la resistència a Gm es porta a terme seguint el sistema cre-lox. Aquest sistema es basa en la expressió del gen *cre*, que codifica per una proteïna ADN recombinasa. Aquesta proteïna té la capacitat de reconèixer seqüències de 34 pb de longitud, que es coneixen com a seqüències *lox*, que permeten que Cre recomбини al voltant de l'ADN que les envolta. Primer talla l'ADN pels dos llocs *lox* i seguidament uneix de nou la cadena, donant com a resultat l'escissió de l'ADN entre els llocs *lox* i la seva posterior degradació (Marx *et al.*, 2002).

Donat que el gen de resistència a Gm està flanquejat per les seqüències de reconeixement *lox*, és necessària l'expressió del gen *cre* per tal de reciclar aquest resistència del cromosoma de *P. aeruginosa* 47T2 i 42A2. Aquestes soques no contenen en el seu genoma aquest gen (Stover *et al.*, 2000), per això és necessari electroporar un vector d'expressió del gen *cre*, i es decideix fer servir pCM157 (Quénéée *et al.*, 2005). S'electropora el plasmidi pCM157 en els mutants isogènics defectius de les dues soques, *P. aeruginosa* 42A2 i 47T2 seguint el mètode descrit a l'apartat 3.5.7.3 de Material i Mètodes. El plasmidi pCM157 conté un gen de resistència a tetraciclina (Tc^R) que serveix pel manteniment d'aquest plasmidi a l'interior de *Pseudomonas*. A més a més, expressa la recombinasa Cre que escindeix el gen de resistència a Gentamicina per les seqüències *lox* que flanquegen el gen *aacC1* (Figura 4.29).

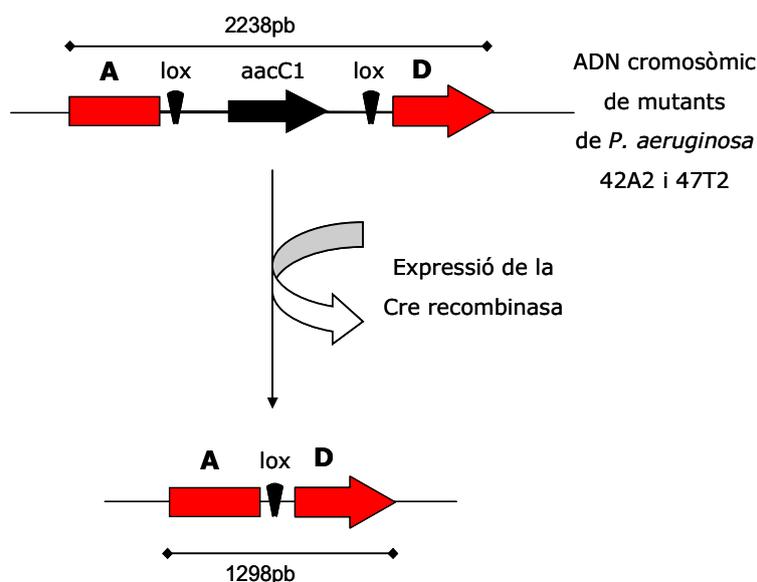


Figura 4.29. Procés d'eliminació del gen de resistència a l'antibiòtic Gm^R (*aacC1*) en els mutants defectius de *P. aeruginosa* 42A2 i 47T2. En introduir per electroporació el plasmidi pCM157, aquest expressa la recombinasa Cre que elimina el gen de resistència gràcies al reconeixement de les seqüències *lox* que el flanquegen.

Els nous transformants obtinguts es seleccionen per la seva resistència a Tc i sensibilitat a Gm (com a conseqüència de l'escissió del gen de resistència *aaaC1*. Posteriorment, el plasmidi pCM157 portador de la nova resistència a Tc es cura mitjançant 3 ressembres successives dels mutants deleccionats en medi sense l'antibiòtic (Tc).

Per últim, es comprova que els mutants hagin perdut la resistència a l'antibiòtic Gm mitjançant amplificació per PCR i posterior seqüenciació, utilitzant els encebadors **A** i **D** (Figura 4.30).

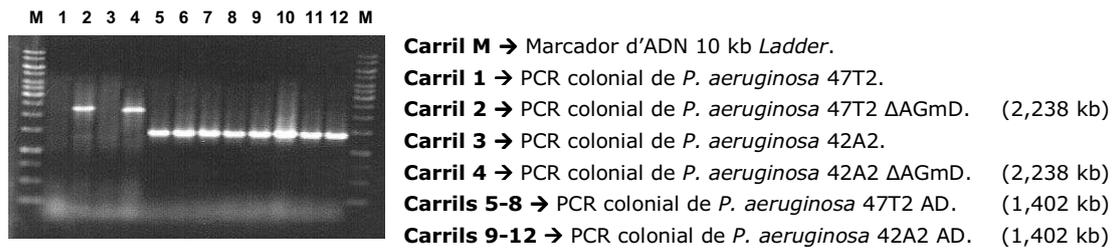


Figura 4.30. Anàlisi en gel d'agarosa dels productes de l'amplificació de les PCRs colonials a partir dels microorganismes indicats a la figura amb els encebadors **A** i **D**. Per les soques parentals no s'observa cap banda d'amplificació ja que aquesta hauria de ser de 4695 pb, mida massa elevada per poder ser amplificat en les condicions en que es realitza la PCR. En canvi en els mutants amb el gen de resistència a Gm sí que apareix la banda esperada d'*AloxGmloxD* d'unes 2,3 kb. Finalment, en aquells mutants als que s'ha eliminat el gen de resistència a Gm amb el vector pCM157 apareix la banda esperada AD de 1,4 kb.

Es considera que s'han obtingut mutants de les dues soques *P. aeruginosa* 42A2 i 47T2 defectius per la producció de PHAs i no resistents a Gm quan es realitza la seqüenciació de l'amplicó *AloxD* de 1402 pb obtingut a partir de les PCRs colonials dels mutants *P. aeruginosa* 42A2 ΔAD i *P. aeruginosa* 47T2 ΔAD als quals se'ls ha escindit el gen de resistència a Gm pel mètode Cre-lox i no s'observa la presència de les seqüències corresponents a la resistència a Gm (Figura 4.31).

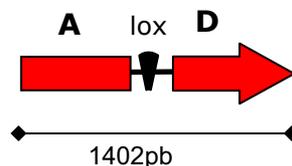


Figura 4.31. Amplicó *AloxD* de 1,402 kb obtingut per amplificació amb els encebadors **A** i **D** a partir del genoma dels mutants de *P. aeruginosa* 42A2 ΔAD i *P. aeruginosa* 47T2 ΔAD defectius per la producció de PHAs i sensibles a Gm.

Seqüenciant els fragments amplificats a partir dels mutants primer amb l'encebador **A** i després amb l'encebador **D** s'aconsegueix determinar la seqüència

final que queda després d'introduir en les soques delectonades el vector pCM157 i de l'actuació la recombinasa Cre que aquest expressa (Taula 4.6). En la seqüència final obtinguda es localitzen els encebadors emprats per obtenir el fragment AD, la seqüència corresponent al fragment A (extrem 5' del gen *phaC1*), la seqüència corresponent al fragment D (extrem 3' del gen *phaC2*), i el lloc de reconeixement de la recombinasa Cre (*lox*) que roman al cromosoma un cop s'allibera per escissió el gen de resistència a Gm *aacC1*.

Taula 4.6. Seqüència del fragment *AloxD*, on es localitzen per ordre les següents seqüències: l'encebador **A** de color en groc, el fragment A (extrem 5' del gen *phaC1*) de color vermell, l'encebador **B** en groc, el lloc de reconeixement de la recombinasa Cre (*lox*) en verd, el fragment D (extrem 3' del gen *phaC2*) i l'encebador **D** en groc. Els requadres són les dianes de restricció BamHI reconstruïdes per on s'ha digerit -AD- i s'ha lligat la resistència a Gm.

```

CGGAATTCTGA TGAGTCAGAA GAACAATAAC GAGCTTCCCA AGCAAGCCGC GGAAAACACG CTGAACCTGA ATCCGGTGAT
CGGCATCCCG GGCAAGGACC TGCTCACCTC CGCGCGCATG GTCCTGCTCC AGGCGGTGCG CCAGCCGCTG CACAGCGCCA
GGCACGTGGC GCATTTTCAGC CTGGAGCTGA AGAACGTCCT GTCGGGCCAG TCGGAGCTAC GCCCAGGCGA TGACGACCGA
CGCTTTTCCG ATCCGGCCTG GAGCCAGAAT CCACTGTACA AGCGCTACAT GCAGACCTAC CTGGCCTGGC GCAAGGAGCT
GCACAGCTGG ATCAGCCACA GCGACCTGTC GCCGCGAGAC ATCAGTCGTG GCCAGTTCGT CATCAACCTG CTGACCGAGG
CGATGTCGCC GACCAACAGC CTGAGCAACC CGCGCGCGGT CAAGCGCTTC TTCGAGACCG GCGGCAAGAG CCTGCTGGAC
GGCCTCGGCC ACCTGGCCAA GGACCTGGTG AACACGAGC TACTGTAGAC A[GGATCC]TAG GGGCCCATGG CTCGAGAAGT
CGACATGTTA ACCATGGTAC CTACGTATAC CGCCGCGTA TTGAAGCATA TCGTATGTAA TATGCTTCAA TACCTGGATC
GGGCCGCAA CTGCGCAAGG TCAGTAGCGT CACCTACCTG GTCAGCCTGC TCGACAGCCA GATGGAAAGC CCGCGATGC
TCTTCGCCGA CGAGCAGACC CTGGAGAGCA GCAAGCGCCG CTCTACCAG CATGGCCTGC TGGACGGGCG CGACATGGCC
AAGGTGTTTC CCTGGATGCG CCCCAACGAC CTGATCTGGA ACTACTGGGT CAACAACCTAC CTGCTCGGCA GGCAGCCGCC
GGCGTTCGAC ATCCTCTACT GGAACAACGA CAACACGCGG CTGCCCGCGG CGTTCCACGG CGAACTGCTC GACCTGTTCA
AGCACAACCC GCTGACCCGC CCGGGCGCGC TGGAGGTCAG CGGGACCGCG GTGGACCTGG GCAAGGTGGC GATCGACAGC
TTCCACGTCG CCGGCATCAC CGACCACATC ACGCCCTGGG ACGCGGTGTA TCGCTCGGCC CTCCTGCTGG GCGGCCAGCG
CCGCTTCATC CTGTCCAACA GCGGGCACAT CCAGAGCATC CTCAACCCTC CCGGAAACCC CAAGGCCTGC TACTTCGAGA
ACGACAAGCT GAGCAGCGAT CCACGCGCCT GGTAACGTA CGCAAGCGC GAAGAGGGCA GCTGGTGGCC GGTCTGGCTG
GGCTGGCTGC AGGAGCGCTC GGGCGAGCTG GGCAACCCTG ACTTCAACCT TGGCAGCGCC GCGCATCCGC CCCTCGAAGC
GGCCCCGGC ACCTACGTGC ATATACGCTG AAAGCTTCGG CC
    
```

4.2.2.1. Anàlisi dels mutants defectius per la producció de PHAs

Un cop obtinguts els mutants i comprovats per PCR i seqüenciació es procedeix a realitzar una anàlisi comparativa dels mateixos amb les soques parentals *P. aeruginosa* 42A2 i 47T2 corresponents.

El contingut de PHAs de les soques mutants i parentals s'analiza per microscòpia òptica d'epifluorescència (MO), per microscòpia electrònica de transmissió (MET), per ressonància magnètica nuclear (RMN) i per gravimetria.

4.2.2.1.1. Anàlisi per Microscòpia Òptica (MO) d'epifluorescència

El colorant Roig Nil (RN) és excel·lent per la detecció de grànuls lipídics intracel·lulars, tant per microscòpia de fluorescència com per citometria de flux, degut a la seva especificitat lipofílica. Tenyint les cèl·lules en suspensió directament amb Roig Nil, com es descriu a l'apartat 3.8.1 de Materials i Mètodes, i observant-les amb el microscopi d'epifluorescència, els grànuls de PHA es veuen ressaltats de color vermell brillant a l'interior de les soques parentals productores d'aquest tipus de biopolímer, mentre que en els mutants defectius obtinguts l'únic que es posa lleugerament de manifest per tinció amb RN són les membranes cel·lulars degut a la manca de grànuls de PHAs (Figura 4.32 i 4.33).

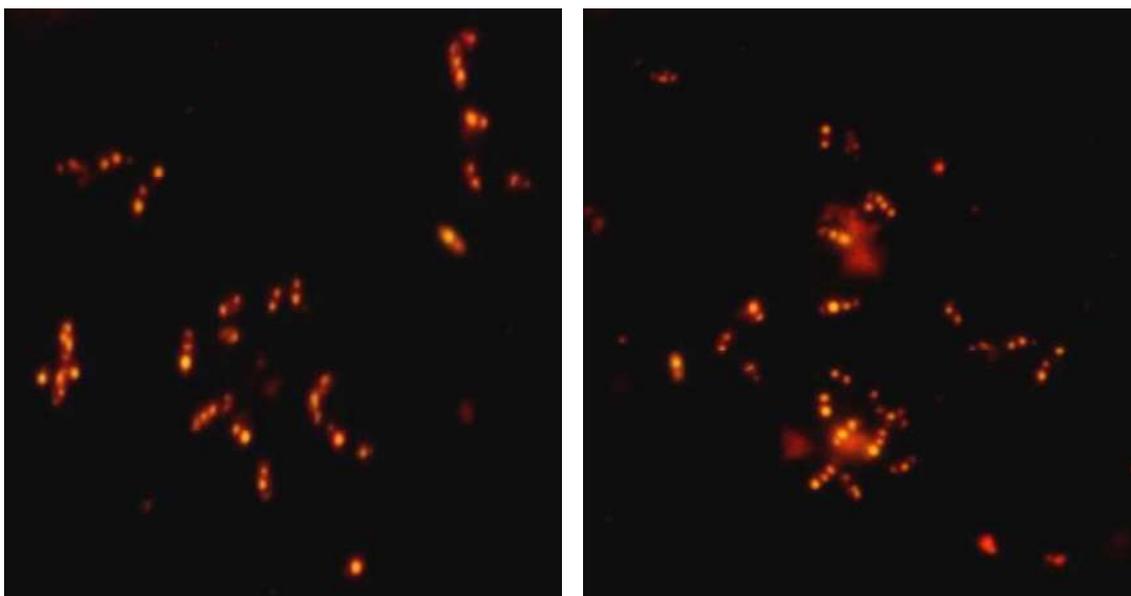


Figura 4.32. Fluorescència del Roig Nil que tenyeix el contingut granular de PHAs de les soques *P. aeruginosa* 47T2 a l'esquerra i *P. aeruginosa* 42A2 a la dreta, tenyides en una suspensió de Ringer ¼ a una concentració de RN de 0,25 mg/mL. Ambdues són imatges preses a 100 X amb el microscopi d'epifluorescència (λ d'excitació: 515-560 nm; λ d'emissió > 590 nm).

La Figura 4.32 correspon a micrografies de les soques parentals *P. aeruginosa* 47T2 a l'esquerra i *P. aeruginosa* 42A2 a la dreta, crescudes en condicions òptimes per la producció de PHAs (Rehm, 2003), medi mínim mineral amb olis de fregits residuals a 30°C i a 100 rpm. Les cèl·lules estan tenyides en

solució tamponada amb Roig Nil i fotografiades sota el microscopi òptic de fluorescència a 100X. Ambdues soques acumulen grànuls de PHAs que fins i tot arriben a deformar les cèl·lules quan en són molt plenes.

En canvi, en la Figura 4.33 les micrografies que es mostren corresponen als mutants negatius per la producció de PHAs de la soca *P. aeruginosa* 47T2 a l'esquerra i *P. aeruginosa* 42A2 a la dreta, crescudes en les mateixes condicions de cultiu i tractades amb Roig Nil de la mateixa manera que les anteriors. Aquests mutants no acumulen grànuls de PHAs a l'interior, ja que tenen els gens PHA sintasa truncats i són incapaços de produir ni acumular PHAs. Així el Roig Nil no evidencia grànuls a l'interior de les seves cèl·lules, si bé les cèl·lules es veuen lleugerament tenyides bé perquè el colorant s'adhereix a la superfície, o bé pels lípids de membrana, i per això emeten una certa fluorescència.

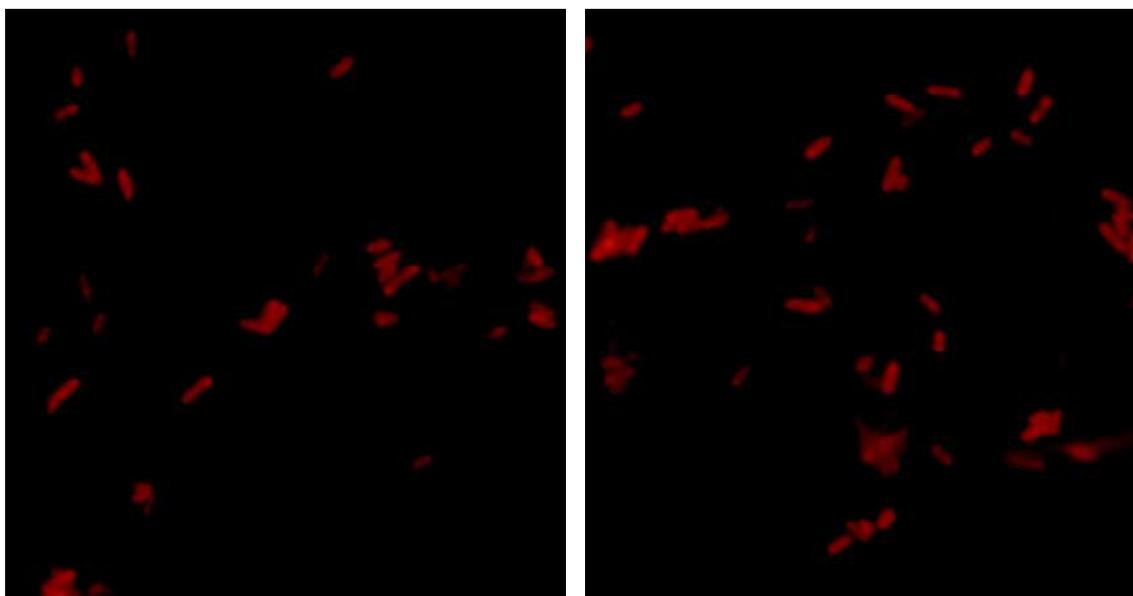


Figura 4.33. Micrografia d'epifluorescència dels mutants negatius per la producció de PHAs de les soques *P. aeruginosa* 47T2 a l'esquerra i *P. aeruginosa* 42A2 a la dreta, tenyides en una suspensió de Ringer ¼ a una concentració de RN de 0,25 mg/mL. Ambdues són imatges preses a 100 X amb el microscopi d'epifluorescència (λ d'excitació: 515-560 nm; λ d'emissió > 590 nm).

4.2.2.1.2. Anàlisi per Microscòpia Electrònica de Transmissió (MET)

La microscòpia electrònica de transmissió ens ajuda a estudiar l'organització citoplasmàtica de les cèl·lules (Ubbink *et al.*, 2005), així ens permet visualitzar els grànuls de PHA que *Pseudomonas aeruginosa* acumula al seu interior. L'acumulació de PHAs en forma d'inclusions discretes a l'interior de moltes cèl·lules bacterianes està àmpliament descrita a la bibliografia (Steinbüchel *et al.*, 1995; Curley *et al.*,

1996; Álvarez *et al.*, 1996 i 1997; Song *et al.*, 1998; Vidal-Mas *et al.*, 2001; Sudesh, 2002; Dennis, 2003; Fernández *et al.*, 2005). Tant és així, que observant dos bacteris per MET, un que produeixi PHAs i un altre que no en produeixi, es poden diferenciar de manera evident els grànuls de PHA a l'interior del bacteri productor. És per això que es decideix fer servir aquesta tècnica per l'estudi comparatiu dels mutants negatius per la producció de PHAs amb les respectives soques parentals.

Per tal de confirmar la presència o absència dels grànuls de PHAs produïts per les soques parentals de *P. aeruginosa* 42A2 i 47T2 i les soques mutants, es va procedir a la seva anàlisi mitjançant microscòpia electrònica de transmissió. Els resultats obtinguts es mostren en les figures 4.34 i 4.35.

D'acord amb la bibliografia existent, en les soques parentals *P. aeruginosa* 47T2 (Figura 4.34 A, C i E) i *P. aeruginosa* 42A2 (Figura 4.35 A, C i E) s'observa la presència de grànuls que apareixen en forma d'inclusions lipídiques intracel·lulars i de color blanc-grisós donat que es mostren transparents als electrons (Fernández *et al.*, 2005). Pel contrari, no s'observen aquestes inclusions en els mutants PHA negatius de les mateixes soques, que no són capaces de produir-ne (Figura 4.34 B, D i F i Figura 4.35 B, D i F). Així, en el cas de la soca *P. aeruginosa* 47T2, les mostres es prenen a 20 hores de cultiu, on els bacteris presenten pocs grànuls i amb una forma arrodonida ben definida. Per contra, per la soca *P. aeruginosa* 42A2, les mostres s'analitzen per MET a les 56 hores de cultiu, temps d'incubació prou llarg que fa que el número de grànuls i la mida dels mateixos hagi augmentat notablement i gairebé a totes les cèl·lules aquests grànuls ocupen la major part del volum intracel·lular, arribant a deformar la cèl·lula en molts casos, fet que també ha estat descrit per altres autors (Steinbüchel *et al.*, 1995; Denis, 2003; Fernández *et al.*, 2005).

A més a més, tant en les soques parentals com en els mutants PHA negatius d'ambdues soques, s'observa la presència d'un altre tipus de grànuls molt més petits i molt més foscos que resulten opacs, més densos al pas dels electrons. D'acord amb resultats anteriors procedents de microanàlisis de raigs X portats a terme per E. Rodríguez, aquestes estructures més petites corresponen a grànuls de polifosfats (Rodríguez, 2005).

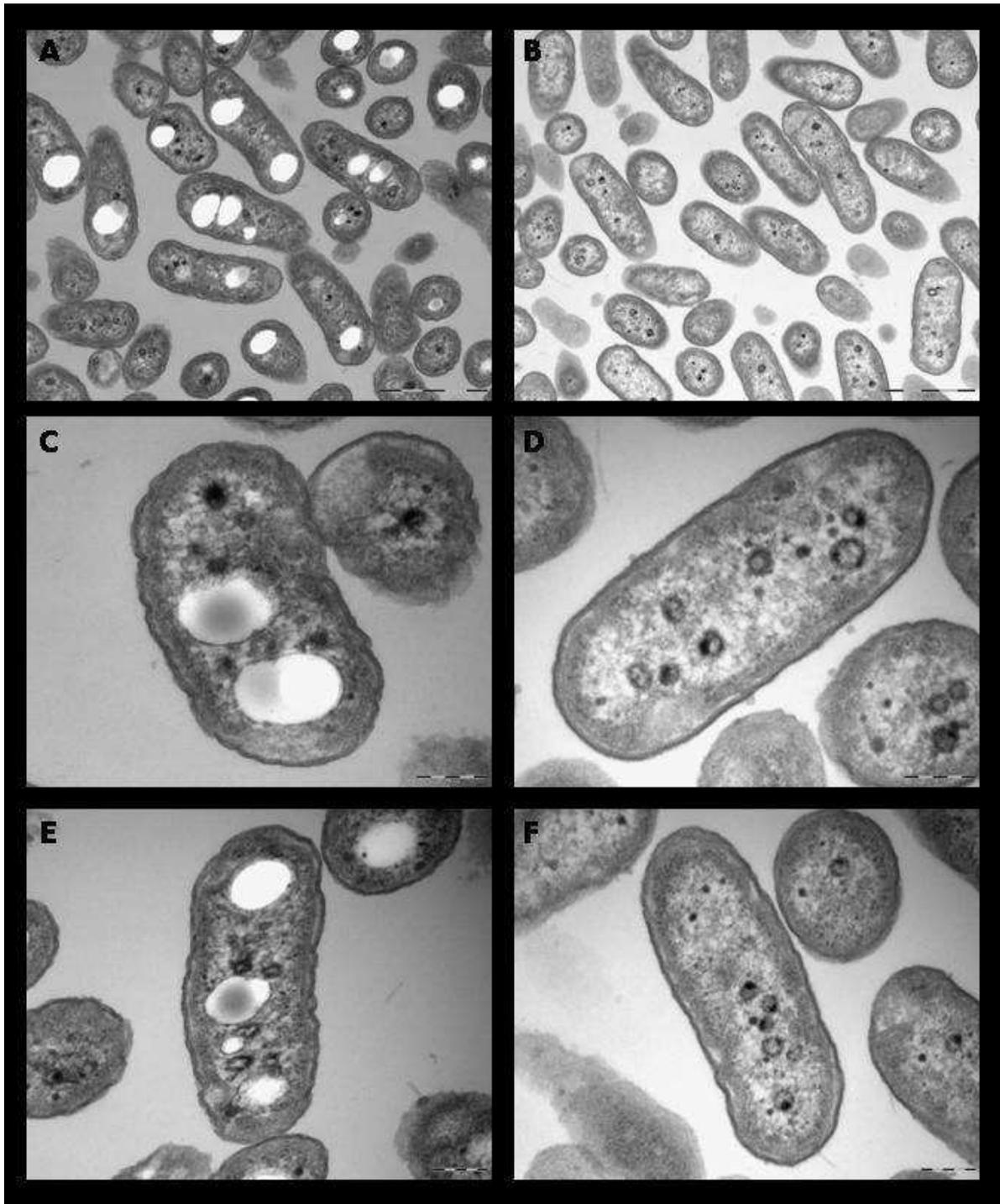


Figura 4.34. Micrografies dels talls prims de cèl·lules obtingudes a partir de cultius de *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 (A, C i E) i dels seus mutants PHA negatiu (B, D i F) crescuts tots ells en medi mínim mineral suplementat amb olis de fregits residuals a 30°C i a 100 rpm. Les mostres són preses després de 20 hores d'incubació. Les barres de magnitud són de 1 μm en A i B i de 200 nm en C, D, E i F.

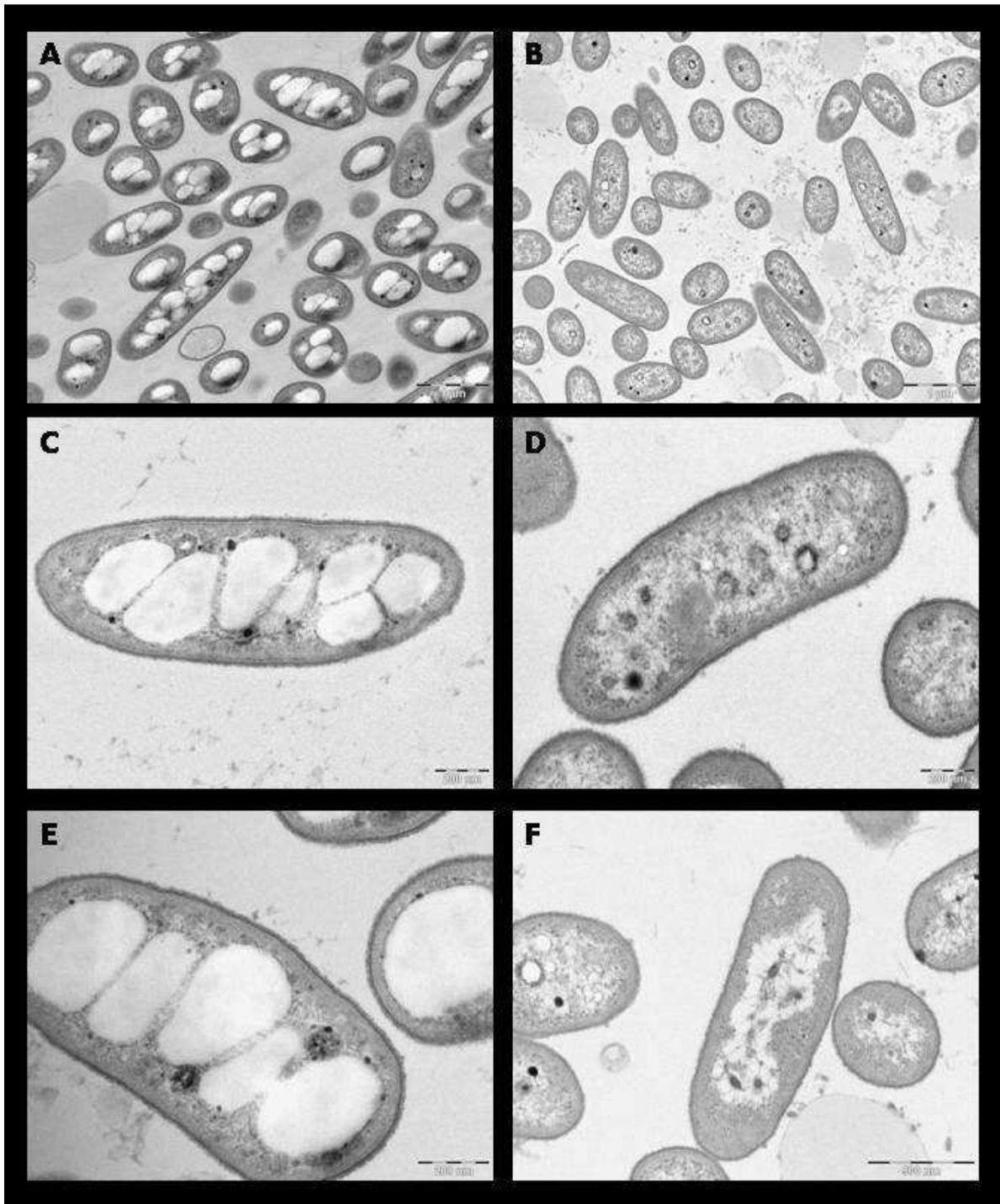


Figura 4.35. Micrografies dels talls prims de cèl·lules obtingudes a partir de cultius de *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 (A, C i E) i dels seus mutants PHA negatius (B, D i F) crescuts tots ells en medi mínim mineral suplementat amb olis de fregits residuals a 30°C i 100 rpm. Les mostres són preses després de 56 hores d'incubació. Les barres de magnitud són de 1 μm en A i B i de 200 nm en C, D i E i de 500 nm en F.

4.2.2.1.3. Anàlisi per Ressonància Magnètica Nuclear (RMN)

La tècnica d'RMN en aquest treball s'utilitza per tal de confirmar la presència en les soques parentals de PHAs i l'absència del polímer en els mutants negatius per a producció de PHAs. No es pretén fer servir la tècnica d'RMN per tal de determinar l'estructura molecular dels PHAs, si bé ja s'ha realitzat anteriorment en el grup de recerca pels PHAs produïts per la soca *P. aeruginosa* 42A2 (Fernández *et al.*, 2005; Rodríguez, 2006 i Bassas, 2007).

Per confirmar la presència o absència de PHAs es fan créixer les soques parentals i els mutants en medi mínim mineral suplementat amb olis de fregits a 30°C a 100 rpm durant 48 hores per la posterior extracció i purificació dels PHAs (apartat 3.8.3 de Materials i Mètodes). Es dissol el polímer en cloroform deuterat (CDCl₃) i es realitza l'anàlisi monodimensional de protó (¹H-RMN) (Serafim *et al.*, 2002). Aquest assaig ens permet distingir les assignacions dels protons de la molècula de PHA sobre un espectre d'RMN. Els senyals més característics per aquests tipus de polímers són els següents (Serafim *et al.*, 2002; Sudesh *et al.*, 2008):

- Els protons metilènics α (H₂) adjacents al grup àcid ressonen a 2,52 ppm.
- El senyal de 5.2 ppm correspon als protons metínic β (H₃) de l'enllaç èster -CH-O-.
- El senyal de 1.57 ppm correspon als protons metilènics (CH₂) en posició H4 de les cadenes alquíliques saturades.
- Els protons alifàtics de les cadenes laterals apareixen entre 1.2-1.4 ppm.
- Els protons dels grups metils terminals -CH₃ ressonen a 0,88 ppm.

L'estructura general dels PHAs es basa en la unió de monòmers 3-hidroxiàlcanoats entre sí mitjançant un enllaç èster format entre el grup carboxil d'un monòmer i el grup hidroxil de l'altre (Witholt *et al.*, 1999). El grup hidroxil substituent es troba en conformació R i enllaçat en posició β com es mostra a la Figura 4.36.

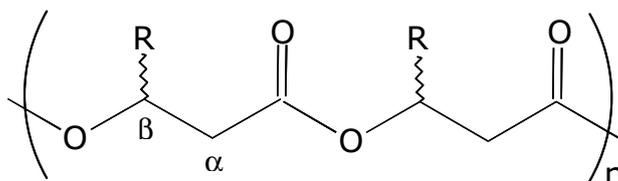


Figura 4.36. Estructura química general dels PHAs constituïts per (R)-hidroxi àcids alcanoats. En funció de les cadenes laterals R i la longitud adoptaran diferents estructures i presentaran un variat ventall de propietats físico-químiques.

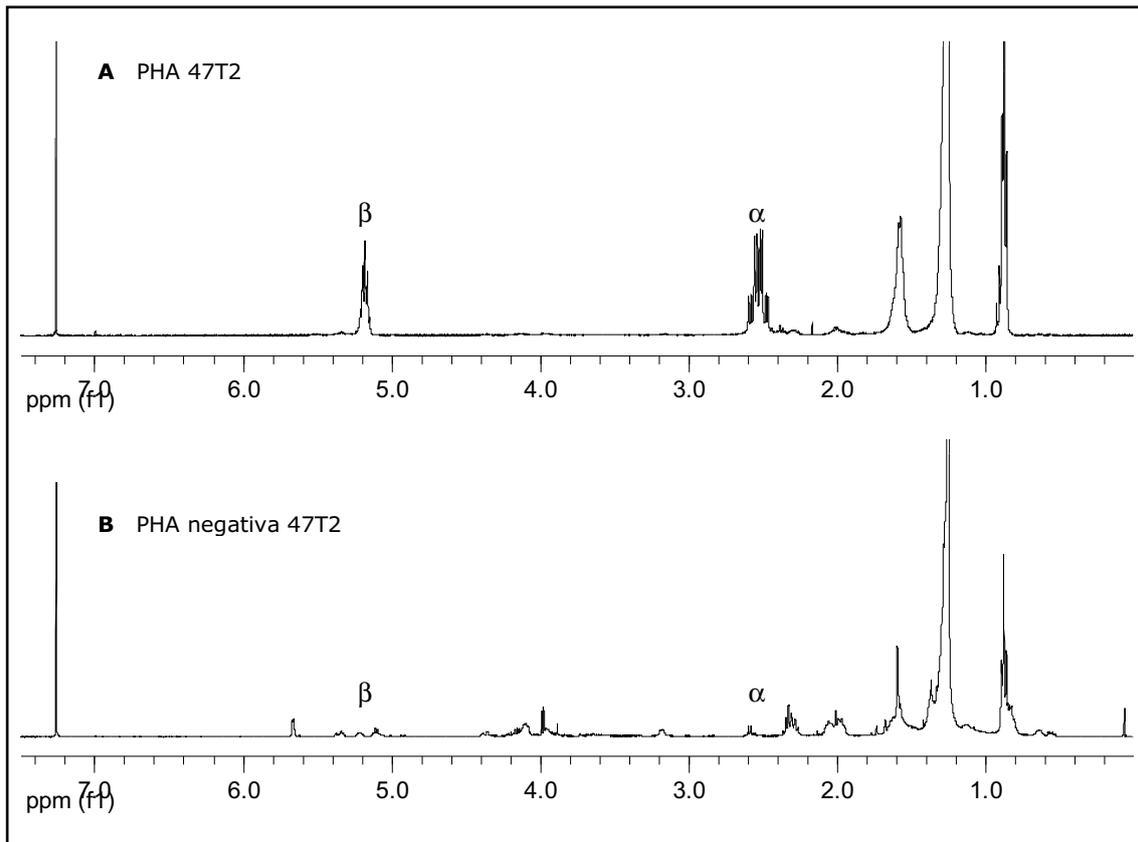


Figura 4.37. Espectres ^1H -RMN dels PHAs purificats obtinguts a partir de *P. aeruginosa* 47T2 (A) i del mutant PHA negatiu de la mateixa soca (B) emprant olis de fregits residuals (50% oliva:50% gira-sol) com a substrat pel creixement. Enregistrat en l'equip Mercury-400F (400 MHz).

En els espectres corresponents a les soques parentals *P. aeruginosa* 47T2 (Figura 4.37 A) i *P. aeruginosa* 42A2 (Figura 4.38 A) el senyal que apareix a $\delta=2.5$ ppm correspon als protons metilènics en posició α al grup carboxil (α) mentre que el senyal que apareix a $\delta=5.2$ ppm correspon als protons terciaris de l'enllaç èster (β). Tots dos senyals, com s'ha dit, són característics dels polímers de PHA, i entre $\delta=0.9$ i 1.6 ppm, apareixen els corresponents senyals als grups CH_2 i CH_3 de les cadenes alquíliques.

Com es pot comprovar als espectres dels mutants negatius per la producció de PHAs de les soques *P. aeruginosa* 47T2 (Figura 4.37 B) i *P. aeruginosa* 42A2 (Figura 4.38 B), els senyals característics α i β desapareixen i apareixen altres corresponents a la presència d'àcids grassos lliures no polimeritzats. La presència d'àcids grassos lliures, així com també de restes de substrats, ve marcada pel senyal de 2.35 ppm que seria l'anàleg de 2.5 ppm en cas de que estiguessin polimeritzats. La presència de restes de substrats, així com també d'àcids grassos

lliures o fins i tot algun monòmer 3-OH, també s'observa als senyals de les cadenes alifàtiques (0.88, 1.2-1.4, 1.6 ppm).

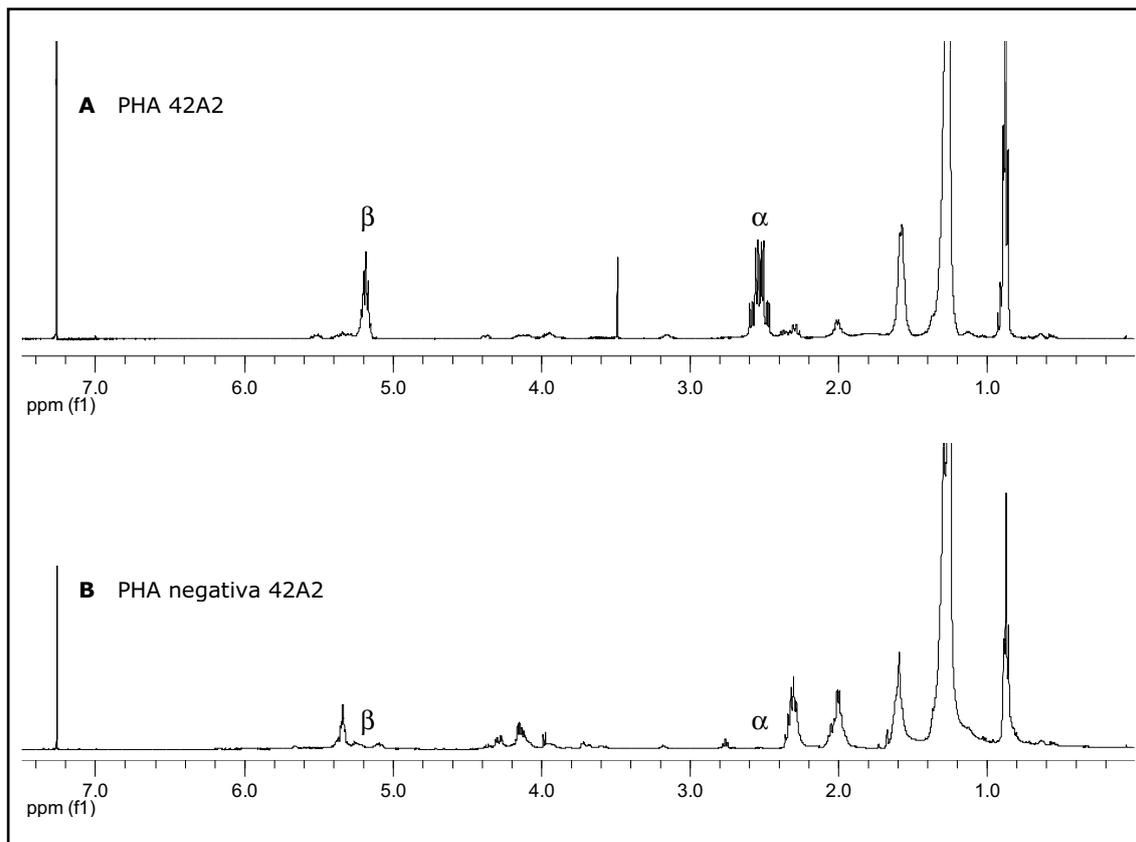


Figura 4.38. Espectres de ¹H-RMN dels PHAs purificats obtinguts a partir de *P. aeruginosa* 42A2 (A) i del mutant PHA negatiu de la mateixa soca (B) emprant olis de fregit residuals (50% oliva:50% gira-sol) com a substrat pel creixement. Enregistrat en l'equip Mercury-400F (400 MHz).

4.2.2.1.4. Quantificació gravimètrica

Per tal de quantificar els PHAs acumulats per les soques *P. aeruginosa* 47T2 i 42A2 i els seus respectius mutants defectius per la producció de PHAs, s'extreuen aquests PHAs i es determina la productivitat per gravimetria (apartat 3.8.5 de Materials i Mètodes, Valentin *et al.*, 2000). Es calcula el % d'acumulació en relació al pes sec liofilitzat de les cèl·lules i finalment es compara la quantitat de PHAs produïts per les soques mutants i parentals al cap de 96 hores de cultiu en medi mínim mineral, fent servir olis de fregit residuals com a font de carboni, a una temperatura de 30°C i a 100 rpm.

Les importants diferències observades en el percentatge d'acumulació de PHAs entre les soques mutants i parentals posen clarament de manifest la

incapacitat dels mutants PHA negatius de produir aquests biopolímers. Mentre que el percentatge d'acumulació de les soques parentals *P. aeruginosa* 47T2 i *P. aeruginosa* 42A2 a les 96 hores de cultiu es troba normalment al voltant del 30%, en els mutants d'aquestes soques defectives per la producció de PHAs, el percentatge d'acumulació és quasi inexistent, no arribant ni tan sols a l'1%. Addicionalment, tenint en compte els resultats obtinguts de l'anàlisi per RMN, no es pot assegurar que aquest 1% que s'està quantificant correspongui realment a PHAs, ja que si les cèl·lules no són prou netes poden arrossegar oli entre altres impureses, podria ser que el que s'està pesant siguin restes.

Els resultats obtinguts en aquest apartat indiquen, sense cap mena d'ambigüitat, que s'han obtingut mutants de les soques *P. aeruginosa* 47T2 i *P. aeruginosa* 42A2 defectius per la producció de PHAs, fet que ha estat posat de manifest mitjançant un seguit de metodologies tant de caràcter fisicoquímic com molecular. Aquests mutants defectius per la producció de PHAs constitueixen eines molt útils a l'hora d'estudiar el flux de carbonis en la cèl·lula i el metabolisme dels lípids, amb la finalitat de veure com afecta el tall d'una via a la producció d'altres metabòlits com ara els Rhls o els AG hidroxilats.

4.3. Estudi comparatiu dels productes obtinguts a partir de les soques *P. aeruginosa* 42A2 Δ AD i 47T2 Δ AD

Un cop obtinguts els mutants negatius per la producció de PHAs, *P. aeruginosa* 42A2 Δ AD i *P. aeruginosa* 47T2 Δ AD, a partir de les respectives soques parentals, el següent pas és l'anàlisi dels productes obtinguts a partir d'aquests mutants. Per veure com ha afectat la interrupció de la via de síntesi de PHA en la producció de la resta de productes del metabolisme lipídic que puguin estar relacionats, es realitza un estudi comparatiu dels productes obtinguts a partir dels mutants amb respecte als obtinguts a partir de les soques parentals.

Com ja s'ha comentat, existeixen diferències a nivell de metabolisme lipídic entre *P. aeruginosa* 47T2 i *P. aeruginosa* 42A2. La primera soca produeix ramnolípids (Rhls) com a tret característic (Lang *et al.*, 1999), mentre que si bé la segona no en produeix, sí que és capaç de transformar els olis de fregit en àcids grassos hidroxilats i polimeritzar-los gràcies a la seva activitat lipolítica (Peláez *et al.*, 2003). Per tant, a l'hora de fer aquest estudi, s'ha decidit tractar separatament una soca i l'altra per tal de centrar l'atenció en els productes obtinguts a partir de cadascuna d'elles.

També s'ha fet referència a que diferències en les condicions de cultiu, així com en la composició del medi, i en especial la font de carboni, poden influir en el metabolisme dels lípids i, en conseqüència, en els productes derivats de la seva bioconversió. Per evitar desviacions que es puguin generar a banda de les derivades del mostreig i les rèpliques, totes les extraccions i quantificacions dels productes obtinguts en aquest estudi s'han realitzat sota les mateixes condicions i a partir de cultius en medi mínim líquid suplementat amb olis de fregit com a font de carboni, a una temperatura de 30°C i en agitació constant (apartats 3.2 i 3.3.1 de Materials i Mètodes). En definitiva, es tracta d'unes condicions adequades per la producció de PHAs (Rodríguez, 2006).

4.3.1. Cinètica de producció de PHAs dels cultius de *P. aeruginosa* 42A2 i *P. aeruginosa* 42A2 Δ AD sobre olis de fregit

Donat que aquesta soca no produeix Rhls (Robert, 1989; Haba *et al.*, 1999), l'anàlisi portat a terme es centra en els productes de bioconversió dels olis de fregit a àcids mono i dihidroxilats (MOHD i DOHD).

Primer s'estudia comparativament la cinètica del cultiu del mutant i la soca parental al llarg de 72 hores per veure si el fet de deleccionar part de la regió gènica *phaC1-phaZ-phaC2* afecta a nivell de creixement i/o consum de font de

carboni. I en segon lloc, la comparativa entre soca mutant i parental es porta a terme sobre la producció dels productes MOHD i DOHD, tenint en compte el creixement bacterià.

Es fa créixer el microorganisme en el medi mínim mineral. Tanmateix, pel que fa a la font de carboni, es parteix d'una concentració inicial d'olis de fregit d'uns 20 g/L, que afavoreix l'acumulació de PHAs (Rodríguez, 2006). D'aquesta manera, amb aquest medi de cultiu, les diferències entre la producció de PHAs de les soques parental i mutant s'haurien de fer més evidents (Figura 4.39).

Taula 4.7. Dades de pes sec, pes residual, consum d'àcid oleic, producció de PHAs, i % de PHA acumulat respecte al pes residual dels cultius de *P. aeruginosa* 42A2 i del mutant PHA negatiu *P. aeruginosa* 42A2 Δ AD.

***P. aeruginosa* 42A2**

Temps (h)	Pes sec (g/L)	Àcid oleic (g/L)	PHA (g/L)	Pes residual (g/L)	% PHA
0	0,000	12,230	0,000	0,000	0
24	2,115	0,246	0,414	1,701	24,34
48	3,869	0,104	0,532	3,337	15,94
72	4,096	0,017	0,728	3,368	21,62

***P. aeruginosa* 42A2 PHA-**

Temps (h)	Pes sec (g/L)	Àcid oleic (g/L)	PHA (g/L)	Pes residual (g/L)
0	0,000	12,230	0,000	0,000
24	1,378	0,292	0,064	1,314
48	2,830	0,233	0,073	2,757
72	3,031	0,105	0,013	3,018

En els cultius de *P. aeruginosa* 42A2 amb 20 g/L de font de carboni d'olis de fregit residuals s'observa que a les 48 hores s'arriba a la fase estacionària amb un pes sec de 3,869 g/L, una producció de PHAs de 0,532 g/L i per tant, un pes residual de 3,337 g/L, i és a les 72 hores quan s'obté el màxim de PHAs, uns 0,728 g/L, que representen un 17,77 % (p/p) d'acumulació. En els cultius de *P. aeruginosa* 42A2 Δ AD també s'assoleix la fase estacionària a les 48 hores però el creixement és inferior (pes sec = 2,83 g/L), probablement degut a la presència de la mutació de la PHA-sintasa. Pel que fa a la producció de PHAs, aquesta representaria un 0,43 % (p/p) d'acumulació a les 72 hores de cultiu, però com s'ha observat a les microfotografies de MET (apartat 4.2.2.1.2, Figura 4.35) i a l'espectre d'RMN (apartat 4.2.2.1.3, Figura 4.38. B), el mutant negatiu no produeix PHAs, així que aquests 0,064 g/L quantificats a les 24 hores i 0,073 g/L a les 72 hores pot ser que siguin resultat de pesar restes lipídiques que poden quedar en rentar les cèl·lules abans de trencar-les i extreure els PHAs i amb l'extracció de lípids totals.

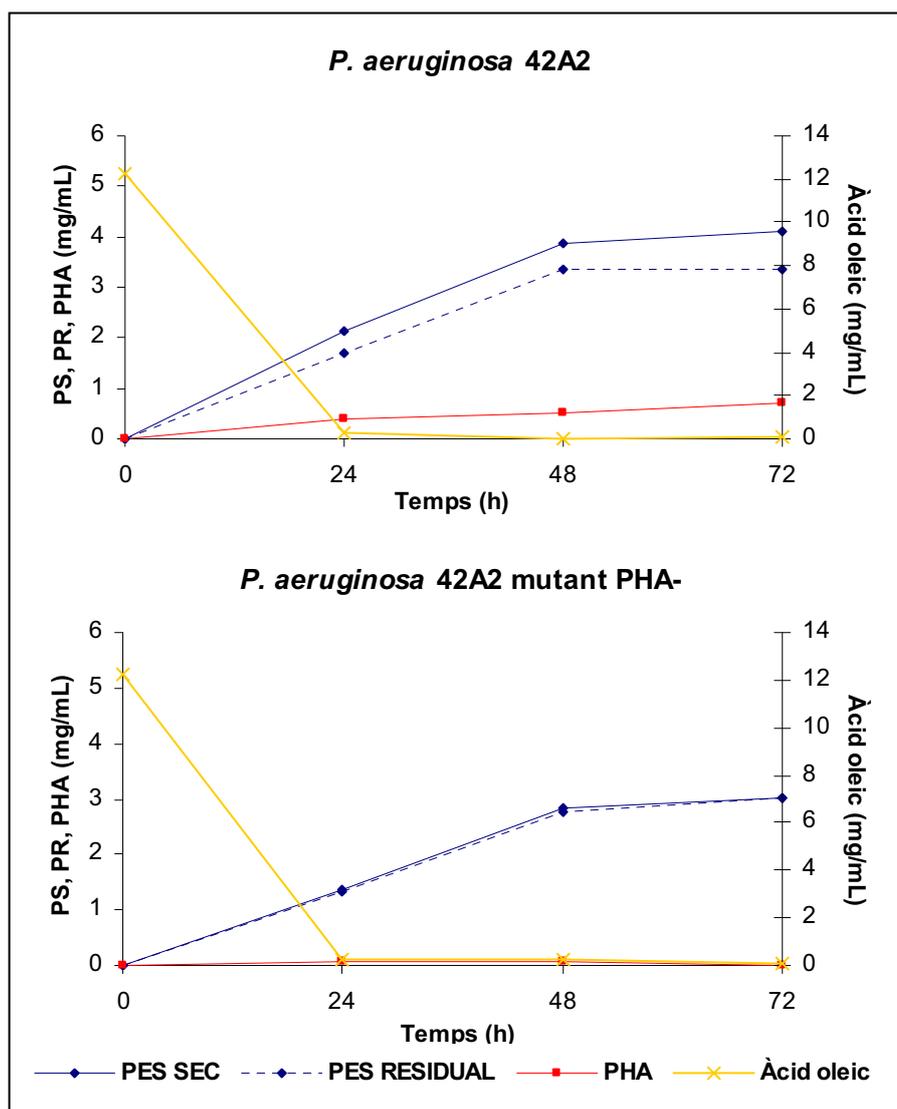


Figura 4.39. Cinètiques de creixement, consum de font de carboni i producció de PHAs de la soca parental *P. aeruginosa* 42A2 i del mutant PHA negatiu *P. aeruginosa* 42A2 Δ AD.

S'ha calculat el rendiment del creixement en aquestes condicions de cultiu respecte al substrat inicial a les 48 hores $Y_{(X/C)}$ (Pes sec residual / Font de carboni inicial). Per la soca parental *P. aeruginosa* 42A2, el rendiment de creixement és d'un 0,27 (27,28 %) i pel mutant PHA negatiu *P. aeruginosa* 42A2 Δ AD el rendiment del creixement és d'un 22,54 %, per tant, es pot dir que el fet de deleccionar la regió gènica *phaC1-phaZ-phaC2* de *P. aeruginosa* 42A2 sembla disminuir el seu creixement en les condicions assajades, ja que en general els mutants creixen més lents ($\mu_{42A2} = 0,03 \text{ h}^{-1}$ $\mu_{42A2 \Delta AD} = 0,02 \text{ h}^{-1}$) i sovint assoleixen una nivell menor de biomassa. Però la diferència fonamental amb el mutant es veu en el rendiment de producció de PHAs respecte al substrat inicial $Y_{(P/C)}$ (PHA / Font de carboni inicial). Si mirem a les 72 hores de cultiu, que és el punt de màxima acumulació, expressat en %, és d'un 5,95 % en la soca *P. aeruginosa* 42A2 mentre

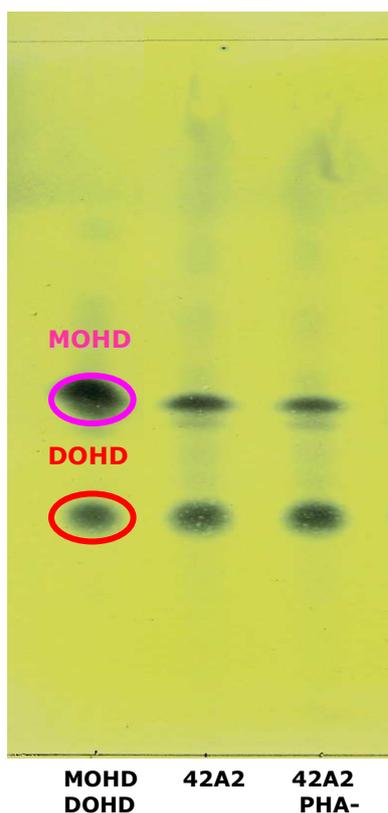
que la conversió de substrat només representa un 0,1 % en el mutant *P. aeruginosa* 42A2 Δ AD defectiu per la producció de PHAs. Aquest fet corrobora novament l'obtenció del mutant *P. aeruginosa* 42A2 negatiu per la producció de PHAs.

4.3.1.1. Determinació de la producció de MHOD i DHOD a partir d'olis de fregit residuals

D'acord als estudis preliminars i a la literatura, la soca *Pseudomonas aeruginosa* 42A2, fent servir oli d'oliva com a font de carboni, produeix un àcid gras insaturat monohidroxilat, l'àcid 10-hidroxi-8E-octadecenoic (MOHD) (Bastida *et al.*, 1999) i un àcid gras insaturat dihidroxilat, l'àcid 7,10-dihidroxi-8(E)-octadecenoic (DOHD) (Mercadé *et al.*, 1988). El creixement també dóna lloc a l'àcid 10-hidroperoxi-8(E)-octadecenoic i a l'àcid 10-hidroxi-8(E)-octadecenoic (Guerrero *et al.*, 1997). Kuo i col·laboradors van confirmar la bioconversió de l'àcid oleic en DOHD sobre 16 soques diferents de *P. aeruginosa* i totes excepte una, tenien la capacitat de portar a terme aquesta biotransformació (Kuo *et al.*, 2004). En els cromatogrames corresponents a l'extracte orgànic de la soca *P. aeruginosa* 42A2 i del mutant PHA negatiu dels cultius en olis de fregit, es detecten els compostos citats a la bibliografia (Figura 4.42).

El seguiment dels productes de biotransformació MOHD i DOHD a partir dels olis de fregit es fa seguint durant 72 hores els cultius de *P. aeruginosa* 42A2 i del mutant PHA negatiu. Així, cada 24 hores s'extreu una alíquota dels cultius i es recuperen els sobrenedants per centrifugació, donat que *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 produeix àcids grassos hidroxilats i els excreta al medi extracel·lular. Finalment aquests compostos s'extreuen per extracció orgànica per tal d'analitzar-los (Culleré, 2002).

La **cromatografia en capa fina** (TLC) s'utilitza per tal de detectar de manera ràpida els àcids grassos hidroxilats presents als extractes orgànics (Christie, 2003). Sobre les plaques revelades s'observa l'aparició de taques de color blau-verd fosc corresponents als diferents compostos (Figura 4.40). Rodríguez i col·laboradors també fan servir aquesta metodologia per identificar els àcids MOHD i DOHD, àcid 11-hidroxi-9(E)-octadecenoic i àcid 9-hidroxi-10(E)-octadecenoic resultants de la biotransformació de l'àcid oleic per *Pseudomonas* sp. 32T3 (Rodríguez *et al.*, 2001).



Les taques que apareixen al primer carril de la Figura 4.40 corresponen a un patró de purificats de l'àcid monohidroxilat (MOHD), la superior, ("Retention factor", Rf= 0,49) i el dihidroxilat (DOHD), la inferior (Rf= 0,33). Aquests Rfs de les taques es reproduïxen en els carrils 2 i 3 corresponents als extractes orgànics del sobrenedant de cultius de 24 hores de *P. aeruginosa* 42A2, el primer, i del mutant 42A2 Δ AD, el segon, cosa que permet la seva identificació.

Per tal de quantificar els productes alliberats per cadascuna de les soques són necessàries tècniques de cromatografia en columnes com ara la cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) o bé la cromatografia de gasos (CG).

Figura 4.40. TLC realitzada sobre plaques ALUGRAM® SIL G/UV254 i fase mòbil constituïda per CHCl_3 , MeOH, HAc (45,0:6,0:0,5) revelada amb àcid fosfomolibdíc i corrent d'aire calent. Les mostres carregades per ordre són: carril 1→patró de MOHD Rf=0,49 i DOHD Rf= 0,33; carrils 2 i 3→ mostres de 24 hores de *P. aeruginosa* 42A2 i 42A2 Δ AD, respectivament.

Per tal d'analitzar els àcids grassos hidroxilats per **cromatografia de gasos** (CG) és necessari metilar les mostres per tal de fer-les volàtils i que puguin ser arrossegades per la fase mòbil, en aquest cas l'heli (He). Les anàlisis s'han portat a terme amb una columna TRB-1 i amb un gradient de temperatures, mantenint la temperatura del detector (FID) a 250°C.

La quantificació de les mostres es basa en la mesura de les àrees dels pics cromatogràfics, que es relacionen amb la concentració de cada producte. Es porta a terme fent servir una recta de calibrat externa obtinguda a partir de dissolucions de diferents concentracions de ricinoleat de metil. Aquest patró prové de l'àcid ricinoleic sotmès al mateix procés de metilació que les mostres de manera paral·lela per tal de fer fiables els resultats. La recta obtinguda és la següent: $Y = 215044x - 63416$; $R^2 = 0,9995$. I amb aquesta recta s'han extrapolat les concentracions de MOHD, DOHD i d'àcid oleic a les diferents mostres dels extractes orgànics metilats de cultius amb olis de fregit com a font de carboni de *P. aeruginosa* 42A2 i del seu mutant PHA negatiu.

També ha estat necessària la metilació dels patrons (àcid oleic, olis de fregit, MOHD i DOHD; Figura 4.41) per tal d'identificar el temps de retenció dels components de les mostres. Els temps de retenció dels patrons en aquest cas són de 6,8 minuts per l'oleat de metil, 10,3 minuts pel MOHD metilat i 13,5 minuts pel DOHD metilat. En la cromatografia de gasos els compostos més polars són retinguts de manera semi-permanent a la fase estacionària i elueixen més tard.

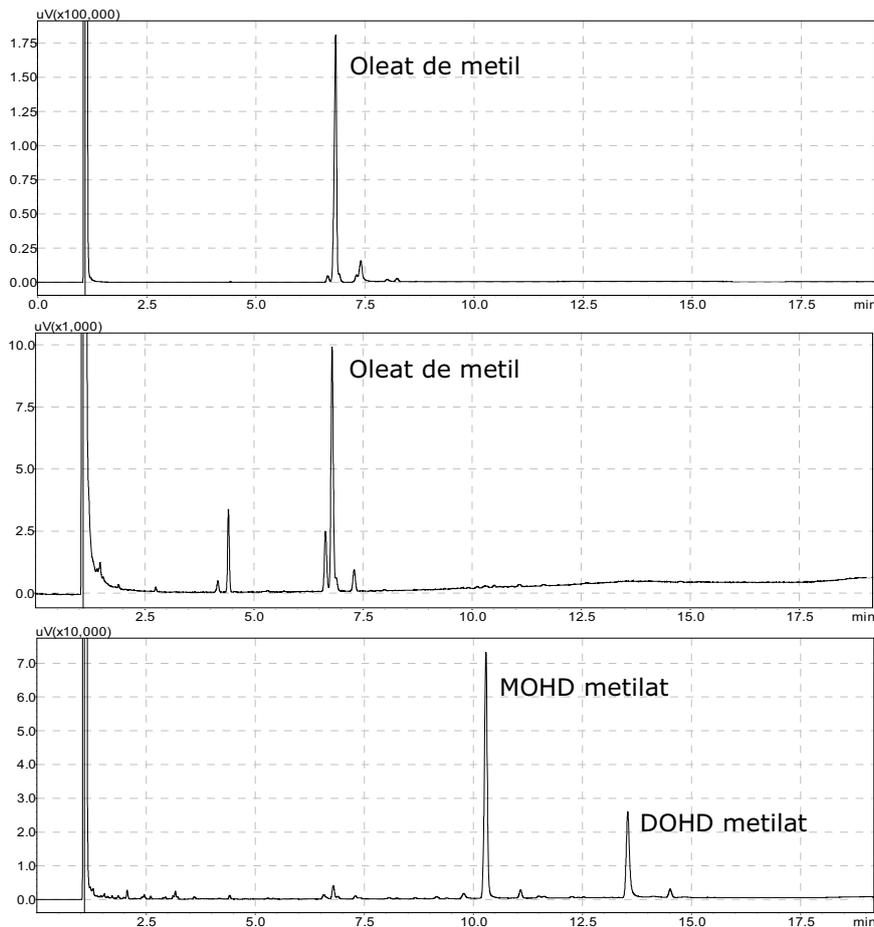


Figura 4.41. Cromatogrames dels patrons utilitzats: àcid oleic metilat (minut 6,8), olis de fregit metilats (50% oli oliva, 50% oli gira-sol) i MOHD metilat (minut 10,3) i DOHD metilat (minut 13,5).

En el cas de la font de carboni (olis de fregit residuals constituïts per oli d'oliva i oli de girasol; 1:1) es segueix únicament l'evolució de l'oleat de metil per ser l'àcid oleic el component majoritari, però cal tenir en compte que l'àcid oleic del qual prové representa el 41,65 % dels olis presents en la font de carboni (Taula 1.1, apartat 1.1 de la Introducció; Haba *et al.*, 2000). Així doncs, la quantitat de font de carboni residual al medi de cultiu es calcula a través d'aquesta dada.

A partir dels cromatogrames obtinguts del mostreig cada 24 hores i prenent els valors de les àrees dels pics identificats, s'extrapolen els resultats per generar una taula de valors amb les concentracions del MOHD i el DOHD produïts (mg/mL) per les soques (parental i mutant) per tal d'elaborar un gràfic amb la cinètica de producció juntament amb el pes sec residual (mg/mL).

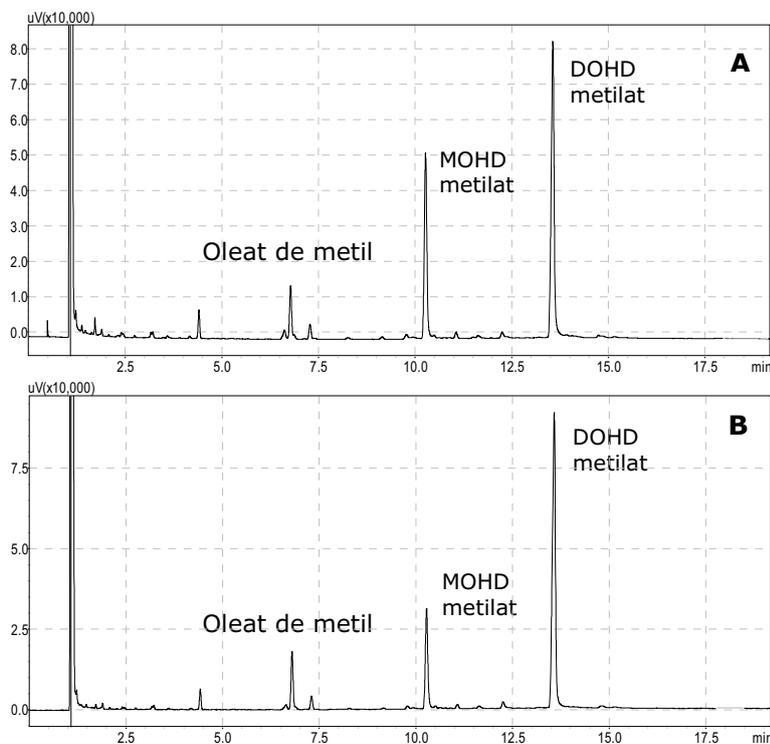


Figura 4.42. Cromatogrames dels extractes orgànics metilats a les 48 hores de cultiu de *P. aeruginosa* 42A2 (**A**) i *P. aeruginosa* 42A2 Δ AD (**B**) on s'identifiquen els components MOHD metilat (minut 10,3) i DOHD metilat (minut 13,5) i la font de carboni (oleat de metil, minut 6,8), segons els temps de retenció.

La producció de MOHD i DOHD en la soca parental *P. aeruginosa* 42A2 (Figura 4.43 a dalt) és similar a la descrita a la bibliografia (Mercadé et al., 1988, Guerrero et al., 1997; Bastida et al., 1999; Culleré et al., 2001) i, en línies generals, la producció en el mutant no difereix gaire. La diferència principal és a nivell del MOHD que, mentre que en la soca parental assoleix el seu màxim a les 24 hores, amb 1,24 g/L, en el mutant (Figura 4.43 a baix) el màxim s'obté a les 48 hores i no arriba al gram (0,71 g/L).

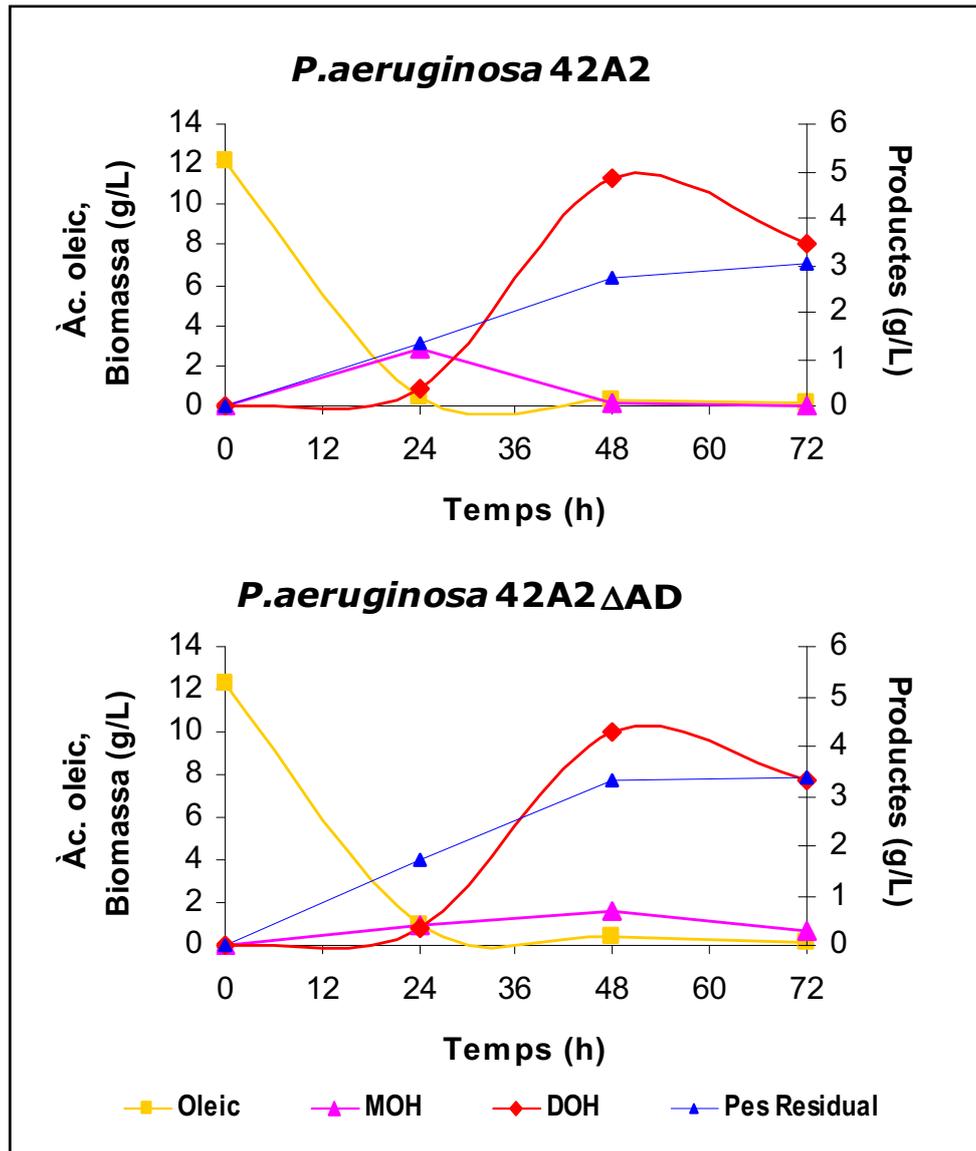


Figura 4.43. Seguiment de la producció de MOHD i DOHD, del creixement i del consum de l'àcid oleic i del pes residual de cultius de *P. aeruginosa* 42A2 (a dalt) i de mutant PHA negatiu *P. aeruginosa* 42A2 Δ AD (a baix).

A nivell de la producció de DOHD, el màxim s'assoleix a les 48 hores i a partir d'aleshores la quantitat de DOHD disminueix fins a les 72 hores. Això pot estar lligat al creixement del bacteri. Andrés i col·laboradors obtenen resultats que suggereixen que l'àcid 7,10-dihidroxí-8(E)-octadecenoic (DOHD) es produeix durant la fase exponencial i la seva producció s'atura quan comença la fase estacionària (Andrés *et al.*, 1994).

Estudiant les dades de la Taula 4.8, es pot calcular el rendiment de bioconversió de l'àcid oleic en DOHD a les 48 hores, que en el cas de la soca parental és de 4,8 g de DOHD per 11,9 g d'àcid oleic consumit, és a dir, un rendiment del 40,34%, mentre que en el mutant el rendiment és d'un 35,5%

(4,201 g DOHD/11,819 g d'àcid oleic consumit). Aquests valors, al voltant del 40% de rendiment, són similars als obtinguts per les soques *P. aeruginosa* NRRL B-218 i NRRL B-3509 (Kuo *et al.*, 2004).

Taula 4.8. Seguiment de la producció d'àcid mono i dihidroxilat (MOHD i DOHD), del consum d'àcid oleic i del pes sec residual de cultius de *P. aeruginosa* 42A2 i de mutant PHA negatiu *P. aeruginosa* 42A2 Δ AD.

***P. aeruginosa* 42A2**

Temps (h)	Àcid Oleic (g/L)	MOHD (g/L)	DOHD (g/L)	Pes Residual (g/L)
0	12,23	0,000	0,000	0
24	0,492	1,239	0,368	1,314
48	0,323	0,063	4,832	2,757
72	0,105	0,008	3,456	3,018

***P. aeruginosa* 42A2 Δ AD**

Temps (h)	Àcid Oleic (g/L)	MOHD (g/L)	DOHD (g/L)	Pes Residual (g/L)
0	12,230	0,000	0,000	0
24	0,922	0,387	0,363	1,701
48	0,411	0,710	4,201	3,337
72	0,177	0,264	3,306	3,368

A grans trets, es pot concloure que no hi ha diferències importants en la tendència de producció d'àcids grassos hidroxilats entre el mutant i la soca parental, si bé la quantitat és lleugerament inferior en el mutant, probablement degut a la disminució en el seu creixement.

4.3.2. Cinètica del cultiu de *P. aeruginosa* 47T2 i *P. aeruginosa* 47T2 Δ AD sobre olis de fregit

La soca *P. aeruginosa* 47T2, a diferència de la 42A2, és capaç de produir Rhls i, donada la seva importància com a biotensioactius, l'anàlisi dels productes de bioconversió dels olis de fregit portat a terme no es centra en àcids mono i dihidroxilats (MOHD i DOHD) que són minoritaris, sinó que es fa una anàlisi més exhaustiva a nivell dels productes majoritaris que són els Rhls. La producció de ramnolípids (Rhls) és característica de *Pseudomonas aeruginosa* i s'ha descrit que altres *Pseudomonas* aïllades no patogèniques com *P. putida* i *P. chloraraphis* i, fins i tot, algun patògen com *Burkholderia pseudomallei* i *Serratia rubidea* també són capaços de produir varietats de ramnolípids (Häusser *et al.*, 1998, 2003; Tuleva *et al.*, 2002; Gunther *et al.*, 2005).

Com s'ha fet a l'apartat anterior amb la soca *P. aeruginosa* 42A2, es comença per un estudi comparatiu de la cinètica del cultiu del mutant i la soca

parental al llarg de 72 hores de cultiu però en aquest cas de *P. aeruginosa* 47T2 i *P. aeruginosa* 47T2 Δ AD. D'aquesta manera es comprova com afecta a nivell de creixement i/o consum de font de carboni la delecció de part de la regió gènica *phaC1-phaZ-phaC2*. A continuació, es procedeix a fer una comparativa entre la soca mutant i la parental a nivell dels Rhls tenint en compte el creixement bacterià (Taula 4.9).

Es fa servir el mateix medi mínim mineral i la mateixa font de carboni d'olis residuals de fregit (20 g/L) que per la cinètica de *P. aeruginosa* 42A2 (apartat 3.2 de Materials i Mètodes), amb el qual la producció i acumulació de PHAs es veu afavorida. En aquestes condicions la soca *P. aeruginosa* 47T2 també és capaç de produir Rhls (Soberón-Chávez *et al.*, 2005).

Taula 4.9. Dades de pes sec, producció de PHAs, pes residual, consum d'àcid oleic i % de PHA dels cultius de *P. aeruginosa* 47T2 i del mutant PHA negatiu *P. aeruginosa* 47T2 Δ AD.

***P. aeruginosa* 47T2**

Temps (h)	Pes sec (g/L)	PHA (g/L)	Pes residual (g/L)	Àcid oleic (g/L)	% PHA
0	0,000	0,000	0,000	12,230	0
24	3,905	0,452	3,453	1,344	11,57
48	5,117	0,636	4,482	0,290	12,43
72	5,684	1,055	4,629	0,126	18,56

***P. aeruginosa* 47T2 Δ AD**

Temps (h)	Pes sec (g/L)	PHA (g/L)	Pes residual (g/L)	Àcid oleic (g/L)
0	0,000	0,000	0,000	12,230
24	2,456	0,112	2,344	1,009
48	2,862	0,116	2,746	0,128
72	3,268	0,024	3,244	0,094

Observant la Taula 4.8 i la Figura 4.44, en els cultius de *P. aeruginosa* 47T2 s'observa que a les 48 hores s'arriba a la fase estacionària, amb un pes sec de 5,117 g/L, una producció de PHAs de 0,636 g/L i, per tant, un pes residual de 4,482 g/L, i és a les 72 hores quan s'obté el màxim de PHAs uns 1,055 g/L, que representen un 18,56 % (p/p) d'acumulació. En canvi, en els cultius de *P. aeruginosa* 47T2 Δ AD s'assoleix la fase estacionària a les 24 hores i el creixement a les 48 hores és inferior (pes sec = 2,862 g/L), probablement degut a la delecció, com passava en el cas del mutant *P. aeruginosa* 42A2 Δ AD. Com ja s'ha dit, en general els mutants creixen més lents ($\mu_{47T2} = 0,057 \text{ h}^{-1}$; $\mu_{47T2 \Delta AD} = 0,037 \text{ h}^{-1}$) i sovint menys. Com en el cas anterior aquest mutant tampoc presenta producció de PHAs i els pesos detectats a les 24 i 48 hores, respectivament, pot ser que no siguin reals sinó que siguin resultat de pesar restes de lípids cel·lulars, ja que ni en

les microfotografies de MET (apartat 4.2.2.1.2, Figura 4.34) ni en l'espectre d'RMN (apartat 4.2.2.1.3. Figura 4.38. A) es detecten PHAs en aquests mutants.

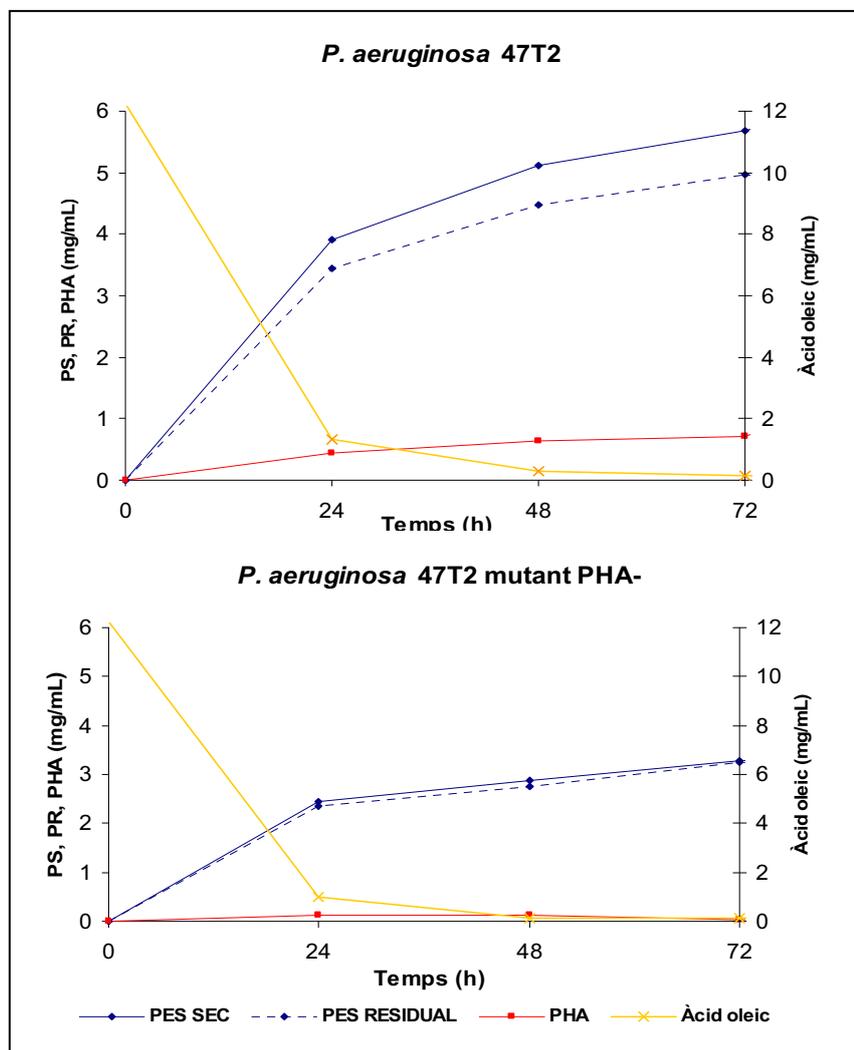


Figura 4.44. Cinètiques de creixement, consum de font de carboni i producció de PHAs de la soca parental *P. aeruginosa* 47T2 i del mutant PHA negatiu *P. aeruginosa* 47T2 Δ AD.

Per la soca parental *P. aeruginosa* 47T2, el rendiment del creixement en aquestes condicions de cultiu respecte al substrat inicial a les 48 hores $Y_{(X/C)}$ (Pes sec residual / Font de carboni inicial) és d'un 0,36 (36,64 %) mentre que pel mutant PHA negatiu *P. aeruginosa* 47T2 Δ AD el creixement és d'un 22,45 %, indicant que la mutació de la regió gènica *phaC1-phaZ-phaC2* de *P. aeruginosa* 47T2 sembla afectar el creixement en les condicions assajades disminuint-lo. Tanmateix, el que sí es veu realment afectat per la mutació és el rendiment de producció de PHAs respecte al substrat inicial $Y_{(P/C)}$ (PHA / Font de carboni inicial). Si mirem a les 72 hores de cultiu, que és el punt de màxima acumulació, el rendiment és d'un 8,63 % en la soca *P. aeruginosa* 47T2 mentre que la conversió

de substrat en PHA no es dona en el mutant *P. aeruginosa* 47T2 Δ AD defectiu per la producció d'aquests compostos.

En calcular el rendiment del creixement sobre els valors de la Taula 4.9, sota les condicions de cultiu utilitzades respecte al substrat inicial a les 72 hores $Y_{(X/C)}$ (Pes sec residual / Font de carboni inicial), per la soca parental *P. aeruginosa* 47T2 el rendiment de creixement és de 0,25, un 25,71 % mentre que pel mutant PHA negatiu *P. aeruginosa* 47T2 Δ AD, el rendiment del creixement és d'un 18,02 %, significativament inferior. Sembla que el fet de deleccionar la regió gènica *phaC1-phaZ-phaC2* de *P. aeruginosa* 47T2 en les condicions assajades afecta al creixement d'aquesta soca fent que disminueixi, tal com succeeix amb la soca *P. aeruginosa* 42A2 on el creixement també es veu una mica alterat. Tanmateix, el que sí es veu realment afectat és el rendiment de la producció de PHAs respecte al substrat inicial $Y_{(P/C)}$ (PHA / Font de carboni inicial), també a les 72 hores de cultiu, que passa de ser d'un 5,86 % en la soca parental *P. aeruginosa* 47T2 a no produir-se'n en absolut en el mutant *P. aeruginosa* 47T2 Δ AD defectiu per la producció de PHAs, tal com es podia preveure.

4.3.2.1. Determinació dels productes excretats al sobrenedant produïts a partir d'olis de fregit residuals

El seguiment dels productes de biotransformació a partir dels olis de fregit residuals es fa durant 72 hores sobre cultius de *P. aeruginosa* 47T2 i del mutant PHA negatiu. S'extreu una alíquota dels cultius cada 24 hores, es recuperen els sobrenedants per centrifugació i es recuperen els productes mitjançant extracció orgànica del sobrenedant (Culleré, 2002, Abalos *et al.*, 2004).

Per tal de quantificar els **àcids grassos hidroxilats** identificats per mitjà de TLC s'analitzen també per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) acoblada a un detector de dispersió de llum (Culleré *et al.*, 2001) per on es passen compostos obtinguts a partir de l'extracte orgànic de les soques *P. aeruginosa* 47T2 i 47T2 Δ AD dissolts en acetonitril o en metanol de qualitat HPLC a través de la columna (Culleré *et al.*, 2001, modificat per Bassas, 2007).

Com es pot apreciar a la Taula 4.10, en aquestes soques el MOHD i el DOHD són productes minoritaris, a les 72 hores de cultiu no es detecta MOHD en cap de les dues soques i de DOHD només se'n detecten 0,278 g/L a la soca parental. La mutació en *P. aeruginosa* 47T2, no només ha afectat la seva producció de PHAs, sinó que ha fet disminuir substancialment el creixement. Mentre que la soca parental a les 72 hores de cultiu té un pes residual de quasi 5 g/L, el mutant PHA negatiu només arriba a uns 3,24 g/L, i això fa que es vegi afectada també

l'acumulació dels productes. Així, la producció de MOHD segueix el mateix perfil en ambdues soques obtenint-se un pic a les 24 hores, de cultiu en la soca parental (0,491 g/L), que es veu reduït quasi a la meitat en la soca mutant (0,275 g/L). En canvi, el perfil de la producció de DOHD és diferent, ja que mentre que en la soca parental el màxim de producció s'obté a les 48 hores de cultiu (0,460 g/L) quan el MOHD ha desaparegut, en el mutant PHA negatiu es dona un màxim també de DOHD (0,626 g/L) a les 24 hores, moment en què apareix també el MOHD però en una quantitat de més del doble.

Taula 4.10. Seguiment de la biomassa en pes sec (PS), de la producció d'àcid mono i dihidroxilat (MOHD i DOHD) i de la tensió superficial (TS) de cultius de *P. aeruginosa* 47T2 i de mutant PHA negatiu *P. aeruginosa* 47T2 ΔAD.

***P. aeruginosa* 47T2**

Temps (h)	Pes residual (g/L)	MOHD (g/L)	DOHD(g/L)	TS (mN/m)
0	0,000	0,000	0,000	70,30
24	3,453	0,491	0,315	40,62
48	4,482	0,000	0,460	36,59
72	4,629	0,000	0,278	40,62

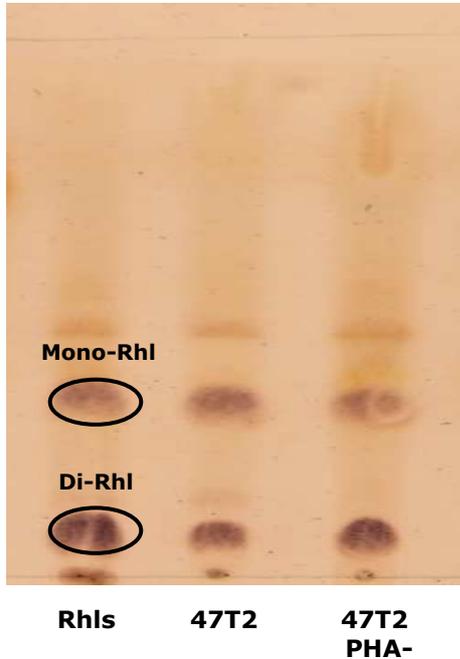
***P. aeruginosa* 47T2 PHA-**

Temps (h)	Pes residual (g/L)	MOHD (g/L)	DOHD (g/L)	TS (mN/m)
0	0,000	0,000	0,000	70,30
24	2,344	0,275	0,626	35,49
48	2,746	0,000	0,056	35,97
72	3,244	0,000	0,006	36,16

Pel que fa a la **tensió superficial**, aquesta es mesura amb un tensiòmetre a partir dels sobrenedants dels cultius centrifugats, abans de fer l'extracció orgànica per detectar i quantificar els productes. El fet que els sobrenedants dels cultius de *P. aeruginosa* 47T2 i *P. aeruginosa* 47T2 ΔAD tinguin TS baixes (Taula 4.10, entre 35 i 40 mN/m) significa que les soques excreten biotensioactius capaços de reduir la TS. Així, es procedeix a una identificació presumptiva d'aquests compostos per la tècnica qualitativa de **cromatografia en capa fina (TLC)**, esperant detectar i fer una identificació preliminar dels Rhls. Es fan servir les mateixes plaques ALUGRAM® SIL G/UV254 que per detectar els àcids grassos hidroxilats presents als extractes orgànics. El que canvia és la fase mòbil utilitzada i el revelat, que es realitza mitjançant la nebulització del reactiu de Molish pels Rhls (apartat 3.9.2 de Materials i Mètodes). En revelar les plaques i sotmetre-les a un corrent d'aire calent s'observa l'aparició de taques de color marró morat (Figura 4.47).

Com s'ha descrit a la introducció (apartat 1.3.5.3), els Rhls són una o dues molècules de ramnosa unides a una o dues cadenes d'àcid gras saturats o

insaturats de longitud de cadena variable (C8-C14 àtoms de carboni). Sobre la TLC (Figura 4.47) es poden identificar aquests dos grups de Rhls, els monoramnolíds (mono-Rhls) i els diramnolíds (di-Rhls), que migren amb diferent velocitat donada la seva diferent estructura i polaritat.



Les taques que apareixen al primer carril corresponen a un patró de Rhls purificats de Mono-Rhl la superior ($R_f = 0,33$) i de Di-Rhl la inferior ($R_f = 0,08$). Aquestes taques es reproduïxen en els carrils 2 i 3 corresponents als extractes orgànics del sobrenedant de cultius de 96 hores de *P. aeruginosa* 47T2, el primer, i del mutant 47T2 ΔAD , el segon. Un cop detectats els Rhls per TLC es procedeix a la seva quantificació.

Figura 4.47. TLC revelada amb reactiu de Molish i corrent d'aire calent. Les mostres carregades per ordre són: carril 1 \rightarrow patró de Rhls (mono i di-Rhls), carrils 2 i 3 \rightarrow mostres dels extractes orgànics de cultius de 96h de *P. aeruginosa* 47T2 i 47T2 PHA-.

Els **Rhls** es quantifiquen de manera indirecta per Espectroscòpia d'Absorció Molecular. Es quantifica la quantitat de ramnosa dels sobrenedants (Chandrasekaran *et al.*, 1980) i aplicant el factor de correcció (X3) s'obté la quantitat de Rhls (Itoh *et al.*, 1971). Com s'observa a la Figura 4.46 el perfil és el mateix en la soca parental i en el mutant, segueix una línia ascendent de les 24 hores (0 g/L) a les 72 hores (4,654 g/L), que és més baixa en el cas del mutant (de 0 a 3,736 g/L) probablement com a conseqüència de la disminució del creixement en aquest (Taula 4.11). Tanmateix, tenint en compte el pes residual, la disminució en la producció de Rhls no és proporcional a la disminució de creixement observada. Això suggereix que el mutant produeix més quantitat de Rhls per gram de pes residual que la soca parental. Segurament fent servir un medi optimitzat per la producció de Rhls, aquesta podria arribar a ser superior (Abalos *et al.*, 2002).

El rendiment cel·lular de producció de ramnolíds respecte a la biomassa ($Y_{(P/X)}$) en la soca parental a les 72 hores és d'1 gram de Rhls per cada gram de biomassa seca, similar al 0,85 descrit per Abalos *et al.*, 2000, amb la mateixa font de carboni però amb la soca *P. aeruginosa* AT10, mentre que pel mutant la $Y_{(P/X)}$ és d'1,15. Això podria ser degut a que part de l'intermediari comú (àcid β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoic (HAA's), Soberón-Chávez *et al.*, 2005), que no es

destina a la producció de PHA en el mutant, passa a la producció de Rhls, tot i que la diferència no sigui molt gran.

A l'hora d'estudiar la tensió superficial (TS) en el sobrenedant dels cultius de *P. aeruginosa* 47T2 i el mutant PHA negatiu, s'ha de tenir en compte un factor molt important que hi influeix: la producció de biotensioactius per *P. aeruginosa* 47T2.

Taula 4.11. Seguiment de la biomassa en pes sec (PS), de la producció Rhls i de la tensió superficial (TS) de cultius de *P. aeruginosa* 47T2 i del mutant PHA negatiu *P. aeruginosa* 47T2 Δ AD.

<i>P. aeruginosa</i> 47T2			
Temps (h)	Pes residual (g/L)	TS (mN/m)	Rhls (g/L)
0	0,000	70,30	0,000
24	3,453	40,62	2,169
48	4,482	36,59	3,435
72	4,629	40,62	4,654

<i>P. aeruginosa</i> 47T2 PHA-			
Temps (h)	Pes residual (g/L)	TS (mN/m)	Rhls (g/L)
0	0,000	70,30	0,000
24	2,344	35,49	1,887
48	2,746	35,97	2,866
72	3,244	36,16	3,736

Observant la Taula 4.11, es detecta que en els cultius de *P. aeruginosa* 47T2, a les 24 hores la TS baixa des de 70,03 mN/m fins a 40,62 mN/m i a les 48 hores, en augmentar la quantitat de Rhls, segueix baixant fins a 36,59 mN/m. En canvi, a les 96 hores torna a haver-hi una lleugera pujada fins als 40,02 mN/m tot i haver augmentat la quantitat de Rhls. El fet que a les 48 hores la TS sigui més baixa podria ser degut a que és el punt en el qual hi ha més DHOD (Figura 4.46). Segons la bibliografia, els derivats hidroxilats destaquen pel seu ús com a tensioactius o agents antimicrobians i/o antifúngics (Fabritius *et al.*, 1996). I, concretament, l'àcid 7,10-dihidroxi-8(E)-octadecenoic (DOHD) produït per *P. aeruginosa* 47T2 a partir de la conversió de l'àcid oleic, té la capacitat de disminuir la TS (Mercadé *et al.*, 1988). Juntament amb altres àcids grassos mono- i dihidroxilats sintetitzats sintèticament, aquests compostos es poden fer servir en microemulsions o bé com additius per diversos productes comercials (Knothe *et al.*, 1995). A més a més, en ocasions un tensioactiu actuant per si sol és menys efectiu i, en canvi, si actua com a barreja amb un altre, augmenta la seva efectivitat (Desai *et al.*, 1997, Mujica *et al.*, 2000). Podria ser que el tàndem DOHD-Rhls fos més eficient que els Rhls per si sols, però això requeriria un estudi més exhaustiu.

Pel que fa al mutant *P. aeruginosa* 47T2 Δ AD la TS més baixa (35,49 mN/m) s'enregistra a les 24 hores coincidint també amb el pic de DOHD (0,626 g/L), però en continuar augmentant l'acumulació de Rhls, puja una mica en desaparèixer el DHOD, encara que no gaire, i es manté al voltant de 36 mN/m a les 48 i a les 96 hores. Això recolza la idea de la sinèrgia entre el DOHD i el Rhls.

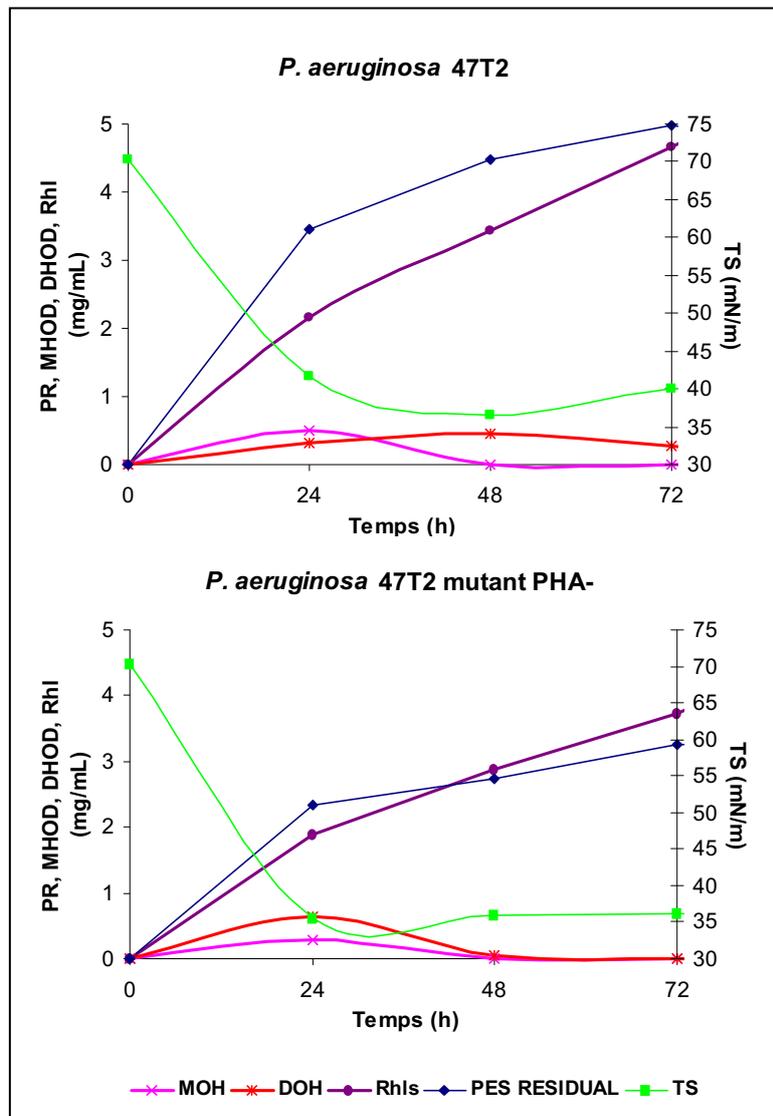


Figura 4.46. Seguiment de la producció de MOHD i DOHD, del creixement i de la tensió superficial de cultius de *P. aeruginosa* 47T2 i de mutant PHA negatiu *P. aeruginosa* 47T2 Δ AD.

En general, la tendència de producció dels cultius de la soca parental i del mutant és molt similar (Figura 4.46). La principal diferència es dóna a nivell del DOHD, que en *P. aeruginosa* 47T2 arriba al màxim de producció a les 48 hores i després disminueix lentament i, en canvi, en el mutant *P. aeruginosa* 47T2 Δ AD, el màxim s'assoleix a les 24 hores i després gairebé desapareix a les 48 hores. Això segurament sigui conseqüència de la diferència de creixement, ja que en el mutant

s'arriba a la fase estacionària a les 24 hores, mentre que en la soca parental sembla que es retarda una mica la fase estacionària i per tant es continua sintetitzant DOHD (Figura 4.46).

Donat que la determinació dels Rhls per TLC (Itoh *et al.*, 1971) és un procediment poc sensible, s'apliquen tècniques **d'HPLC i espectrometria de masses (EM)** per la caracterització química dels Rhls com a tècnica combinada (Deziel *et al.*, 1999; Abalos *et al.*, 2002; Haba *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2007). La combinació HPLC/EM suposa l'ús de l'espectròmetre de masses com a detector del cromatògraf líquid. Les mostres eluïdes i separades per HPLC són recollides i analitzades individualment per l'EM, cosa que fa la tècnica més sensible i eficient per conèixer la composició dels Rhls sintetitzats per *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 i pel mutant PHA negatiu. Primer s'introdueix la mostra pulveritzada i ionitzada (per això es denomina EM amb ionització per electrospray (ESI)) a l'analitzador de masses quadrupol on els ions generats són accelerats en un camp elèctric per penetrar a continuació en un tub de recorregut o vol lliure sense camp elèctric. Per un voltatge d'acceleració determinat s'enregistra el temps de vol ("Time-Of-Flight", TOF) que triga un ió a arribar al detector, que és proporcional a la seva relació massa/càrrega, m/z . La fragmentació dels enllaços de la molècula exposada a un bombardeig electrònic permet la obtenció del seu espectre de masses corresponent.

La figura 4.48 presenta els cromatogrames d'ions totals ("Total Ion Chromatogram", TIC) obtinguts per HPLC/EM de mostres de ramnolípid purificats de la soca *P. aeruginosa* 47T2 de cultius de 48, 72 i 96 hores suplementats amb olis de fregit, a l'esquerra i del mutant PHA negatiu *P. aeruginosa* 47T2 ΔAD a la dreta. Aquests cromatogrames mostren la disposició de tots els compostos ionitzats que han estat extrets del sobrenedant dels cultius i és a partir d'aquests que es rastregen els ions pseudomoleculars que defineixen cada ramnolípid.

El TIC es pot estudiar de dues maneres diferents, o bé s'analitza cada pic majoritari per veure a què correspon, o bé coneixent la massa teòrica de la molècula que busques, es rastreja sobre el TIC buscant el seu ió pseudomolecular per veure en quin minut apareix, que és el que s'ha fet en el present treball. No s'observen grans diferències entre els TICs de les diferents hores de cultiu, la qual cosa significa que les diferències entre les abundàncies relatives de les diferents espècies de Rhls al llarg de les 96 hores de cultiu, no són molt importants. Però per saber-ho amb certesa és necessari comprovar-ho a nivell dels espectres dels ions pseudomoleculars ("eXtracted-Ion-Current", XIC).

En ESI negatiu només es visualitzen les molècules carregades negativament, per tant, a l'hora de rastrejar la massa es busca l'ió pseudomolecular $[M-1]^-$. En aquestes condicions, l'espectre de masses generat mostra els pics dels ions

pseudomoleculars molt intensos, degut a la desprotonació del grup carboxil dels Rhls, que porta la major proporció de l'ió total. A cada homòleg de Rhl li correspon, per tant, un pic i les àrees obtingudes a partir d'aquests són les que s'utilitzen per calcular les abundàncies relatives de cada tipus de Rhl. Posteriorment es pot comprovar que efectivament es tracta del ramnolípid sospitat mitjançant l'espectre de les fragmentacions iòniques (TOF).

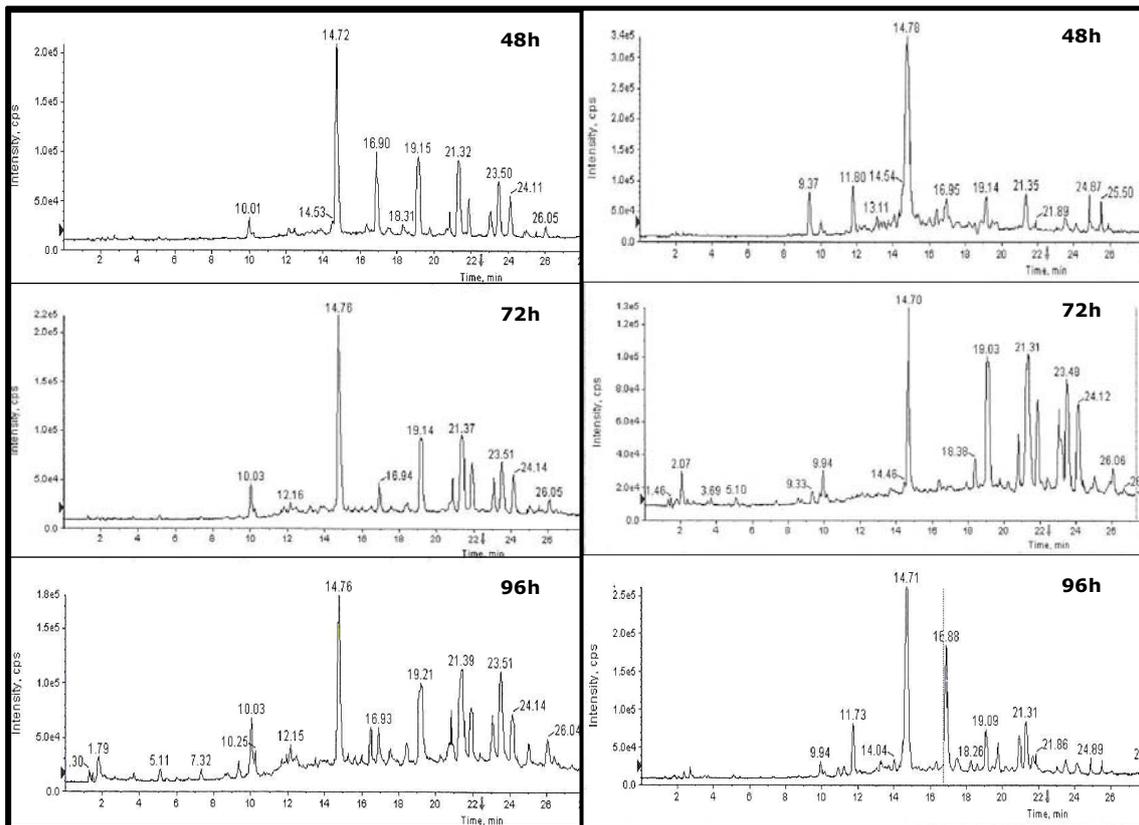


Figura 4.48. Cromatograma d'ions totals (TIC) dels extractes de sobrenedants de 48, 72 i 96 hores de cultius fets amb olis de fregit com a font de carboni amb la soca *P. aeruginosa* 47T2 (esquerra) i la soca mutant PHA negatiu *P. aeruginosa* 47T2 Δ AD (dreta).

Per veure models de fragmentació es trien dos Rhls majoritaris en la barreja de tensioactiu, el mono ($R-C_{10}-C_{10}$) i el di-Rhl ($R_2-C_{10}-C_{10}$). Les fragmentacions fonamentals observades corresponen al trencament de l'enllaç èster ($-COO-$) entre les cadenes carbonades i el trencament de l'enllaç glicosídic ($-O-$) entre la unitat de ramnosa i la cadena del β -hidroxilàcid. La fragmentació de l'enllaç èster és la més important ja que permet diferenciar entre sí als mono i di-Rhls (Haba *et al.*, 2003; Abalos *et al.*, 2002).

La Figura 4.49 és una representació esquemàtica de les fragmentacions que es produeixen sobre la molècula **R-C₁₀-C₁₀** de massa molecular 503 m/z, que dóna lloc a l'aparició dels pics a l'espectre de fragmentacions TOF (Figura 4.50).

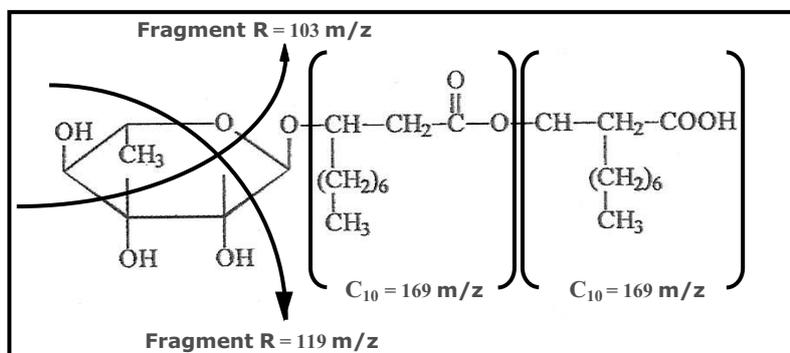


Figura 4.49. Esquema teòric de les fragmentacions bàsiques del mono-Rhl majoritari R-C₁₀-C₁₀ (503 m/z). La molècula de ramnosa (R) té dues possibles fragmentacions una de 103 m/z i l'altre de 119 m/z, l'àcid gras de 10 àtoms de carboni dona lloc a un fragment de 169 m/z i tots dos junts C₁₀-C₁₀ donen lloc a un fragment de 339 m/z.

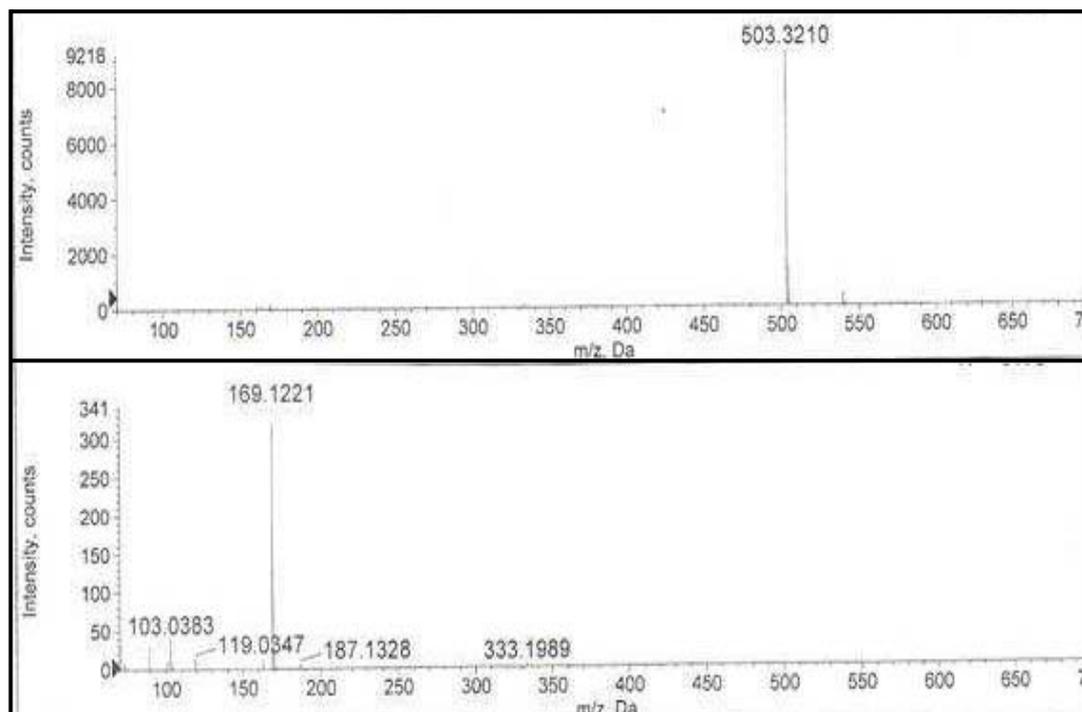


Figura 4.50. Espectre de fragmentacions (TOF) ampliat de l'ió pseudomolecular [M-H]⁻ del ramnolípid R-C₁₀-C₁₀ de massa molecular 503 m/z extret del sobrenedant d'un cultiu de 96 hores de *P. aeruginosa* 47T2 utilitzant olis de fregit com a font de carboni.

Sobre l'espectre (Figura 4.50), el pic o fragment de 103 m/z i el de 119 m/z corresponen a un trencament intern de la molècula de ramnosa, el de 169 m/z és un fragment corresponent a l'alliberament de l'àcid gras de 10 carbonis (Figura 4.50). També es detecten fragmentacions més grans corresponents a la molècula de ramnosa lligada a un dels àcids grassos (es trenca l'enllaç ester: 333 m/z R-C₁₀) i, per altra banda, als àcids grassos lligats entre sí (es trenca l'enllaç glicosídic 339 m/z), però en quantitats molt baixes perquè han estat més fragmentats i per això no estan retolats a l'espectre, donat que el software només marca els pics més aparents.

La Figura 4.51 representa esquemàticament fragmentacions que es produeixen sobre la molècula de ramnolípide **R₂-C₁₀-C₁₀** de massa molecular 649 m/z, que donen lloc a l'aparició dels pics a l'espectre de fragmentacions TOF (Haba *et al.*, 2003) (Figura 4.52).

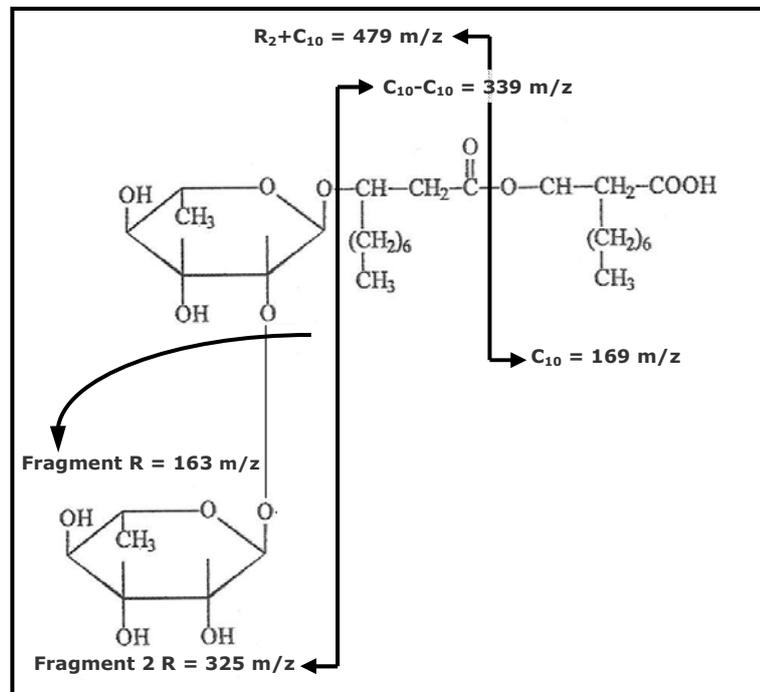


Figura 4.51. Esquema teòric de les fragmentacions més probables del di-Rhl **R₂-C₁₀-C₁₀** (m/z). Les dues molècules de ramnosa (R-R) donen lloc a un fragment de 335 m/z i separant una sola ramnosa dona lloc a un fragment de 163 m/z. Un àcid gras de 10 àtoms de carboni dona lloc a un fragment de 169 m/z i tots dos junts C₁₀-C₁₀ donen lloc a un fragment de 339 m/z.

El pic o fragment de 163 m/z correspon al trencament d'un enllaç glicosídic de la molècula separant una de les dues ramnoses, el de 169 m/z i el de 479 m/z són els fragments resultants de la fragmentació de l'àcid gras de 10 carbonis, per una banda, i el de les dues ramnoses amb l'altre àcid gras, per l'altra (R₂-C₁₀, Figura 4.51). Aquest és el fragment que ens indica que es tracta d'un di-Rhl.

Al TOF (Figura 4.52), no es detecten les fragmentacions corresponents a les dues molècules de ramnosa lligades entre sí ni als dos àcids grassos lligats entre sí perquè s'han fragmentat massa degut a la força d'impacte a què han estat sotmesos els ions. En canvi sí s'enregistren pics corresponents a la fragmentació de la molècula de ramnosa de m/z 103 i 119, però en quantitats baixes i no estan retolats a l'espectre.

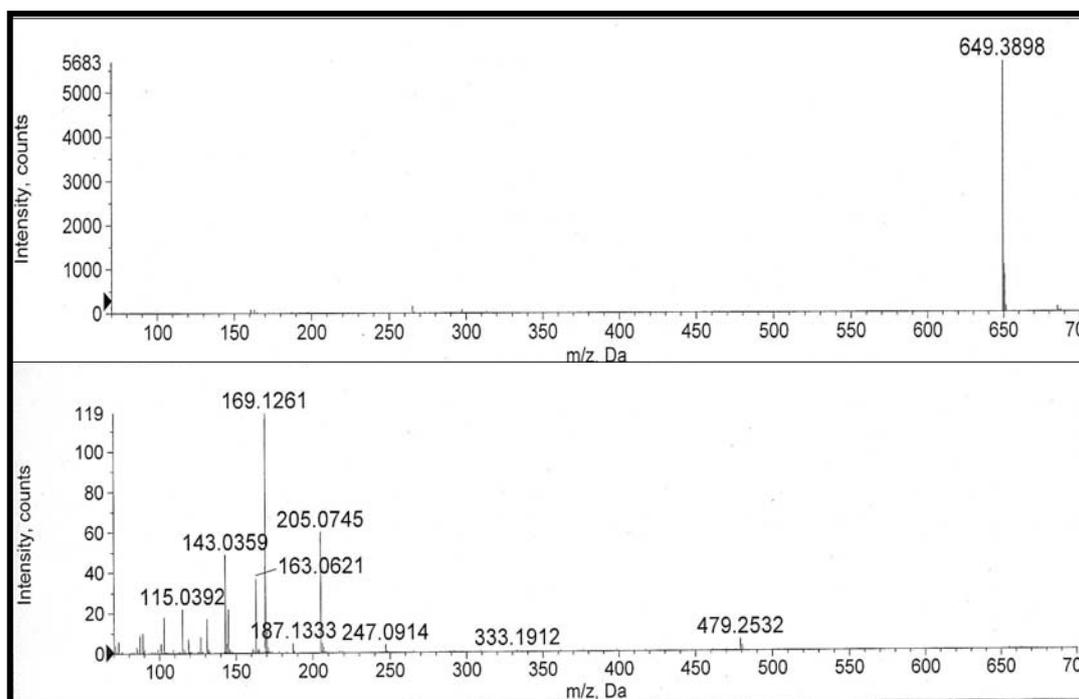


Figura 4.52. Espectre de fragmentacions (TOF) ampliat de l'ió pseudomolecular $[M-H]^-$ del ramnolípid $R_2-C_{10}-C_{10}$ de massa molecular 649 m/z extret del sobrenedant d'un cultiu de 96 hores de *P. aeruginosa* 47T2 utilitzant olis de fregit com a font de carboni.

D'aquesta manera a la Figura 4.53, buscant la m/z de l'ió pseudomolecular 475, la trobem al minut 18,45 del TIC, que tot i no ser dels pics més intensos mostra un bon pic al XIC. Amb la seva fragmentació es corrobora la correspondència a l'ió pseudomolecular del Rhl $R-C_8-C_{10}$ o $R-C_{10}-C_8$, ja que l'espectre de masses TOF mostra fragmentacions típiques per aquesta molècula 169, 141, 119, 103 de massa (m/z) (Abalos *et al.*, 2002). Per tant, per determinar la correspondència de cada pic, cal observar l'espectre de fragmentació d'aquests pics dels quals per la seva massa i el seu temps de retenció es sospita que corresponen a un determinat Rhl. Amb referències anteriors o amb els càlculs de la m/z , es busquen els fragments característics de la molècula i així es pot atorgar amb total seguretat un Rhl a cada pic.

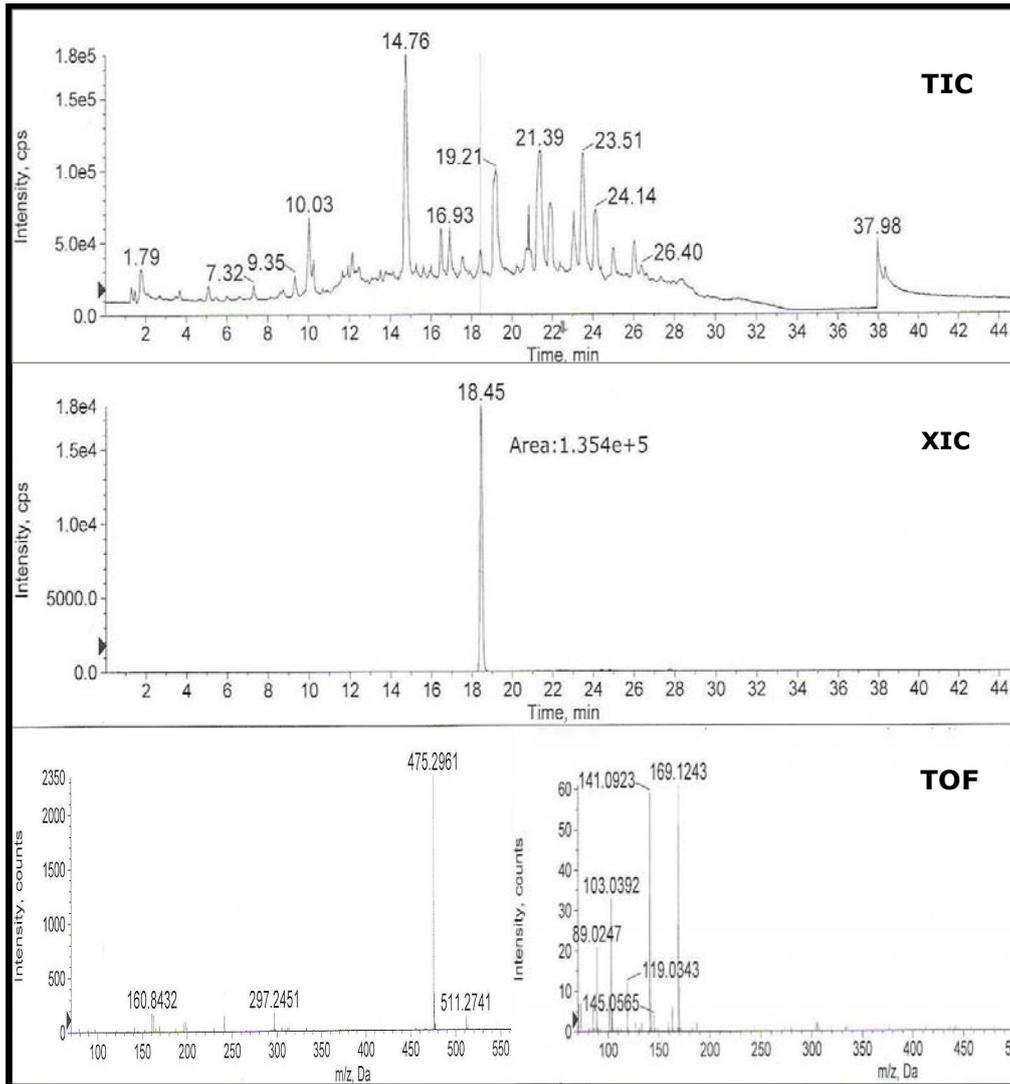


Figura 4.53. TIC, XIC i espectre de fragmentacions (TOF) dels ramnolípid R-C₈-C₁₀ i R-C₁₀-C₈ de massa molecular 475 m/z extrets del sobrenedant d'un cultiu de 96 hores de *P. aeruginosa* 47T2 utilitzant olis de fregit com a font de carboni.

S'han rastrejat els cromatogrames iònics totals (TICs) de la Figura 4.48 i comparant amb la bibliografia (Deziel *et al.*, 1999; Abalos *et al.*, 2002, Haba *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2007) s'han buscat 20 Rhls diferents (Taula 4.11) dels quals només s'han trobat 8, quatre mono-Rhls i quatre di-Rhls.

Sobre la Figura 4.54 es pot veure clarament que es separen al llarg de la columna cromatogràfica de més polar a més apolar, 8 pics classificats d'acord als seus ions pseudomoleculars que defineixen el biotensioactiu obtingut a partir de *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 i 47T2 ΔAD i que es fan més evidents en extreure el XIC a partir d'aquests cromatogrames. Tant el XIC com el TOF de tots els Rhls detectats i identificats es troben a l'Annex (i-viii).

Taula 4.11. Estructures dels 8 mono-Rhls i 12 di-Rhls de *Pseudomonas aeruginosa* rastrejats i alguns dels fragments detectats dels mateixos per HPLC/EM (adaptat de Heyd et al., 2007).

Rhls	Ió pseudomolecular [M-H] ⁻ (m/z)	Fragments (m/z)
R-C ₈ -C ₈	447	305, 283, 141
R-C ₈ -C ₁₀	475	311, 305, 169, 141
R-C ₁₀ -C ₈	475	333, 311, 169, 141
R-C ₁₀ -C ₁₀	503	339, 333, 169
R-C ₁₀ -C _{12:1}	529	365, 333, 195, 169
R-C _{12:1} -C ₁₀	529	365, 359, 195, 169
R-C ₁₀ -C ₁₂	531	367, 333, 197, 169
R-C ₁₂ -C ₁₀	531	367, 361, 197, 169
R ₂ -C ₈ -C ₈	593	451, 283, 141
R ₂ -C ₈ -C ₁₀	621	451, 311, 169, 141
R ₂ -C ₁₀ -C ₈	621	479, 311, 169, 141
R ₂ -C ₈ -C _{12:1}	647	451, 337, 195, 141
R ₂ -C _{12:1} -C ₈	647	505, 337, 195, 141
R ₂ -C ₁₀ -C ₁₀	649	479, 339, 169
R ₂ -C ₁₀ -C _{12:1}	675	479, 365, 195, 169
R ₂ -C _{12:1} -C ₁₀	675	505, 365, 195, 169
R ₂ -C ₁₀ -C ₁₂	677	479, 367, 197, 169
R ₂ -C ₁₂ -C ₁₀	677	507, 367, 197, 169
R ₂ -C ₁₀ -C _{14:1}	703	479, 391, 221, 169
R ₂ -C _{12:1} -C ₁₂	703	505, 393, 197, 195

El resultat del rastreig és l'aparició dels ions pseudomoleculars en el següent ordre: en primer lloc l'ió pseudomolecular de 621 m/z amb un temps de retenció de 16,49 minuts que correspon al di-Rhl R₂-C₈-C₁₀, el segon ió pseudomolecular és el 475 m/z (R-C₈-C₁₀ / R-C₁₀-C₈), amb un temps de retenció de 18,45 minuts, el següent és el 649 m/z (R₂-C₁₀-C₁₀) amb un temps de retenció de 19,18 minuts, el següent és el 675 m/z (R₂-C₁₀-C_{12:1}) amb un temps de retenció de 20,87 minuts, el següent és el 503 m/z (R-C₁₀-C₁₀) amb un temps de retenció de 21,35 minuts, el següent és el 677 m/z (R₂-C₁₀-C₁₂ / R₂-C₁₂-C₁₀) amb un temps de retenció de 21,92 minuts, el següent és el 529 m/z (R-C₁₀-C_{12:1} / R-C_{12:1}-C₁₀) amb un temps de retenció de 23,07 minuts i per últim l'ió pseudomolecular més apolar, el de 531 m/z amb un temps de retenció de 24,13 minuts i que correspon al mono-Rhl R-C₁₀-C₁₂ / R-C₁₂-C₁₀. Això indica que els biotensoactius extrets tant de *P. aeruginosa* 47T2 com del mutant PHA negatiu *P. aeruginosa* 47T2 ΔAD als diferents temps de cultiu són formats per, com a mínim, vuit molècules de ramnolípid diferents que s'enregistren a l'espectre de masses entre el minut 16,4 i el 24,2 (Figura 4.54, Taules 4.12 i 4.13) dels gradients de fase mòbil (AcN/H₂O) de l'HPLC.

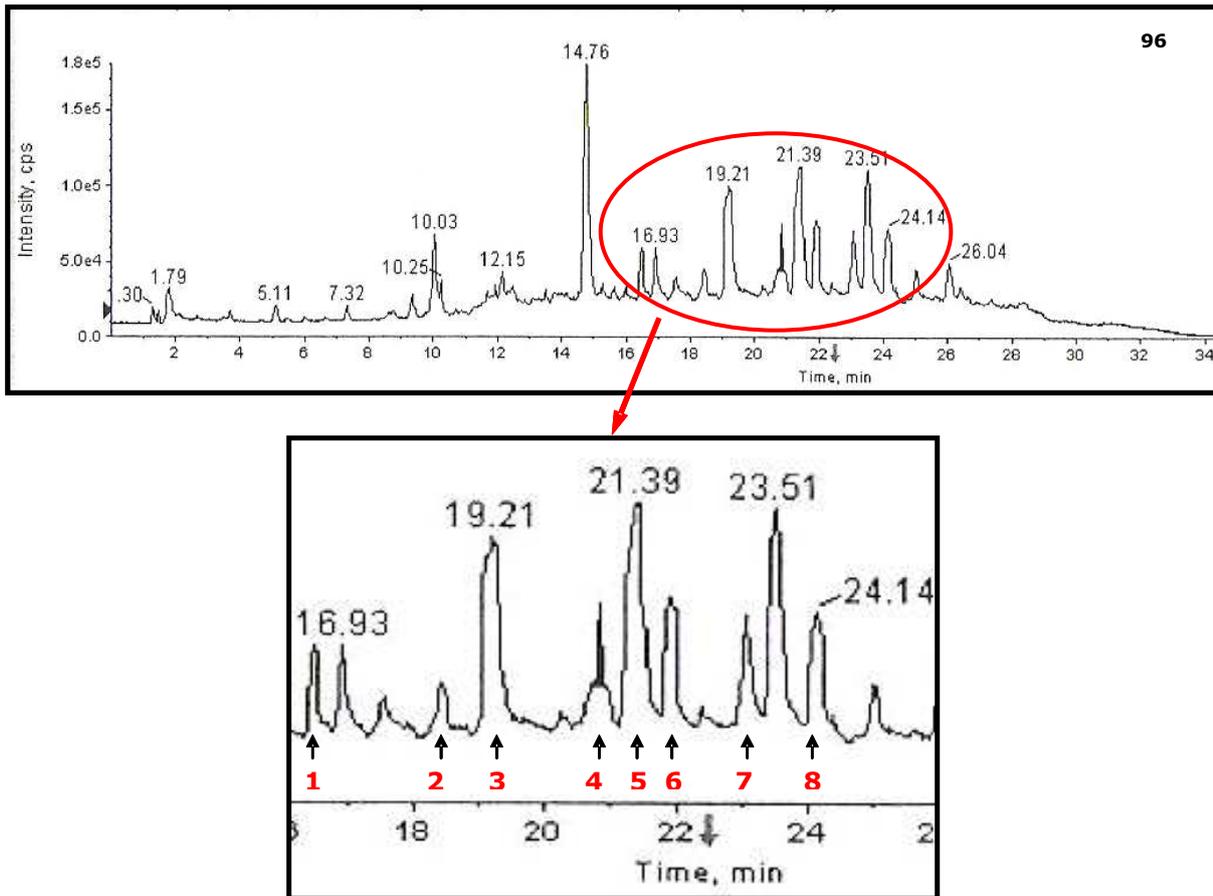


Figura 4.54. Ampliació del TIC del minut 16 al 26 corresponent a 96 hores de cultiu fet amb olis de fregit com a font de carboni amb la soca *P. aeruginosa* 47T2. En vermell estan numerats els ions pseudomoleculars corresponents als Rhls que defineixen el biotensioactiu: 1) a 16,49 min $R_2-C_8-C_{10}$, 2) a 18,45 min $R-C_8-C_{10}$ / $R-C_{10}-C_8$, 3) a 19,18 min $R_2-C_{10}-C_{10}$, 4) a 20,87 min $R_2-C_{10}-C_{12:1}$, 5) a 21,35 min $R-C_{10}-C_{10}$, 6) a 21,92 min $R_2-C_{10}-C_{12}$ / $R_2-C_{12}-C_{10}$, 7) a 23,07 min $R-C_{10}-C_{12:1}$ / $R-C_{12:1}-C_{10}$ i 8) a 24,13 min $R-C_{10}-C_{12}$ / $R-C_{12}-C_{10}$.

Les àrees obtingudes en els TICs (Figura 4.54) són diferents a les obtingudes en els espectres dels ions pseudomoleculars (XICs, Figura 4.55) degut a que no es treballa amb molècules pures i amb el mètode d'extracció dels ramnolípid s'arrosseguen altres substàncies, ja siguin àcids grassos, sals o altres elements presents en els olis de fregit. Això dóna idea de la sensibilitat de la tècnica de cromatografia líquida d'alta resolució. Tot i així, els TICs mostren pics bastant definits, amb el que podem dir que la mostra no està molt carregada d'altres substàncies que no siguin ramnolípid.

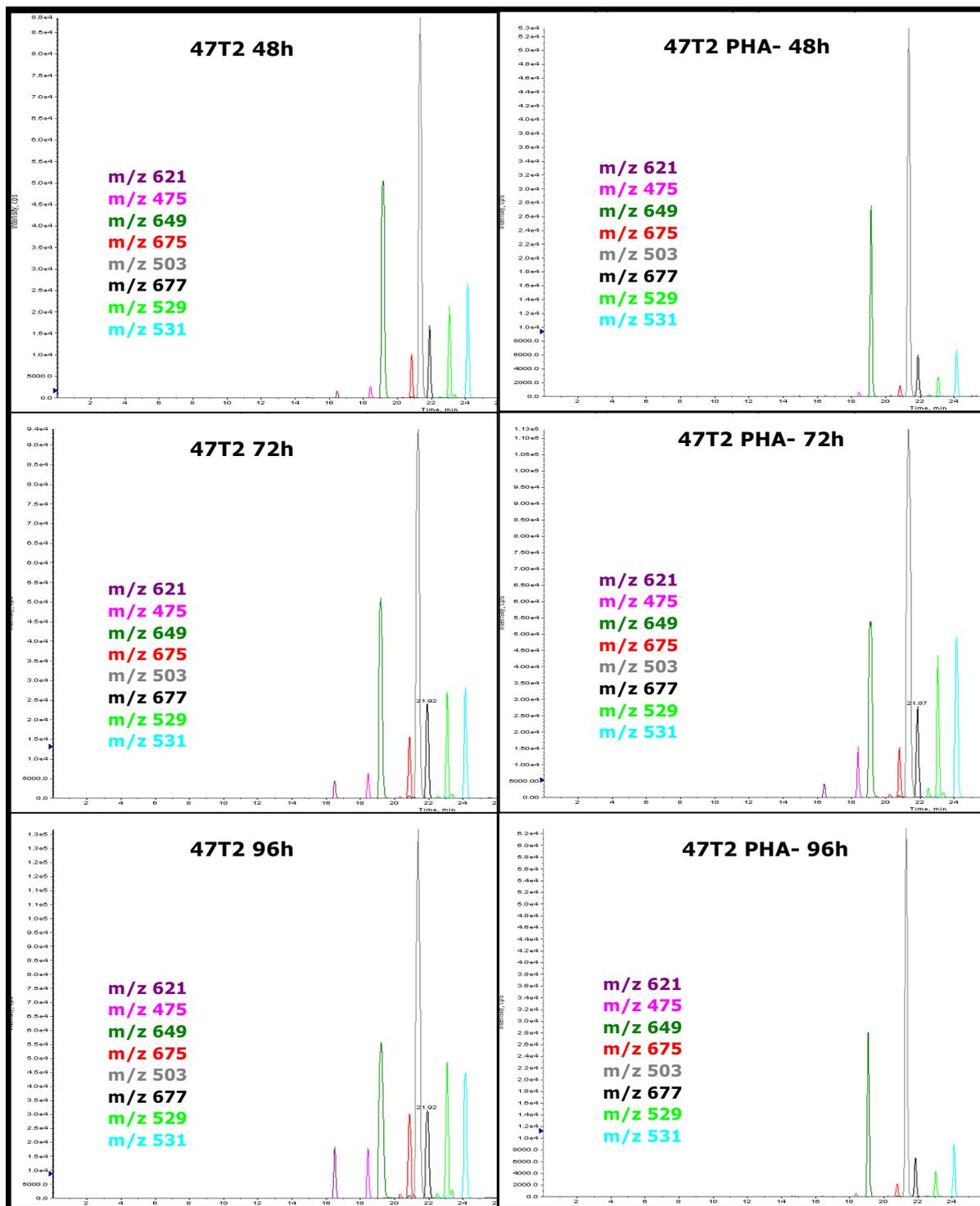


Figura 4.55. XICs solapats dels diferents valors de m/z per tots els Rhls identificats al sobredant de *P. aeruginosa* 47T2 a l'esquerra i per la mutant PHA negatiu a la dreta que determinen les abundàncies i distribució dels ions pseudomoleculars (ipm) de les mostres.

Per comprovar si la producció dels diferents ramnolípids de la barreja biotensioactiva és constant o hi ha diferències significatives entre els temps de

cultiu i/o entre el mutant i la soca parental es fa l'anàlisi dels ions pseudomoleculars. Es solapen els espectres XIC dels diferents ions pseudomoleculars cadascun d'un color (Figura 4.56), i es calculen les proporcions relatives dels Rhls al llarg del temps de cultiu de les dues soques.

Degut a la similitud estructural entre ells, els temps de retenció dels diferents Rhl homòlegs són molt pròxims. Alguns dels isòmers de determinats Rhls no es poden diferenciar cromatogràficament perquè tots dos tenen el mateix pes molecular (475 m/z (R-C₈-C₁₀ / R-C₁₀-C₈), 677 m/z (R₂-C₁₀-C₁₂ / R₂-C₁₂-C₁₀) 529 m/z (R-C₁₀-C₁₂:1 / R-C₁₂:1-C₁₀)) (Haba *et al.*, 2003).

A partir de les àrees dels pics dels ions pseudomoleculars extrets (XICs) es calculen les abundàncies relatives i s'elaboren gràfics i taules de valors. Les taules 4.12 i 4.13 resumeixen amb detall les abundàncies relatives, expressades en %, de cada compost en els quatre temps de mostreig, l'ió pseudomolecular [M-H]⁻ de cada ramnolípide i les fragmentacions típiques de cada ió que s'observen a l'HPLC/EM.

La suma total de Rhls produïts a les 96 hores de cultiu a partir d'olis de fregit residuals (gira-sol:oliva; 1:1) per *P. aeruginosa* 47T2 és de 6 g/L, mentre que per *P. aeruginosa* 47T2 ΔAD és de 4,97 g/L. En la barreja de biotensioactiu es detecten quatre di-Rhls (39,56% en Rhls de 47T2, 33,49% en Rhls de 47T2 ΔAD): R₂-C₁₀-C₁₀, R₂-C₁₀-C_{12:1}, R₂-C₁₀-C₁₂, R₂-C₈-C₁₀; i quatre mono-Rhls (60,44% en Rhls de 47T2, 66,51% en Rhls de 47T2 ΔAD): R-C₁₀-C₁₀, R-C₁₀-C_{12:1}, R-C₁₀-C₁₂, R-C₈-C₁₀. Individualment, els components majoritaris, tant en els Rhls extrets de sobrenedants de *P. aeruginosa* 47T2 com en els extrets de sobrenedants del mutant, són el di-Rhl R₂-C₁₀-C₁₀ detectat a m/z 649 (19,68% en Rhls de 47T2, 24,04% en Rhls de 47T2 ΔAD) i el mono-Rhl R-C₁₀-C₁₀ amb m/z 503 (39,14% en Rhls de 47T2 57,65% en Rhls de 47T2 ΔAD). Aquestes molècules es corresponen amb els Rhls clàssics RL₁ i RL₂, respectivament, descrits prèviament per Itoh en 1971 en cultivar diferents soques de *P. aeruginosa* amb n-alcans. La barreja d'aquestes dues molècules contenia un 51.3% del Rhl RL₁ (Itoh *et al.*, 1971). Les molècules RL₁ (R₂-C₁₀-C₁₀) i RL₂ (R-C₁₀-C₁₀), per tant, són considerades els Rhls fonamentals sintetitzats per *P. aeruginosa* (Syldalk *et al.*, 1985; Lang *et al.*, 1999, Abalos *et al.*, 2002). El Rhl minoritari detectat en els biotensioactius va ser el di-Rhl R₂-C₈-C₁₀ (2,91%) en Rhls de 47T2 i el mono-Rhl R-C₈-C₁₀ (0,06%) en Rhls de 47T2 ΔAD. El Rhl R-C₁₀-C₁₂ va ser l'homòleg minoritari (2,8%) detectat al biotensioactiu M_{AT10} (Abalos *et al.*, 2002).

Taula 4.12. Taula que mostra les abundàncies relatives dels diferents ramnolípid en % calculats a partir de les àrees dels pics dels [M-H]⁻, els fragments iònics trobats per cada Rhl i el temps de retenció per la soca parental *P. aeruginosa* 47T2. En **negreta** és fa ressaltar el ramnolípid més abundant.

47T2

Estructura del ramnolípid	Íon pseudo-molecular (m/z)	Abundància relativa (%)				Fragments iònics (m/z)	Temps de retenció (min)
		24h	48h	72h	96h		
R-C₁₀-C₁₀	503	56,52	39,66	39,15	39,14	333,169, 119, 103	21,35
R₂-C₁₀-C₁₀	649	43,48	34,62	25,87	19,68	479, 169,163	19,18
R₂-C₁₀-C₁₂	677	0,00	9,00	9,52	10,73	507, 479, 197, 169, 163	21,92
R₂-C₁₂-C₁₀	531	0,00	5,74	8,86	8,41	361, 333,169, 163, 119, 103	24,13
R-C₁₀-C₁₂	529	0,00	6,86	8,60	9,88	333, 197, 169, 163, 119, 103	23,07
R-C₁₂:1-C₁₀	675	0,00	2,89	4,84	6,25	479, 195, 169, 103	20,87
R₂-C₁₀-C₁₂:1	621	0,00	0,77	1,83	2,91	451, 169, 141	16,49
R-C₁₀-C₈	475	0,00	0,46	1,33	3,01	305, 169, 163, 141, 119,103	18,45
R-C₈-C₁₀							

Taula 4.13. Taula que mostra les abundàncies relatives dels diferents ramnolípid en % calculats a partir de les àrees dels pics dels [M-H]⁻, els fragments iònics trobats per cada Rhl i el temps de retenció pel mutant *P. aeruginosa* 47T2 ΔAD, en **negreta** és fa ressaltar el ramnolípid més abundant.

47T2 PHA-

Estructura del ramnolípid	Íon pseudo-molecular (m/z)	Abundància relativa (%)				Fragments iònics (m/z)	Temps de retenció (min)
		24h	48h	72h	96h		
R-C₁₀-C₁₀	503	67,48	55,98	47,53	57,65	333,169, 119, 103	21,35
R₂-C₁₀-C₁₀	649	26,16	27,04	21,56	24,04	479, 169,163	19,18
R₂-C₁₀-C₁₂	677	6,36	6,24	8,93	7,29	507, 479, 197, 169, 163	21,92
R₂-C₁₂-C₁₀	531	0,00	5,76	7,51	5,37	361, 333,169, 163, 119, 103	24,13
R-C₁₀-C₁₂	529	0,00	2,75	5,98	3,43	333, 197, 169, 163, 119, 103	23,07
R-C₁₂:1-C₁₀	675	0,00	1,48	4,45	1,72	479, 195, 169, 103	20,87
R₂-C₁₀-C₁₂:1	621	0,00	0,61	3,17	0,44	451, 169, 141	16,49
R-C₁₀-C₈	475	0,00	0,13	0,88	0,06	305, 169, 163, 141, 119,103	18,45
R-C₈-C₁₀							

Les propietats fisicoquímiques i, per tant, les possibles aplicacions de cada barreja (o producte) depenen dels tipus de monòmer i de les proporcions de cada un d'ells. Aquesta és una de les raons per estudiar les abundàncies relatives dels

Rhls (Haba *et al.*, 2003). A partir d'aquests percentatges, i tenint en compte els grams de Rhls que es produeixen, es poden calcular els grams produïts de cada Rhl al llarg del temps de cultiu.

La Figura 4.57 mostra l'evolució de l'abundància relativa de cada ramnolípid descrit en g/L al llarg de les 96 hores de cultiu de *P.aeruginosa* 47T2 i del mutant negatiu per la producció de PHAs. Aquest paràmetre es calcula a partir de les abundàncies relatives de cada Rhl i els mg de Rhls totals per mL de cultiu mesurats per cada temps. Cada color correspon a l'ió pseudomolecular d'un ramnolípid determinat (pes molecular a la llegenda de la gràfica m/z).

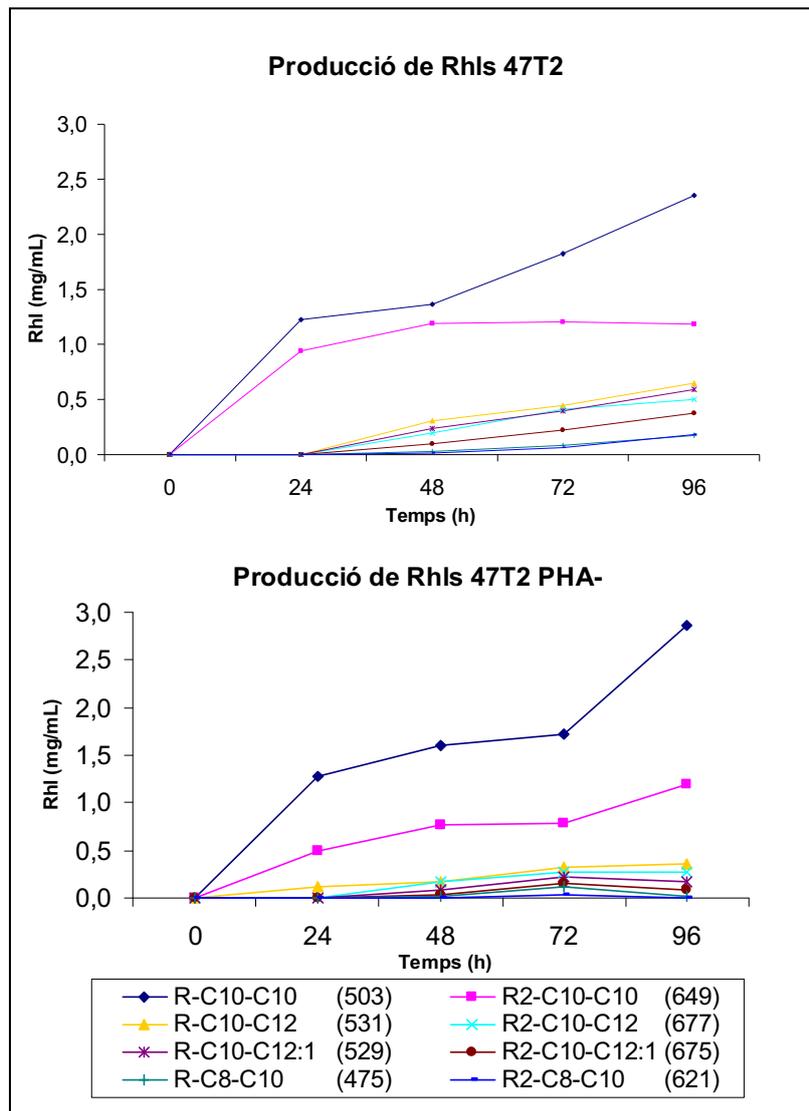


Figura 4.57.- Evolució de l'abundància relativa de cada tipus de ramnolípid al llarg de 96 hores de cultiu en *P. aeruginosa* 47T2 i al mutant PHA negatiu *P. aeruginosa* 47T2 Δ AD.

Com ja s'observa a partir dels percentatges (Taules 4.11 i 4.12), en els gràfics de la Figura 4.57, es veu que el parell d'homòlegs més abundant des de les 24 hores i al llarg de les 96 hores de cultiu en totes dues soques és el format pels Rhls clàssics $R_2C_{10}C_{10}/R_1C_{10}C_{10}$ que representen a les 96 hores de cultiu el 58,82% del total de Rhls de la soca 47T2 i fins el 81,69% en la soca 47T2 Δ AD, una diferència considerable que pot fer variar les propietats fisicoquímiques dels dos biotensioactius. La producció d'aquest parell de Rhls s'ha descrit a la bibliografia i és similar per la mateixa soca *P. aeruginosa* 47T2 i per la soca AT10 cultivada amb olis de fregit de soja (52,74% i 57,1% respectivament, Haba *et al.*, 2003) i per altres soques de *P. aeruginosa*, on també són els Rhls més abundants, com és el cas de *P. aeruginosa* UG2 cultivat amb oli de blat de moro (Mata-Sandoval *et al.*, 2001), *P. aeruginosa* 57RP cultivat amb manitol (Déziel *et al.*, 1999), o *P. aeruginosa* AT10 cultivat amb oli de soja (Haba *et al.*, 2003).

La resta d'homòlegs no es detecten a les 24 hores en la soca parental, ni en el mutant, tret del Rhl $R-C_{10}-C_{12}$ que apareix com un 6,36% del total. Tanmateix, és a les 48 hores quan apareixen la resta de Rhls. Pel que fa al parell d'homòlegs $R_2-C_{10}-C_{12}/R-C_{10}-C_{12}$ representen un 19,14% en la soca parental mentre que en el mutant constitueixen un 12,66% de la barreja final a les 96 hores. Al final del procés un 16,13% en la soca parental i tan sols un 5,15% de la suma total en el mutant, és representat pel parell d'homòlegs $R_2-C_{10}-C_{12:1}/R-C_{10}-C_{12:1}$. Finalment, $R_2-C_8-C_{10}/R-C_8-C_{10}$ és el parell minoritari al llarg de tot el cultiu, amb un 5,92% en la soca parental *P. aeruginosa* 47T2 a les 96 hores i és quasi insignificant (0,5%) en el cas del mutant negatiu per la producció de PHAs *P. aeruginosa* 47T2 Δ AD.

Els resultats obtinguts anteriorment amb diferents soques de *Pseudomonas aeruginosa* UG2, (Mata-Sandoval *et al.*, 2001), *P. aeruginosa* 57RP (Déziel *et al.*, 1999), *P. aeruginosa* AT10 (Abalos *et al.*, 2001) i *P. aeruginosa* 47T2 (Haba *et al.*, 2003) cultivades amb diferents fonts de carboni, són similars però no exactament iguals.

En funció de la soca i la font de carboni emprada pel seu cultiu, s'obtenen majors o menors quantitats de Rhls (Nitschke *et al.*, 2005) i en diferents proporcions, és això el que fa que cada biotensioactiu tingui no només una composició diferent, sinó que les seves característiques fisicoquímiques també variïn (Monteiro *et al.*, 2007). Va ser Rosen (1974) qui va establir la estreta relació que hi ha entre l'estructura química d'un tensioactiu i les seves propietats pel que fa a la seva activitat sobre la tensió superficial i interfacial. Les barreges de Rhls considerades com a un únic producte biotensioactiu extreïdes de *P. aeruginosa* 47T2 i 47T2 Δ AD, són diferents entre elles pel que fa a les proporcions de les diferents espècies químiques de Rhls que les formen. S'ha vist que són lleugerament

diferents a d'altres descrites a la bibliografia, per tant, caldria esperar que tinguessin propietats diferents entre elles i diferents a la resta de les descrites donada la seva composició molecular. Per comprovar-ho es realitza un estudi de les característiques fisicoquímiques dels dos biotensiactius.

4.4. Caracterització fisicoquímica dels Rhls

Tot i que avui dia la majoria dels tensioactius encara provenen de fonts no renovables, en els darrers anys s'estan introduint amb força en el mercat els biotensioactius produïts per microorganismes. El terme biotensioactiu es refereix a qualsevol compost que s'utilitza per la seva activitat sobre la tensió superficial i que ha estat aïllat a partir de microorganismes (Kralova *et al.*, 2008). El desenvolupament de tensioactius basats en fonts renovables està augmentant gràcies a que poden ser emprats i s'empren en diferents sectors per la seva biodegradabilitat, per no ser tòxics i per les seves propietats especials respecte a altres tensioactius (Deleu, 2004). La surfactina del *Bacillus subtilis*, l'emulsan d'*Acinetobacter calcoaceticus* i els soforolípidis de *Candida bombicola* són alguns exemples de tensioactius derivats de microorganismes (Kralova *et al.*, 2008).

Els Rhls són també un clar exemple de biotensioactius produïts per microorganismes. A més a més, en el present treball s'obtenen a partir d'olis vegetals residuals, una font de carboni renovable i reciclada que els hi dóna valor afegit. La seva caracterització fisicoquímica es porta a terme considerant la barreja de Rhls produïts per *P. aeruginosa* 47T2 com a un únic compost biotensioactiu per dues raons fonamentals: per una banda, la separació dels Rhls components de la barreja suposa un cost addicional i, a més a més, no tindria sentit ja que alguns dels Rhls es produeixen en molt baixa quantitat i són d'una elevada similitud estructural (Abalos *et al.*, 2001, Nitschke *et al.*, 2005). Per altra banda, s'ha descrit a la literatura que les propietats com a barreja són prou adients i no disten massa de les propietats dels Rhls de manera individual (Abalos *et al.*, 2001, Haba *et al.*, 2002). Així, a nivell d'aplicabilitat resulta més econòmic fer servir la barreja i no cada component per separat.

4.4.1. Solubilitat dels Rhls

El biotensioactiu format per la barreja de Rhls, tant l'extret a partir de *P. aeruginosa* 47T2 com l'extret a partir del mutant PHA negatiu *P. aeruginosa* 47T2 Δ AD, és un producte d'aspecte semisòlid, de color groguenc i olor característic, com d'oli ranci. Dels dissolvents assajats (Apartat 3.10.5 de Materials i Mètodes), en diluir 100 mg de Rhl en 1 mL de dissolvent, el biotensioactiu resulta ser soluble en hidròxid sòdic (NaOH), hidrogencarbonat sòdic (NaHCO₃) i acetat d'etil (CH₃COOCH₂CH₃). També és soluble en metanol (CH₃OH), èter etílic (CH₃CH₂OCH₂CH₃) i cloroform (CHCl₃), resultats similars als obtinguts per Lang i col·laboradors en Rhls provinents de diferents espècies de *Pseudomonas* (Lang *et*

al., 1999). En aigua, el biotensioactiu d'estudi només és parcialment soluble mentre que és totalment insoluble en hexà (C₆H₁₄).

Aquestes dades són d'especial interès per conèixer com es comporta el tensioactiu amb els diferents dissolvents a l'hora de treballar amb ells o sotmetre'ls a diferents proves analítiques i/o preparatives.

4.4.2. Determinació de la concentració micel·lar crítica (CMC)

La formació de micel·les a partir de molècules individuals de tensioactiu dissolt, que es dona a partir d'una determinada concentració d'aquest, es denomina concentració micel·lar crítica (CMC). Per determinar la CMC del biotensioactiu produït per *P. aeruginosa* 47T2 i pel mutant negatiu *P. aeruginosa* 47T2 ΔAD a 96 hores de cultiu (Apartat 3.20.2 de Materials i Mètodes) cal observar i mesurar la variació de la TS en funció de la concentració de biotensioactiu en aigua Milli-Q i es calcula així la CMC. Finalment, es realitzen dues rectes de regressió que s'obtenen d'un banc de dilucions (mg Rhls/mL H₂O) que va de 10 mg/mL a 100 mg/mL i d'un altre banc de dilucions que va de 150 mg/mL a 1250 mg/mL. La zona de tall d'aquestes dues rectes de regressió indica la CMC (Figura 4.58).

La variació de la tensió superficial (TS) és deguda a que a concentracions molt baixes, les molècules de tensioactiu en dissolució difonen cap a la interfase on s'adsorbeixen, promovent una disminució de la energia lliure interfacial i, per tant, de la TS. A mida que la concentració del biotensioactiu en la dissolució augmenta, la TS continua disminuint. Però quan la interfase es satura a una determinada concentració de tensioactiu, la TS roman constant encara que es produeixin augments posteriors d'aquesta quantitat de tensioactiu. És a partir d'aquesta concentració que les molècules que no tenen cabuda a la interfase comencen a formar agregats entre elles formant micel·les, i la concentració a la qual comencen a formar-se es coneix com a concentració micel·lar crítica (CMC) (Rivas *et al.*, 1999).

En el cas dels biotensioactius provinents de cultius de 96 hores, la CMC pels Rhls de la soca *P. aeruginosa* 47T2 és de 105,04 mg/L, baixant la tensió superficial fins a 32,21 mN/m, mentre que pels Rhls del mutant *P. aeruginosa* 47T2 ΔAD és lleugerament inferior, 104,87 mg/L, baixant la tensió superficial de l'aigua Milli-Q (72 mN/m) fins a 31,67 mN/m (Figura 4.58).

Aquests valors són molt semblants als obtinguts per Haba, i col·laboradors pel biotensioactiu de *P. aeruginosa* 47T2 ($TS_{Rhls47T2}=32,8$ mN/m i $CMC_{Rhls47T2}=108$ mg/L; Haba *et al.*, 2002) i difereixen una mica dels donats per Abalos i col·laboradors pels Rhls de *P. aeruginosa* AT10 ($TS_{RhlsAT10}=26,8$ mN/m i

$CMC_{RhIsAT10}=120$ mg/L; Abalos *et al.*, 2001) que sembla que necessita una concentració més elevada de tensioactiu per saturar la interfase però en canvi s'aconsegueix una major reducció de la TS.

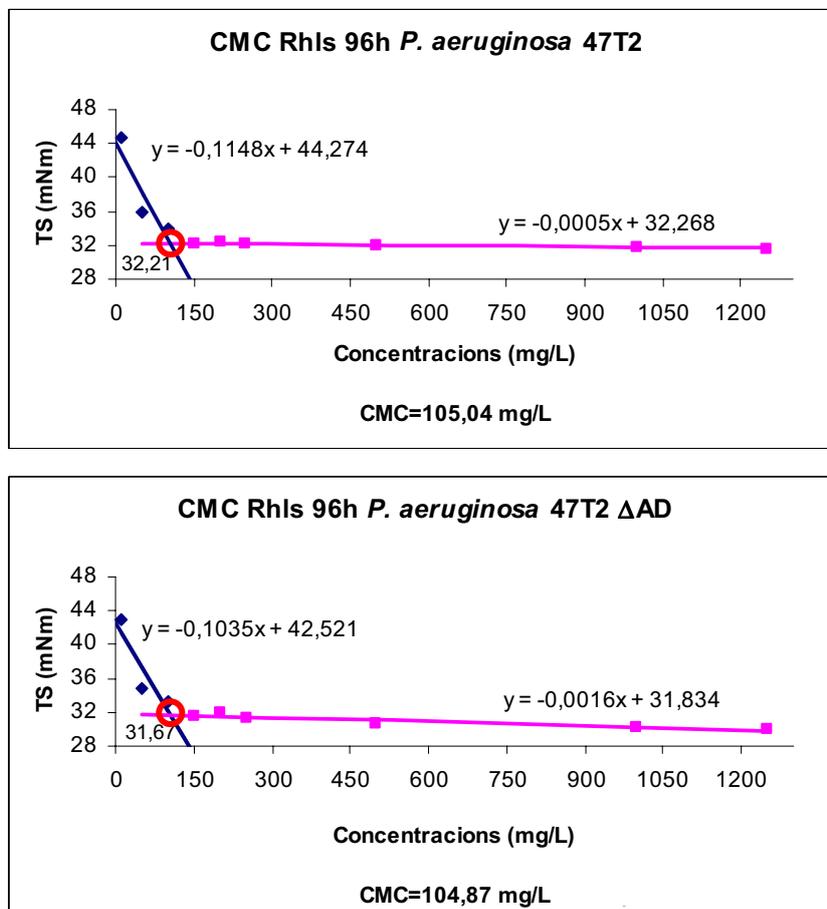


Figura 4.58.- Variació de la tensió superficial (TS (mN/m)) amb la concentració de RhIs per tal de determinar la CMC de les barreges de RhIs extrets de cultius de 96 hores de *P. aeruginosa* 47T2 (a dalt) i del mutant PHA negatiu *P. aeruginosa* 47T2 ΔAD (a baix).

Es tracta de valors inferiors als descrits per tensioactius químics aniònics típics com ara el laurilsulfat de sodi ($C_{12}H_{25}SO_4Na$; 296 mg/L) o el palmitosulfat de sodi ($C_{16}H_{33}SO_3Na$; 199 mg/L) (Rosen, 2004). També són valors inferiors als obtinguts en la determinació de les CMCs d'alguns RhIs com el metilèster del Rhl B (Me-RB derivat acilat del $R_2C_{10}C_{10}$; 400 mg/L) (Ishigami *et al.*, 1993), la barreja de RhIs homòlegs ($RC_{10}C_{10}$, $RC_{10}C_{12}$, $R_2C_{10}C_{12}$, $RC_{12:1}$ i $RC_{8:2}$; 230 mg/L) (Abalos *et al.*, 2001) o alguns RhIs individuals provinents d'espècies de *Pseudomonas* (RC_{10} i R_2C_{10} ; 200mg/L) (Lang *et al.*, 1999). Tanmateix es tracta de valors de CMC més alts que els descrits per altres RhIs individuals ($RC_{10}C_{10}$; 20 mg/L (Syldalk *et al.*, 1985) i $R_2C_{10}C_{10}$; 40 mg/L (Sim *et al.*, 1997)) o per barreges de fins a dos

homòlegs ($R_2C_{10}C_{12}$ i $R_2C_{10}C_{10}$; 37 mg/L (Mata-Sandoval *et al.*, 1999) i $RC_{10}C_{10}$, $R_2C_{10}C_{10}$; 20 mg/L (Noordman *et al.*, 1998)).

El valor de la CMC depèn de la composició de la barreja del tensioactiu ja que en el procés de micel·lació intervenen totes les molècules presents. La CMC augmenta amb el caràcter hidrofílic del grup polar i els dobles enllaços en el grup hidrofòbic, que afecten tant a la conformació de les micel·les com a l'empaquetament tancat del grup hidrofòbic en alterar el seu número d'agregació (Rosen, 2004; Noordman *et al.*, 2000). Per tant, aquest augment de la CMC de la barreja de Rhls estudiats respecte als Rhls individuals o les parelles d'homòlegs descrits en la bibliografia es deu al caràcter fortament hidrofílic de totes les molècules, determinat per l'anell o anells de ramnosa i el grup carboxil dels Rhls, així com per les insaturacions de les cadenes hidrofòbiques de les molècules $RC_{10}C_{12:1}$, $R_2C_{10}C_{12:1}$, $RC_{12:1}C_{10}$ i $R_2C_{12:1}C_{10}$. Les insaturacions afecten a la configuració que adopten les molècules en les micel·les, influint en el número d'agregació molecular i, per tant, en el valor de la CMC. S'ha descrit fins i tot que la simple esterificació del grup carboxil en la molècula de Rhl incrementa dues vegades el valor de la CMC respecte a la molècula no esterificada (Ishigami *et al.*, 1993).

No es tracta d'una diferència molt significativa la que es dona entre les CMCs dels dos biotensioactius objecte d'estudi (Rhls purificats del sobrenedant de *P. aeruginosa* 42A2 i del mutant 42A2 Δ AD), sobretot tenint en compte que la CMC en realitat no és un valor exacte sinó una zona de transició, un rang de concentració que pot variar, sobretot si el tensioactiu es tracta d'una barreja com és el cas dels ramnolípid bacterians, tot i que no deixen de ser molècules homòlogues.

L'acció dels tensioactius normalment es valora per la seva eficiència i la seva efectivitat. Ambdós paràmetres no són paral·lels, és a dir, el tensioactiu més eficient no necessàriament és el més eficaç i és també per aquesta raó que acostumen a fer-se servir barreges de tensioactius en lloc de tensioactius purs.

L'eficiència està determinada per la concentració de tensioactiu capaç de reduir significativament la TS de l'aigua mentre que l'efectivitat ve donada pel valor mínim de tensió superficial assolit, que és la TS en la CMC (γ_{CMC}), i pel número de molècules en excés superficial (Rosen, 2004). És a dir que com més aconseguim baixar la TS de l'aigua un tensioactiu més efectiu és i com menys tensioactiu necessitem per reduir la TS de l'aigua considerablement, uns 20mN/m (Rosen, 2004), més eficient és el tensioactiu.

Pel que fa al valor mínim de TS obtingut (γ_{CMC}), tots dos biotensioactius són capaços de reduir la tensió superficial de l'aigua Milli-Q (72 mN/m) més d'un 55% (fins a 32,21 mN/m els Rhls de *P. aeruginosa* 47T2 i fins a 31,67 mN/m els de *P.*

aeruginosa 47T2 Δ AD). Aquests valors són similars als de les TS mínimes descrites per tensioactius químics aniònics típics: 33 mN/m pel laurilsulfat de sodi i 32 mN/m pel palmitoilsulfat de sodi (Rosen, 1989). Els alquilbenzenosulfonats són els únics tensioactius químics que mostren tensions superficials més baixes (24-26 mN/m), semblants a la dels Rhls de *P. aeruginosa* AT10 (Abalos *et al.*, 2001). El gran desavantatge de tots aquests tensioactius químics en front als biotensioactius és que ambientalment són més contaminants i tòxics (Banat, 1995). Dels tensioactius microbians, els lipopèptids són els biotensioactius més efectius coneguts actualment, ja que són capaços de disminuir la TS des de 72 mN/m fins a valors de 27 mN/m, destacant la subtilisina o surfactina de *Bacillus subtilis* i les liquenines A i B de *Bacillus licheniformis* (Yakimov *et al.*, 1995; Desai *et al.*, 1997).

4.4.3. Propietats emulsionants dels Rhls. Determinació del balanç hidrofílic-lipofílic (HLB)

La propietat més valorada a nivell industrial per l'aplicació de tensioactius és la formació d'emulsions a partir de dues fases líquides no miscibles entre elles, donat que molts productes d'ús quotidià són utilitzats en forma d'emulsió com ara les pintures, els gelats, alguns cosmètics i moltes formulacions farmacèutiques (Mulligan, 2005).

Els tensioactius són els agents emulsionants més comuns i el seu poder d'emulsificació, així com el tipus d'emulsió formada, depèn de la seva estructura química, de la seva concentració i de la composició de les fases de l'emulsió (Nitschke *et al.*, 2005, Abalos *et al.*, 2001). L'agent emulsionant catalitza dos processos independents: primer indueix la formació de les gotes de la fase dispersa i un cop formades, les estabilitza. Per això és necessari que l'agent emulsionant tingui una activitat superficial que permeti distorsionar l'estructura de les fases contínua i dispersa com és el cas dels Rhls (Mulligan, 2005). L'afinitat relativa d'un tensioactiu per les fases contínua i dispersa és el que es coneix amb el nom de balanç hidrofílic-lipofílic (HLB; Hydrophilic-Lipophilic Balance).

Una emulsió, per a dues fases líquides, es defineix com la dispersió d'una de les fases (fase dispersa) dins l'altra (fase contínua) per l'acció d'un agent emulsionant que estabilitza termodinàmicament el sistema. La fase dispersa està constituïda per gotes microscòpiques, i la mida d'aquestes partícules permet classificar les emulsions. Segons la mida de partícula poden ser microemulsions (<100 nm de diàmetre) i nanoemulsions (20-500 nm), que són semi o transparents a la llum visible i normalment estables termodinàmicament (Solans, *et al.*, 2001; Junyapraserta *et al.*, 2007), o macroemulsions (1-100 μ m de diàmetre), opaques a

la llum i termodinàmicament inestables (Baglioni, *et al.*, 2000). En funció de la naturalesa de la fase dispersa poden ser emulsions d'oli en aigua (O/A) o d'aigua en oli (A/O). En les emulsions O/A l'oli és la fase dispersa i l'aigua és la fase contínua, mentre que invertint les fases es pot obtenir una emulsió A/O.

El número del balanç hidròfil-lipòfil (HLB) s'utilitza com a mesura de la proporció del grup hidròfil i el lipòfil de la molècula o molècules d'un tensioactiu i dóna idea de la capacitat emulsificadora del tensioactiu. És un valor entre 1 i 60 que defineix l'afinitat del tensioactiu per l'aigua o per l'oli. Quan l'HLB és troba entre 8-16 tenen afinitat per aigua (hidrofílics), mentre que si el valor es troba entre 3-6 tenen afinitat per l'oli (lipofílics). Als surfactants iònics se'ls ha assignat recentment valors d'HLB relatius, permetent que el rang s'estengui fins a 60 (Kralova *et al.*, 2009).

Recordant que en determinats casos és millor fer servir una barreja de tensioactius més que un per sí sol, i tenint en compte que el biotensioactiu d'estudi és format per una barreja de Rhls, és necessari adaptar l'expressió de Griffin per calcular l'HLB i veure la correlació general que es troba entre aquest paràmetre i l'ús del biotensioactiu (Rosen, 2004). Una equació general per determinar l'HLB d'una barreja de dos tensioactius (A i B) és:

$$HLB_{\text{Barreja}} = (\% \text{Tensioactiu A} \times HLB_{\text{TS A}}) + (\% \text{Tensioactiu B} \times HLB_{\text{TS B}})$$

I l'HLB segons Griffin es defineix amb l'expressió:

$$HLB = \frac{A}{A + O} \times 20$$

(A: massa molecular fracció hidròfila; O: massa molecular fracció lipòfila.)

Per tant, per calcular l'HLB de les barreges de Rhls, tant pel biotensioactiu obtingut a partir de *P. aeruginosa* 47T2 com per l'obtingut del mutant PHA negatiu, s'apliquen aquestes equacions utilitzant els percentatges de les acumulacions relatives de cada espècie de Rhl obtingudes per HPLC-MS. Així, l'HLB de la barreja de Rhls que conté el sobrenedant de 96 hores de cultiu líquid de *P. aeruginosa* 47T2 en medi mínim mineral, és de 8,13. Segons la correlació existent entre l'HLB requerit i el possible ús pels diferents tipus d'emulsions (Taula 1.3, Apartat 1.3.4 de la Introducció), el Rhl produït per *P. aeruginosa* 47T2 entra dins dels tensioactius considerats humidificants així com també dels adequats per estabilitzar emulsions O/A ja que el seu comportament en aigua és el d'una dispersió lletosa obtinguda després d'una agitació vigorosa (Figura 4.59). Pels Rhls del mutant PHA negatiu cultivat en iguals condicions, l'HLB calculat és de 7,2 i, per tant, entraria igualment

dins dels tensioactius humidificants, comportant-se també en aigua com una dispersió lletosa, sempre després d'una agitació vigorosa (Figura 4.59). La barreja de Rhls obtinguda per *P. aeruginosa* AT10 és de 10,07 (Abalos, 2001) i també establetza per tant emulsions O/A. Aquestes classificacions coincideixen amb les establertes per Lang i col·laboradors en 1993 en observar que els glicolípid tenen un valor d'HLB proper a 10 (Lang *et al.*, 1993).

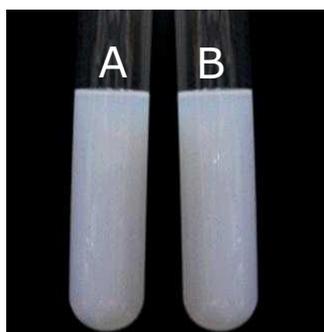


Figura 4.59. Aspecte de la dispersió lletosa dels Rhls en aigua obtinguda després d'una agitació vigorosa. (A: 0,2g de Rhl_{47T2} en 4 mL d'H₂O mili Q; B: 0,2g de Rhl_{47T2 ΔAD} en 4 mL d'H₂O mili Q).

En general s'accepta que per tal d'obtenir emulsions del tipus A/O, l'HLB del tensioactiu ha d'estar entre els valors de 3 i 6, mentre que per obtenir emulsions O/A es requereix un HLB entre 8 i 16 (Kralova *et al.*, 2009). D'altra banda, per obtenir un major èxit en l'elecció d'un o altre tensioactiu, és útil conèixer l'HLB requerit (HLBr) per la fase oliosa. Existeixen taules en què s'indiquen aquests valors per les fases lipòfiles més comunes. Per exemple, l'HLBr necessari per obtenir una emulsió estable de l'oli d'oliva és de 7, igual que per l'oli de gira-sol, mentre que el miristat d'isopropil té un HLBr de 11,5 (Gracia *et al.*, 1989). Així, si es treballa amb un tensioactiu que presenta un HLB igual a l'HLB requerit per la fase lipòfila de l'emulsió, s'obtindran emulsions més estables, la mida de gota serà mínima (<0,5 μm, nanoemulsió), i la viscositat també serà mínima. Segons aquest criteri, els Rhls obtinguts a partir de les soques parental i mutant estudiades són un bon emulgent per l'oli d'oliva i el de gira-sol però no ho són tant pel miristat d'isopropil, com veurem més endavant.

4.4.4. Comportament fàsic per l'anàlisi de possibles aplicacions dels Rhls

Si bé es desconeix el paper exacte que juguen els ramnolípid en el cicle vital i en la patogenicitat de *P. aeruginosa*, que secreta els ramnolípid al medi de creixement, gràcies a les seves propietats tensioactives aquests compostos s'estudien com a possibles substituents dels tensioactius sintetitzats químicament i que s'utilitzen en gran quantitat de processos industrials i mediambientals (Soberón-Chávez *et al.*, 2005).

Inicialment, la importància dels biotensioactius residia en que eren bons agents per dissoldre els hidrocarburs, però l'interès per aquestes molècules ha anat augmentant en les cinc darreres dècades com alternativa als tensioactius químics (Kralova *et al.*, 2009). Això és gràcies als seus avantatges respecte a aquests tensioactius químics: toxicitat inferior, naturalesa biodegradable (Soberón-Chávez *et al.* 2005), l'eficàcia en temperatures extremes, pH, salinitat, i en la síntesi (Mohan *et al.*, 2006). Gran part dels estudis realitzats han estat enfocats als usos dels biosurfactants en la bioremediació d'agents contaminants (Mulligan, 2005); tot i així, aquests compostos microbians tenen una gran varietat de propietats que els fan útils per la indústria dels aliments i la cosmètica, entre altres, sobretot com a emulsionants, escumants, humectants, solubilitzadors, antiadhesius i agents antimicrobians (Banat *et al.*, 2000, Kralova *et al.*, 2009).

Per tal de provar els Rhls en el marc d'aquestes possibles aplicacions, s'ha estudiat el seu comportament de fase com a tensioactiu/emulgent en aplicar-lo conjuntament amb possibles olis inclosos en el món de l'alimentació (l'oli d'oliva i l'oli de soja), la cosmètica i detergència (el miristat d'isopropil), i la bioremediació (el petroli de Casablanca).

Aquest tipus d'estudi es porta a terme mitjançant sistemes ternaris de tensioactiu (emulgent)-oli-aigua, que s'utilitzen freqüentment des de la dècada dels 80 en formulacions farmacèutiques i cosmètiques (Attwood *et al.*, 1983) i en l'agricultura i l'alimentació (Kachholz *et al.*, 1987), entre altres. Aquests sistemes es representen en diagrames ternaris, on és important una selecció adient dels components del sistema així com de la composició o les proporcions en les que cal combinar-los per tal que el producte final reuneixi les condicions necessàries per l'aplicació desitjada: viscositat, homogeneïtat i/o estabilitat en formulacions de cosmètica, alimentació i farmacèutiques, o bé baixa estabilitat en tractaments de bioremediació. Quan es pretén fer servir com a emulsionant són necessàries concentracions baixes (Kralova *et al.*, 2009).

Estudiant el comportament de fase s'obté informació global i sistemàtica de les fases que estan en equilibri dins un sistema tensioactiu. Aquest estudi també dóna informació dels tipus d'agregats moleculars que es formen i de com aquests poden variar en funció de la temperatura si s'assagen a diferents temperatures. Els resultats obtinguts d'aquest estudi generalment es representen mitjançant diagrames de fases que permeten una clara visualització de la informació experimental obtinguda. Analitzant aquests diagrames, no només obtenim informació del comportament fàsic, sinó també de les interaccions entre els components del sistema (Rivas *et al.*, 1999).

Donada la regla de fases de Gibbs: ($F = C + 2 - P$), el nombre de fases (P) que poden coexistir en un sistema depèn del nombre de components del sistema (C) i del nombre de graus de llibertat (F), que són la temperatura, la pressió i la composició o proporció dels diferents components. Els sistemes ternaris estudiats consten de tres components, oli-tensioactiu-aigua (O-TS-A) i, per tant, tenen quatre graus de llibertat que són la pressió, la temperatura i dues fraccions molars de dos dels components del sistema. Donat que es tracta de sistemes oberts, la pressió és l'atmosfèrica i per tal de portar a terme una representació gràfica bidimensional, és necessari mantenir constant tant la pressió com la temperatura del sistema per tal de poder construir el diagrama triangular.

Així doncs, s'ha utilitzat el triangle equilàter suggerit per Gibbs (Figura 4.60 esquerra) i s'han fixat dos graus de llibertat: la pressió (1 atm) i la temperatura (25°C). S'ha triat aquesta temperatura i no una de més elevada (cosa que facilitaria la formació d'emulsions) per tal de simular unes condicions en potencials aplicacions que minimitzin l'impacte ambiental que ocasiona la despesa energètica per aconseguir un increment de temperatura.

Cada vèrtex representa el 100% d'un dels components del sistema A (tensioactiu), B (aigua) i C (oli), mentre que l'aresta oposada representa el 0% del mateix. Al llarg de les arestes del triangle es representen composicions formades pels dos components de cada vèrtex, mentre que les composicions dels punts interiors del triangle (D) estan formades pels tres components del sistema. Les composicions situades sobre la recta que uneix un dels vèrtex al costat oposat, dividint el triangle equilàter en dos triangles rectangles, tenen una proporció constant dels altres dos components.

Per la determinació dels comportaments fàtics s'ha optat per seguir el mètode de valoració o "escombrat" (Figura 4.60 dreta), que consisteix en anar afegint petites quantitats d'un dels components sobre una relació fixa dels altres dos components, que no representin més de l'1% del pes total del sistema. Concretament, es parteix de diverses relacions tensioactiu-oli a les quals s'afegeix progressivament aigua escombrant d'aquesta manera tot el diagrama (Sadurní *et al.*, 2005). Així, s'ha estudiat el comportament fàsic de quatre sistemes ternaris utilitzant quatre olis diferents, els Rhls provinents del mutant com a biotensioactiu, i l'aigua, afegint increments d'un 5% d'aigua a les barreges del biotensioactiu (10%-20%) i de l'oli (90%-14%), tot seguint el mètode de valoració.

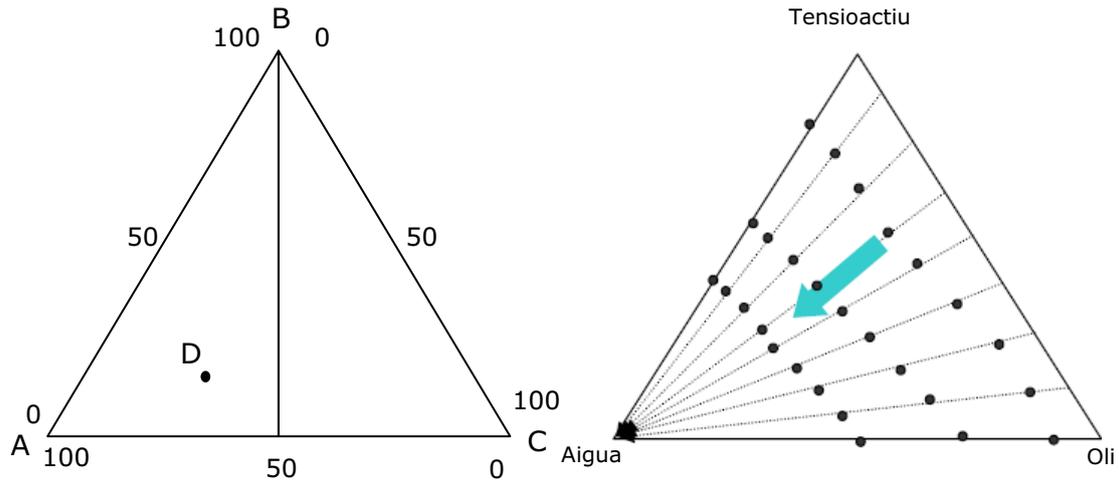
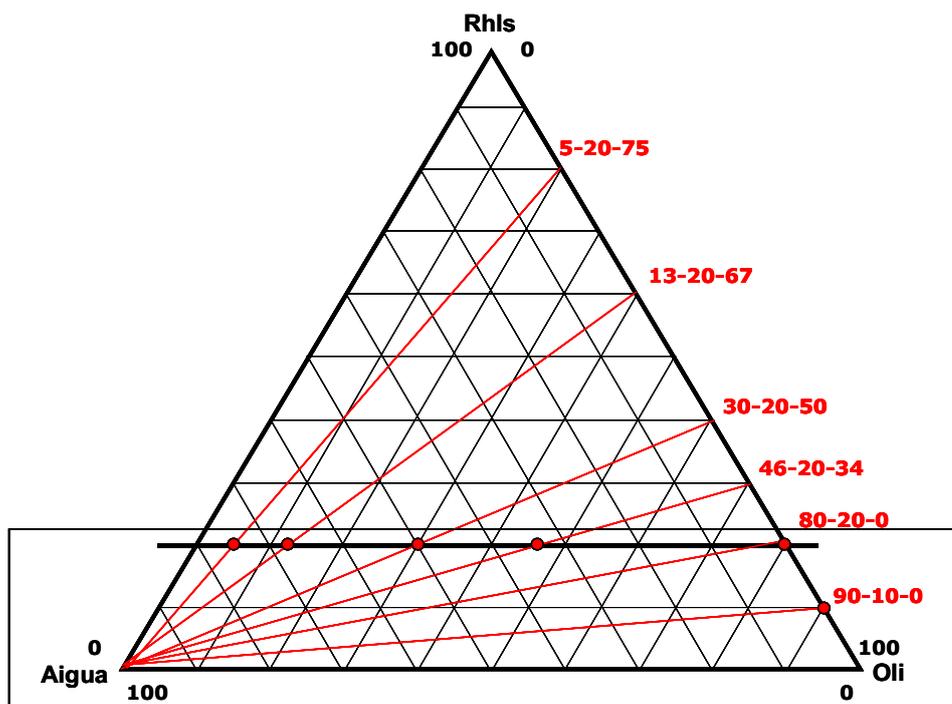


Figura 4.60. Esquema de la representació gràfica d'un diagrama de fases mitjançant el triangle equilàter a l'esquerra i representació del mètode d'estudi del comportament fàsic seguit a dreta.

Les barreges inicials (Taula 4.13, Figura 4.61) es preparen pesant els components, primer es pesa la quantitat de tensioactiu i es barreja amb la quantitat de component hidrofòbic a assajar i finalment s'afegeix l'aigua fins a 1 gram. S'agita vigorosament fins a aconseguir l'emulsió i es manté a 25°C durant 24 hores, moment en el qual es procedeix a l'observació visual per tal de determinar el número de fases presents en la barreja, la seva terbolesa o transparència o el caràcter isotròpic de l'emulsió. Les addicions posteriors d'aigua es realitzen després de la observació, igualment per pesada, i es segueix el mateix protocol d'agitació i observació visual cada 24 hores durant 20 dies.

Taula 4.13. Proporcions inicials en % i en pes (g) de les barreges per elaborar el diagrama ternari (aproximació menyspreant la diferència de densitat oli-aigua, que s'ajusta a cada assaig).

%	OLI	Rhls	H2O	PESADA	OLI (g)	Rhls (g)	H2O (g)
1	90	10	0	1	0,9	0,1	0
2	80	20	0	2	0,8	0,2	0
3	46	20	34	3	0,46	0,2	0,34
4	30	20	50	4	0,3	0,2	0,5
5	13	20	67	5	0,13	0,2	0,67
6	5	20	75	6	0,05	0,2	0,75



Zona d'estudi del diagrama ternari de fases

Figura 4.61. Representació gràfica de les proporcions inicials en el diagrama de fases. Els punts vermells són els punts de partida de la valoració i es corresponen als percentatges indicats també en vermell: Oli-Rhl-Aigua. Només es treballa fins a un 20% de Rhl, per això la zona marcada amb un requadre és la zona d'estudi.

Es parla de dispersió quan existeixen dues o més fases en una barreja i d'emulsió només quan una d'elles es troba subdividida en partícules discretes (fase dispersa) i disperses en l'altra (fase contínua) de manera més o menys estable (Heusch *et al.*, 2002). Els sistemes dispersos presenten inestabilitat termodinàmica i per la seva preparació s'ha d'aplicar energia, el que suposa un increment d'energia lliure interfacial respecte al sistema de fases separades. A més a més, les dispersions tenen una tendència espontània a trencar-se, és a dir, a la separació de les fases que les constitueixen. Els tensioactius disminueixen la tensió interfacial i, per tant, l'energia lliure interfacial, proporcionant una major estabilitat als sistemes dispersos. Si el tensioactiu té les característiques adequades i es troba en la quantitat requerida pot donar lloc a sistemes termodinàmicament estables com són les microemulsions (Heusch *et al.*, 2002).

Quan es barregen aigua, oli i tensioactiu i es permet que el sistema arribi a l'equilibri, normalment es formen dues o més fases i en molts casos gairebé tot el tensioactiu es dissol en una de les fases juntament amb quantitats variables d'aigua o d'oli. La fase on es troba el tensioactiu es coneix com a solució micel·lar o microemulsió (Heusch *et al.*, 2002). En les experiències realitzades en aquest

treball, inicialment es parteix d'un sistema constituït únicament per la fase oliosa, amb els Rhls obtinguts a partir de cultius de 96 hores de *P. aeruginosa* 47T2 ΔAD. En addicionar l'aigua es generen partícules de la fase aquosa (dispersa) en la fase oliosa (contínua). A mida que s'afegeix cada cop més quantitat d'aigua, existiran més partícules d'aquesta disperses en la fase oliosa fins que arriba un punt on la fase oliosa no pot contenir més partícules disperses de la fase aquosa i es produeix una inversió de fases on la fase oliosa generarà partícules disperses en la fase aquosa, que passarà a ser la fase contínua de la dispersió (Heusch *et al.*, 2002).

Donat que l'HLB del biotensioactiu format pels Rhls obtinguts de cultius de 96 hores de *P. aeruginosa* 47T2 ΔAD (mutant PHA negatiu) és de 7,2, es pot dir que es tracta d'un tensioactiu més aviat hidròfil, que funcionarà millor com a emulgent per estabilitzar emulsions O/A, tot i que seria més eficient si tingués un HLB més elevat. Tot i així, el seu HLB de 7 permet pensar que hauria de funcionar molt bé per estabilitzar emulsions on la fase oliosa sigui un oli vegetal (oliva, girasol, soja, etc.).

A l'hora de representar el comportament fàsic en cada proporció (Oli / Rhl / Aigua) com a punts dins el triangle equilàter, els punts més importants són aquells on les emulsions són completes i estables a les 24 hores. Tanmateix, és difícil aconseguir emulsions estables i per això, durant l'elaboració dels triangles de fases, s'han detectat diferents mecanismes de trencament de les emulsions, que en la bibliografia es descriuen com a fenòmens de fases o dispersions (Robins *et al.*, 2002). Aquests són els que es descriuen a continuació:

Sedimentació: formació d'una fase inferior constituïda per l'agregació de les gotes de l'emulsió sota la influència de la gravetat, com a conseqüència d'una diferència de densitat apreciable entre les fases contínua i dispersa. La densitat d'aquesta fase és clarament superior a la del medi continu i sedimenta a la base del tub.

Cremat: formació d'una fase superior constituïda per gotes de l'emulsió. La densitat d'aquesta fase és clarament menor que la del medi continu. Es coneix també com a sedimentació inversa. Per la diferència de densitat, la fase menys densa es col·loca sobre la més densa, tot i que aquesta separació pot no ser immediata. A més a més, com més petites són les gotes més triga a trencar-se l'emulsió.

Floculació: és el procés d'agregació superficial de gotes sense arribar a perdre la seva identitat. La floculació es dona quan, com a pas següent a la col·lisió de gotes, la repulsió interfacial no pot evitar la interpenetració de la regió interfacial de les gotes, unint-se el fet que al mateix temps les gotes no poden trencar-se més. Aquests agregats o floculs sedimenten més fàcilment que les gotes

individuals, d'acord amb el mecanisme de sedimentació. Aquest fenomen és reversible, doncs els floculs poden desfer-se en les seves gotes originals (de vegades és suficient una lleu agitació manual).

Coalescència: El procés de coalescència en una emulsió implica la unió de varies gotes per formar-ne d'altres de més grans, que finalment condueix a la separació de les fases. Per tal que es doni la coalescència, és necessari que la pel·lícula líquida interfacial que envolta les gotes, així com la monocapa de surfactant adsorbida sobre la seva superfície, pateixin un deteriorament complet. La coalescència és un procés irreversible.

4.4.4.1. Aplicacions en cosmètica. Sistema Miristat d'isopropil/Rhls/Aigua (MI/R/A)

Tots els cosmètics contenen un o més tensioactius que, baixant la tensió superficial, no només ajuden a la formació d'emulsions sinó que poden conferir propietats desitjables actuant com a humectants, solubilitzants, escumants, o poden modificar la fluïdesa, condicionar la superfície lubrificant o donar lluentor (Eldridge, 1997).

L'acció d'aquestes emulsions ha de ser a la superfície de la pell (epidermis), que conté un 10% d'aigua a la superfície i un 65% en la capa més interna. Els cosmètics penetren pels porus o per dissolució o emulsificació pels lípids cutanis, és per això que les emulsions més emprades són les del tipus O/A que poden afavorir la penetració. A més a més, els tensioactius donen al producte la capacitat d'eliminar substàncies no desitjables de la superfície de la pell o els cabells, evitant que es tornin a dipositar. Un clar exemple n'és el xampú, quan es mullen els cabells i s'afegeix xampú, en fregar provoca la formació d'escuma i fa que la brutícia (el greix i la olor dels cabells) emulsioni quedant inclosa en l'aigua de manera que en esbandir els cabells marxi sense tornar a dipositar-se (Mainkar *et al.*, 2001).

Les condicions que les emulsions cosmètiques han d'acomplir són: mantenir-se estables durant un llarg temps i a un rang ampli de temperatures, que sigui agradable d'aplicar-les, que siguin adequades per diferents tipus de pells i que no siguin irritables. També s'ha de controlar el contingut d'aigua i oli (l'oli normalment conté les fragàncies i representa entre un 20 i un 40%), la consistència, el pH (normalment s'ajusta a pH neutre) i la naturalesa dels additius (Kosaric, 1993).

Els tensioactius que més es fan servir són els no iònics, però també aniònics (ingredients principals en productes desengreixants com xampús, sabó de mans, gel per la dutxa), catiònics (s'utilitzen com condicionadors pels cabells) i amfifílics, i la seva concentració pot arribar fins a un 10% final (Kosaric, 1993).

Els Rhls d'origen microbià són productes naturals que demostren ser molt beneficiosos per la pell. S'han fet assajos clínics per una empresa de cosmètica que mostren el seu poder beneficiós en molts trastorns de la pell com l'eczema. Utilitzen el producte purificat amb pocs o cap subproducte per tal que sigui més fiable treballar-hi (Aurora Advanced Beauty Labs, Inc).

Fins i tot en assajos biomèdics amb Rhls s'han obtingut resultats molt interessants; s'ha tractat la psoriasi i ferides observant-se una millora en la cicatrització. Gràcies a l'efecte que tenen sobre els fibroblasts i queratinòcits de la pell, l'ús dels Rhls podria introduir-se al mercat dels cosmètics com un bon producte contra les arrugues de l'envelliment, així com en sabons i xampús saludables (Patent No. 7,262,171 Use of Rhamnolipids in Wound Healing, Treating Burn Shock, and Cosmetics, E.E.U.U.; Application No. 07075613.5 Use of Rhamnolipids in Wound Healing, Treating Burn Shock, and Cosmetics, U.E.).

El miristat d'isopropil té una baixa viscositat i una capacitat excel·lent d'extensió que li confereixen un intensiu efecte de greixat per la pell i els cabells, sense resultar massa greixós ni enganxós. Degut al seu comportament liposoluble, la seva capacitat d'emmagatzematge, inodoritat i compatibilitat amb la pell, és apropiat per tot tipus de productes cosmètics. En emulsionants y bases per cremes, s'utilitza el miristat d'isopropil per elaborar tota mena de llets o cremes, i resulta adequat com a component oliós en productes cosmètics i farmacèutics (Kosaric, 1993). És per això que en aquest treball es decideix provar el seu comportament de fase en el sistema ternari amb els Rhls produïts per *P. aeruginosa* 47T2 Δ AD i aigua.

Per estudiar més acuradament el comportament de fases del sistema ternari MI/R/A, es segueix el mètode de valoració detallat més amunt (Apartat 4.4.4, Figura 4.60). Pel que fa als Rhls, fent servir com a component hidrofòbic el miristat d'isopropil, si només es té en compte el punt d'emulsió total, no s'observa un gran poder emulsionant ja que únicament s'ha obtingut un punt cinèticament estable a les 24 hores (Taula 4.13; Figura 4.71). A més a més, l'emulsió s'aconsegueix amb un percentatge molt elevat d'aigua i molt baix de miristat (0,2%) i de ramnolípids (1,95%). Donat que l'HLB dels Rhls és de 7,2 i l'HLBr del miristat d'isopropil és de 11,5, ja seria d'esperar que no es donin emulsions estables ja que els Rhls no són un bon emulgent pel miristat d'isopropil.

Els punts experimentals i l'estat de la dispersió que es dona a cada un d'ells es veuen recollits a la Taula 4.13. Les barreges en les quals menys d'un 50% de la dispersió forma emulsió es presenten en color blanc, les barreges que mostren entre un 50 i un 75% d'emulsió són de color groc, en taronja estan aquelles dispersions on l'emulsió representa més d'un 75% de la dispersió, i en marró es mostren les barreges que quasi són emulsions totals però que a la superfície es dona el fenomen de floculació i/o cremat (Figura 4.72 A i B) o bé presenten una fina fase diferent, normalment una capa oliosa a la superfície (Figura 4.72 C) (Robins *et al.*, 2002). Per últim en vermell es presenten aquelles que han donat una emulsió comuna (blanca, opaca) completa i estable a les 24 hores. A la Figura 4.71 C es mostra el diagrama de fases ternari resultant. En vermell es mostra el punt d'emulsió (Figura 4.71 A).

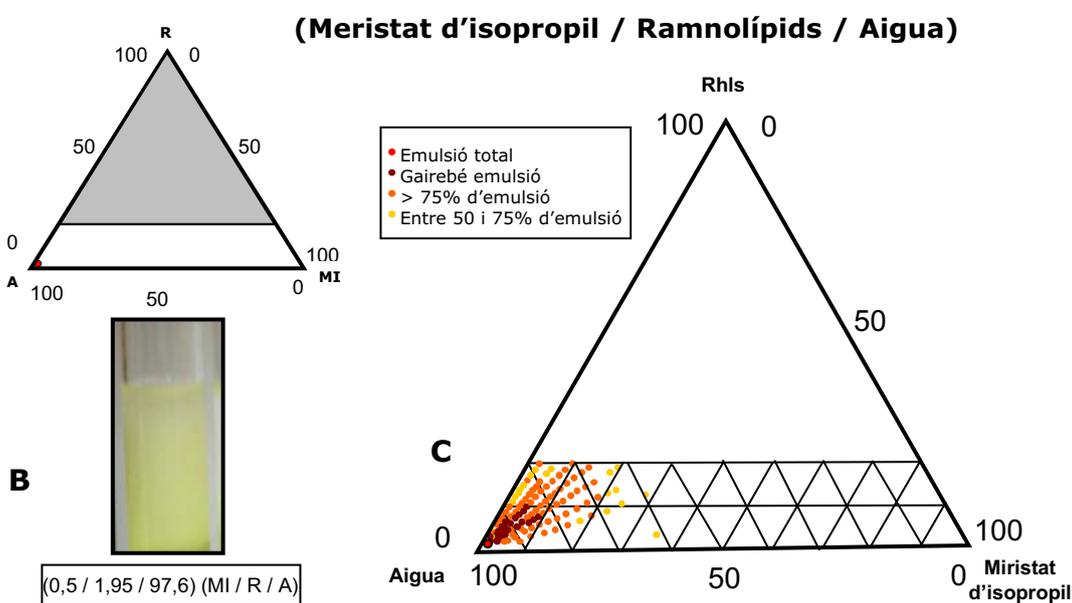


Figura 4.71. A) Diagrama de fases del sistema Miristat d'isopropil / Rhls / Aigua a 25°C. El punt vermell representa l'únic punt d'emulsió total trobat. **B)** Fotografia de l'emulsió trobada al punt (MI/R/A) (0,5/1,95/97,6). **C)** Diagrama complet.

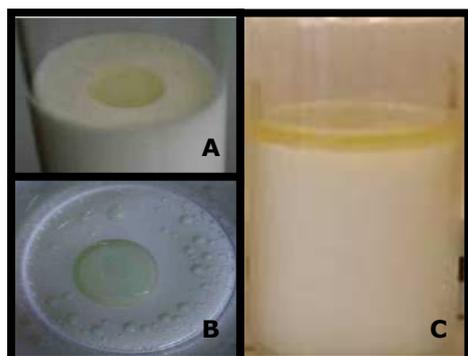


Figura 4.72. A i B) Floculació que es dona durant l'elaboració del triangle de fases (MI/R/A) en el punt (0,8 / 1,9 / 97,6) Fotografia presa des de dalt per veure el flocul central que es forma i la resta de gotetes al voltant. **C)** En el punt (3,2 / 4,7 / 92,2) s'observa un lleuger cremat d'una fina capa oliosa a la superfície.

Taula 4.13. Quadre que representa els punts experimentals de les barreges (MI / R / A) utilitzades per l'elaboració del diagrama de fases ternari. Es comença l'experiència amb 9 punts inicials amb les proporcions indicades en negreta (**MI**: Miristat d'Isopropil, **R**: Rhls i **A**: Aigua) i es realitzen 18 addicions d'aigua que fan variar les proporcions tal com s'indica.

1			2			3			4		
MI	R	A	MI	R	A	MI	R	A	MI	R	A
90	10	0	30	20	50	80	20	0	46	20	34
86	9,5	4,8	28,6	19	52,4	76	19	4,8	43,8	19	37,2
81	9,1	9,1	27,3	18,2	54,5	72,7	18,2	9,1	41,8	18,2	40
75	8,3	16,7	25	16,7	58,3	66,7	16,7	16,7	38,3	16,6	45,1
69,2	7,7	23,1	23,1	15,4	61,5	61,5	15,4	23,1	35,4	15,4	49,2
64,3	7,1	28,6	21,4	14,3	64,3	57,1	14,3	33,3	32,9	14,3	52,8
60	6,7	33,3	20	13,3	66,7	53,3	13,3	33,3	30,7	13,3	56
54	6,1	39,4	18,2	12,1	69,7	48,5	12,1	39,4	27,9	12,1	60
50	5,6	44,4	16,7	11,1	72,2	44,4	11,1	44,5	25,5	11,1	63,4
46,2	5,1	48,7	15,4	10,3	74,4	41	10,3	48,7	23,4	10,3	66,3
41,9	4,7	53,5	14	9,3	76,7	37,2	9,3	53,5	21,4	6,3	69,3
38,3	4,3	57,4	12,8	8,5	78,7	34	8,5	57,4	19,6	8,5	71,9
34	3,8	62,3	11,3	7,5	81,1	30,2	7,5	62,3	17,4	7,5	75,1
29,5	3,3	67,2	9,8	6,6	83,6	26,2	6,6	67,2	15,1	6,6	78,3
25,3	2,8	71,8	8,5	5,6	85,9	22,5	5,6	71,8	13	5,6	81,4
21,2	2,4	76,5	7	4,7	88,2	18,8	4,7	76,5	10,8	4,7	84,5
17,1	1,9	80,9	5,7	3,8	90,5	15,2	3,8	80,9	8,8	3,8	87,4
13,3	1,5	85,2	4,4	3	92,6	11,9	3	85,2	6,8	3	90,2
8,8	0,1	90,2	2,9	1,9	95,1	7,8	2	90,2	4,5	2	93,5

5			6			7			8			9		
MI	R	A	MI	R	A	MI	R	A	MI	R	A	MI	R	A
20	20	60	13	20	67	9	20	71	5	20	75	2	20	78
19	19	62	12,4	19	68,6	8,6	19	72,4	4,8	19	76,2	1,9	19	79,1
18,2	18,2	63,6	11,8	18,2	70	8,2	18,2	73,6	4,5	18,2	77,3	1,8	18,2	80
16,2	16,2	66,6	10,8	16,7	72,5	7,5	16,7	75,8	4,2	16,7	79,1	1,7	16,7	81,6
15,4	15,4	69,2	10	15,4	74,6	6,9	15,4	77,7	3,8	15,4	80,8	1,5	15,4	83,1
14,3	14,3	71,4	9,3	14,3	76,4	6,4	14,3	79,3	3,6	14,3	82,1	1,4	14,3	84,3
13,3	13,3	73,4	8,7	13,3	78	6	13,3	84	3,3	13,3	83,4	1,3	13,3	85,4
12,1	12,1	75,8	7,9	12,1	80	5,4	12,1	85,4	3	12,1	84,9	1,2	12,1	86,7
11,1	11,1	77,8	7,2	11,1	81,7	5	11,1	86,7	2,8	11,1	86,1	1,1	11,1	87,8
10,3	10,3	79,4	6,7	10,3	83,1	4,6	10,3	87,7	2,6	10,3	87,1	1	10,3	88,7
9,3	9,3	81,4	6	9,3	84,7	4,2	9,3	88,8	2,3	9,3	88,4	0,9	9,3	89,8
8,5	8,5	83	5,5	8,5	86	3,8	8,5	89,8	2,1	8,5	89,4	0,85	8,5	90,7
7,5	7,5	85	4,9	7,5	87,5	3,4	7,5	90,9	1,9	7,5	90,6	0,75	7,5	91,8
6,6	6,6	86,9	4,3	6,6	89,2	2,9	6,6	92,1	1,6	6,6	91,8	0,7	6,6	92,7
5,6	5,6	88,7	3,7	5,6	90,7	2,5	5,6	93,8	1,4	5,6	93	0,6	5,6	93,8
4,7	4,7	90,6	3,1	4,7	92,2	2,1	4,7	94,3	1,2	4,7	94,1	0,5	4,7	94,8
3,8	3,8	92,4	2,5	3,8	93,7	1,7	3,8	95,4	0,95	3,8	95,3	0,4	3,8	95,8
2,9	2,9	94,2	1,9	3	95,1	1,3	3	96,4	0,7	3	96,3	0,3	3	96,7
1,9	1,9	96,2	1,3	1,95	96,8	0,8	1,9	97,6	0,5	1,95	97,6	0,2	1,95	97,8

A partir de la representació d'aquest diagrama ternari de fases es pot deduir que, per tal d'obtenir emulsions de miristat d'isopropil i aigua fent servir els Rhls de *P. aeruginosa* 47T2 Δ AD com emulgent, les proporcions adequades són de poca quantitat de miristat d'isopropil, poca quantitat de tensioactiu i abundants quantitats d'aigua. Concretament, el punt on s'ha obtingut l'emulsió comuna completa cinèticament estable a les 24 hores ha estat: 0,5 / 1,95 / 97,6 (MI / R / A) (Figura 4.71 B).

4.4.4.2. Aplicacions en la indústria alimentària. Sistemes Oli d'oliva / Rhls / Aigua (O/R/A) i Oli de soja/Rhls/Aigua (S / R / A)

La característica principal per la qual es fan servir els tensioactius microbians en la indústria alimentària està relacionada amb la seva activitat sobre la TS (un bon tensioactiu és capaç de rebaixar la TS de l'aigua de 72 a 35 mN/m). A més a més de baixar la TS, també s'utilitzen biotensioactius, concretament Rhls, en la formulació del pa i de gelats per tal de controlar la seva consistència l'enduriment i la pèrdua de sabors dels olis; també s'utilitzen com estabilitzadors de greixos i com agents anti-esquitxants durant la preparació d'aliments amb olis i greixos. Un altra aplicació potencial dels biotensioactius en la indústria alimentària és com a agents antiadhesius, que es podrien emprar contra la formació de pel·lícules microbianes en la superfícies dels aliments (Kralova, *et al.*, 2009). Per últim, afegint Rhls s'aconsegueix una millora en l'estabilitat de la massa, la textura, el volum i la conservació de productes de la indústria del pa i milloren les propietats de la mantega, de croissants i dels productes de confiteria congelats (Kralova, *et al.*, 2009).

L'**oli d'oliva** és un oli comestible que s'utilitza àmpliament en el camp alimentari així com en formulacions cosmètiques i farmacèutiques per administració tòpica, oral i parenteral. L'ús de l'oli d'oliva com a ingredient culinari és majoritari en l'elaboració de diferents salses i per amanir, així com en aliments conservats mitjançant la immersió dels mateixos en oli d'oliva (conserves de peix, verdures, carns, formatges) (Wu *et al.*, 2001).

És per això que es tria l'oli d'oliva com a component hidrofòbic i s'estudia el comportament de fases del sistema ternari O/R/A, amb els Rhls de *P. aeruginosa* 47T2 Δ AD com a emulgent i aigua. Es segueix el mateix mètode de valoració utilitzat en el cas anterior i els punts experimentals i l'estat de la dispersió que s'obté a cada un dels assajos realitzats es veuen recollits a la Taula 4.14. En blanc es mostren les barreges amb menys d'un 50% d'emulsió, les que presenten entre

un 50 i un 75% d'emulsió es mostren en groc, en taronja les que presenten més d'un 75% d'emulsió, els quadres en marró representen aquelles mostres que són quasi emulsions, i en vermell aquelles que presenten una emulsió blanca, opaca, completa i estable a les 24 hores.

Taula 4.14. Quadre que representa els punts experimentals de les barreges (O/R/A) utilitzades per l'elaboració del diagrama de fases ternari. Es comença l'experiència amb 6 punts inicials amb les proporcions indicades en negreta (**O**: Oli d'oliva, **R**: Rhls i **A**: Aigua) i es realitzen 17 addicions d'aigua que fan variar les proporcions tal com s'indica.

1			2			3			4			5			6		
O	R	A	O	R	A	O	R	A	O	R	A	O	R	A	O	R	A
90	10	0	80	20	0	46	20	34	30	20	50	13	20	67	5	20	75
86	9,5	4,8	76	19	4,8	43,8	19	37,2	28,6	19	52,4	12,4	19	68,6	4,8	19	76,2
81	9,1	9,1	72,7	18,2	9,1	41,8	18,2	40	27,3	18,2	54,5	11,8	18,2	70	4,5	18,2	77,3
75	8,3	16,7	66,7	16,7	16,7	38,3	16,6	45,1	25	16,7	58,3	10,8	16,7	72,5	4,2	16,7	79,1
69,2	7,7	23,1	61,5	15,4	23,1	35,4	15,4	49,2	23,1	15,4	61,5	10	15,4	74,6	3,8	15,4	80,8
64,3	7,1	28,6	57,1	14,3	33,3	32,9	14,3	52,8	21,4	14,3	64,3	9,3	14,3	76,4	3,6	14,3	82,1
60	6,7	33,3	53,3	13,3	33,3	30,7	13,3	56	20	13,3	66,7	8,7	13,3	78	3,3	13,3	83,4
54	6,1	39,4	48,5	12,1	39,4	27,9	12,1	60	18,2	12,1	69,7	7,9	12,1	80	3	12,1	84,9
50	5,6	44,4	44,4	11,1	44,5	25,5	11,1	63,4	16,7	11,1	72,2	7,2	11,1	81,7	2,8	11,1	86,1
46,2	5,1	48,7	41	10,3	48,7	23,4	10,3	66,3	15,4	10,3	74,4	6,7	10,3	83,1	2,6	10,3	87,1
41,9	4,7	53,5	37,2	9,3	53,5	21,4	6,3	69,3	14	9,3	76,7	6	9,3	84,7	2,3	9,3	88,4
38,3	4,3	57,4	34	8,5	57,4	19,6	8,5	71,9	12,8	8,5	78,7	5,5	8,5	86	2,1	8,5	89,4
34	3,8	62,3	30,2	7,5	62,3	17,4	7,5	75,1	11,3	7,5	81,1	4,9	7,5	87,5	1,9	7,5	90,6
29,5	3,3	67,2	26,2	6,6	67,2	15,1	6,6	78,3	9,8	6,6	83,6	4,3	6,6	89,2	1,6	6,6	91,8
25,3	2,8	71,8	22,5	5,6	71,8	13	5,6	81,4	8,5	5,6	85,9	3,7	5,6	90,7	1,4	5,6	93
21,2	2,4	76,5	18,8	4,7	76,5	10,8	4,7	84,5	7	4,7	88,2	3,1	4,7	92,2	1,2	4,7	94,1
17,1	1,9	80,9	15,2	3,8	80,9	8,8	3,8	87,4	5,7	3,8	90,5	2,5	3,8	93,7	0,95	3,8	95,3
13,3	1,5	85,2	11,9	3	85,2	6,8	3	90,2	4,4	3	92,6	1,9	3	95,1	0,7	3	96,3

Del fet que l'HLB dels Rhls de *P. aeruginosa* 47T2 ΔAD sigui de 7,2, quasi igual a l'HLBr de l'oli d'oliva que és de 7, cal esperar l'obtenció d'una bona zona d'emulsió estable ja que aquests Rhls han de ser un bon emulgent per l'oli d'oliva en base al seu HLB. A partir dels resultats obtinguts s'observa que efectivament es troben diverses zones d'emulsió.

A la Figura 4.73 C es mostra el diagrama de fases ternari resultant en què, seguint el model de la taula anterior, es fan servir els mateixos colors. En vermell es mostren els 5 punts trobats d'emulsió total blanca, opaca i cinèticament estable a les 24 hores (Figura 4.72 A): (57,1 / 14,3 / 28,6), (53,3 / 13,3 / 33,3), (48,5 / 12,1 / 39,4), (32,9 / 14,3 / 52,8) i (3 / 12,1 / 84,9), sobre la mateixa figura s'exemplifica amb una fotografia el punt 48,5 / 12,1 / 39,4 (Figura 4.73 B). En marró es representen aquelles composicions que no arriben a ser emulsions totals per floculació (Figura 4.74 A) i/o cremat. En taronja es mostren els punts on més del 75% de la dispersió està emulsionada (Figura 4.74 B), on en el cas de la

fotografia mostrada no arriba a ser una emulsió perquè sedimenta una part oliosa. I en groc es representen les dispersions que presenten entre un 50 i un 75% de zona emulsionada, com en la Figura 4.74 C, on es dona el fenomen de cremat (Robins *et al.*, 2002). Si la fase d'emulsió no representa ni tan sols un 50% del volum total, els punts corresponents no es marquen al triangle, com en la Figura 4.74 D, on es diferencien clarament tres fases, la inferior oliosa, la superior aquosa i una interfase d'emulsió blanca.

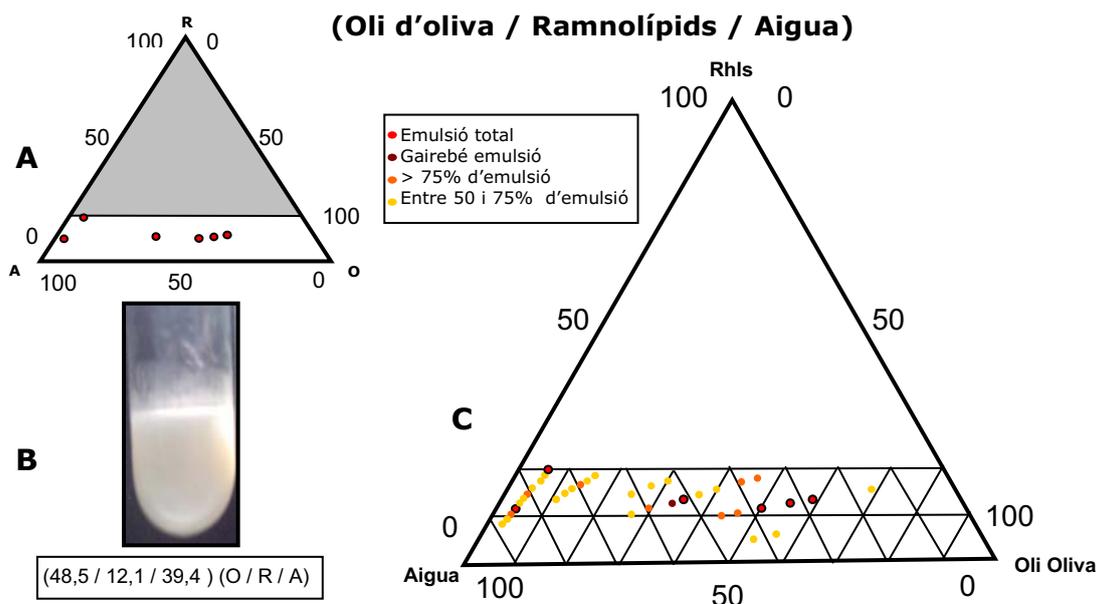


Figura 4.73. A) Diagrama de fases del sistema Oli d'oliva / Rhls / Aigua a 25°C. Els punts vermells representen els punts d'emulsió total trobats. **B)** Fotografia d'una de les emulsions trobada al punt (O/R/A) (48,5 / 12,1 / 39,4). **C)** Diagrama complet.

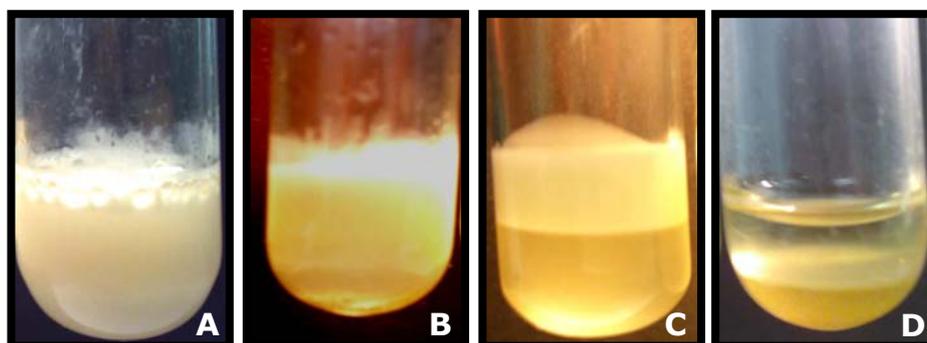


Figura 4.74. Durant l'elaboració del triangle de fases Oli d'oliva / Rhls / Aigua es donen diferents fenòmens de trencament de les emulsions. **A)** Floculació al punt (30,7 / 13,3 / 56); **B i C)** Cremat als punts (44,4 / 11,1 / 44,5) i (50 / 5,6 / 44,4) i **D)** sedimentació al punt (61,5 / 15,4 / 23,1).

D'aquests resultats es pot concloure que és necessari més d'un 10% de Rhls per promoure l'emulsió, ja que no s'obté cap dispersió que contingui més d'un 75% d'emulsió quan la proporció de Rhls és inferior al 10% i les emulsions totals s'obtenen amb valors de Rhls d'entre el 12 i el 14%. I pel que fa a les proporcions d'aigua i oli, cal que siguin equilibrades per tal d'aconseguir bones emulsions o bé tenir una proporció d'oli molt baixa.

En la literatura no es troben gaires diagrames ternaris realitzats amb biotensioactius i oli d'oliva. Sadurní i col·laboradors sí que en realitzen un però amb un tensioactiu diferent, Cremophor®EL (BASF). Es tracta d'un tensioactiu de síntesi química no iònic amb un HLB entre 12 i 14 soluble en aigua i en diferents dissolvents orgànics com els Rhls (èter etílic, acetat d'etil i cloroform d'entre altres), un diagrama ternari amb oli d'oliva. En aquest cas troben tres únics punts d'emulsió total blanca opaca fent servir entre un 10 i un 30 % de tensioactiu (Sadurní *et al.*, 2005).

L'oli de soja és emprat en la indústria farmacèutica, cosmètica i alimentària. En aplicacions farmacèutiques s'utilitza principalment en la formulació d'emulsions destinades a la nutrició parenteral total per tenir pocs efectes adversos (McNiff, 1977). També s'usa com a component oliós d'emulsions destinades a solubilitzar principis actius per la seva administració via oral o intravenosa, com ara vitamines (Dahl, 1994), esteroids poc solubles en aigua (Malcolmsó, 1993) i diazepam (Nankevis, 1994), entre d'altres. Els liposomes (Krishna, 1999), les nanoemulsions i les nanocàpsules (Santos-Magalhaes, 2000) són alguns sistemes d'alliberació de principis actius formulats amb oli de soja.

Però l'oli de soja s'empra majoritàriament en la gastronomia per fregir aliments i es troba també en salses per amanides, en productes de la indústria del pa, galetes, salsa barbacoa, i en formulacions d'oli per cuinar i per fabricar maionesa. És per això que es tria també l'oli de soja i que s'estudia com a component hidrofòbic del sistema ternari S/R/A per analitzar el comportament de fases dels Rhls de *P. aeruginosa* 47T2 Δ AD com a emulgent. Es segueix bàsicament el mateix mètode de valoració que en els apartats anteriors, però en aquest cas, no s'obté cap punt d'emulsió total cinèticament estable a les 24 hores, si bé l'HLB de l'oli de soja és també de 7, quasi igual a l'HLB dels Rhls (7,2). En base a aquests paràmetres caldria esperar una bona zona d'emulsió estable, que no es troba com es veu més endavant ja que no s'obté cap punt d'emulsió completa.

Els punts experimentals i l'estat de la dispersió que es dona a cada un d'ells es veu recollit a la Taula 4.15. Com en els casos anteriors, en blanc es mostren les barreges amb menys d'un 50% d'emulsió, aquelles que presenten entre un 50 i un

75% d'emulsió es mostren en groc, en taronja les que presenten més d'un 75% d'emulsió, i en marró aquelles que són quasi emulsions. No s'ha trobat cap emulsió blanca, opaca, completa i estable a les 24 hores.

Taula 4.15. Quadre que representa els punts experimentals de les barreges (S/R/A) utilitzades per l'elaboració del diagrama de fases ternari. Es comença l'experiència amb 6 punts inicials amb les proporcions indicades en negreta (**S**: Oli de soja, **R**: Rhls i **A**: Aigua) i es realitzen 17 addicions d'aigua que fan variar les proporcions tal com s'indica.

1			2			3			4			5			6		
S	R	A	S	R	A	S	R	A	S	R	A	S	R	A	S	R	A
90	10	0	80	20	0	46	20	34	30	20	50	13	20	67	5	20	75
86	9,5	4,8	76	19	4,8	43,8	19	37,2	28,6	19	52,4	12,4	19	68,6	4,8	19	76,2
81	9,1	9,1	72,7	18,2	9,1	41,8	18,2	40	27,3	18,2	54,5	11,8	18,2	70	4,5	18,2	77,3
75	8,3	16,7	66,7	16,7	16,7	38,3	16,6	45,1	25	16,7	58,3	10,8	16,7	72,5	4,2	16,7	79,1
69,2	7,7	23,1	61,5	15,4	23,1	35,4	15,4	49,2	23,1	15,4	61,5	10	15,4	74,6	3,8	15,4	80,8
64,3	7,1	28,6	57,1	14,3	33,3	32,9	14,3	52,8	21,4	14,3	64,3	9,3	14,3	76,4	3,6	14,3	82,1
60	6,7	33,3	53,3	13,3	33,3	30,7	13,3	56	20	13,3	66,7	8,7	13,3	78	3,3	13,3	83,4
54	6,1	39,4	48,5	12,1	39,4	27,9	12,1	60	18,2	12,1	69,7	7,9	12,1	80	3	12,1	84,9
50	5,6	44,4	44,4	11,1	44,5	25,5	11,1	63,4	16,7	11,1	72,2	7,2	11,1	81,7	2,8	11,1	86,1
46,2	5,1	48,7	41	10,3	48,7	23,4	10,3	66,3	15,4	10,3	74,4	6,7	10,3	83,1	2,6	10,3	87,1
41,9	4,7	53,5	37,2	9,3	53,5	21,4	6,3	69,3	14	9,3	76,7	6	9,3	84,7	2,3	9,3	88,4
38,3	4,3	57,4	34	8,5	57,4	19,6	8,5	71,9	12,8	8,5	78,7	5,5	8,5	86	2,1	8,5	89,4
34	3,8	62,3	30,2	7,5	62,3	17,4	7,5	75,1	11,3	7,5	81,1	4,9	7,5	87,5	1,9	7,5	90,6
29,5	3,3	67,2	26,2	6,6	67,2	15,1	6,6	78,3	9,8	6,6	83,6	4,3	6,6	89,2	1,6	6,6	91,8
25,3	2,8	71,8	22,5	5,6	71,8	13	5,6	81,4	8,5	5,6	85,9	3,7	5,6	90,7	1,4	5,6	93
21,2	2,4	76,5	18,8	4,7	76,5	10,8	4,7	84,5	7	4,7	88,2	3,1	4,7	92,2	1,2	4,7	94,1
17,1	1,9	80,9	15,2	3,8	80,9	8,8	3,8	87,4	5,7	3,8	90,5	2,5	3,8	93,7	0,95	3,8	95,3
13,3	1,5	85,2	11,9	3	85,2	6,8	3	90,2	4,4	3	92,6	1,9	3	95,1	0,7	3	96,3

A la Figura 4.75 es mostra el diagrama de fases ternari resultant. El punt en marró no arriba a ser una emulsió total per la sedimentació d'una fina capa d'oli (Figura 4.76 A). En taronja es mostren els punts on més del 75% de la dispersió està emulsionada, corresponent a la Figura 4.76 B, on s'observa que es produeix el fenomen de cremat. Finalment en groc s'anoten sobre el triangle les dispersions que presenten entre un 50 i el 75% de zona emulsionada on normalment es produeix també el cremat de la dispersió (Figura 4.76 C i D). Si la fase d'emulsió no representa ni tan sols un 50% del volum total, els punts corresponents no es marquen al triangle. Les fotografies de la Figura 4.75 E i F són un clar exemple d'aquesta situació on a la primera es diferencien tres fases (superior aquosa, inferior oliosa i interfase emulsionada) i a la segona sembla que s'estigui donant el fenomen de coalescència, que acabarà trencant l'emulsió en diferents fases ben diferenciades (Robins *et al.*, 2002).

(Oli de soja / Ramnolípid / Aigua)

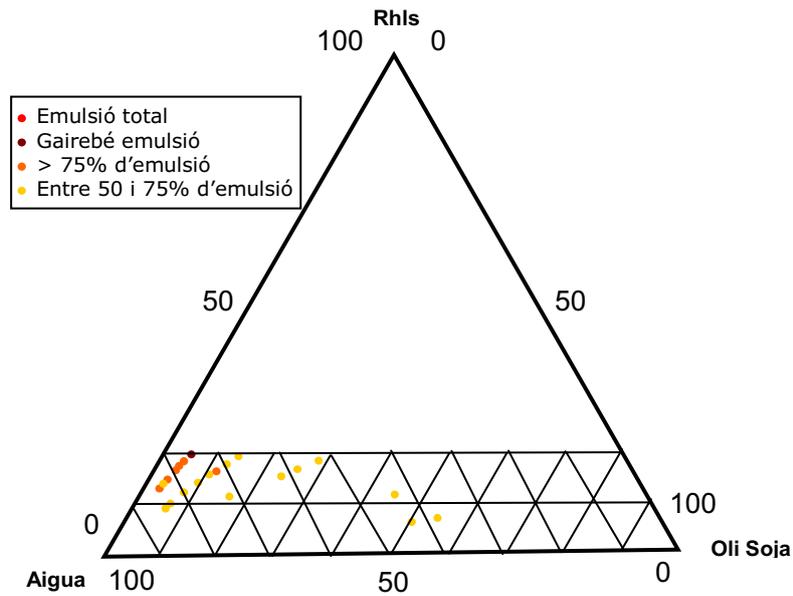


Figura 4.75. Diagrama de fases del sistema Oli de soja / Rhls / Aigua a 25°C.

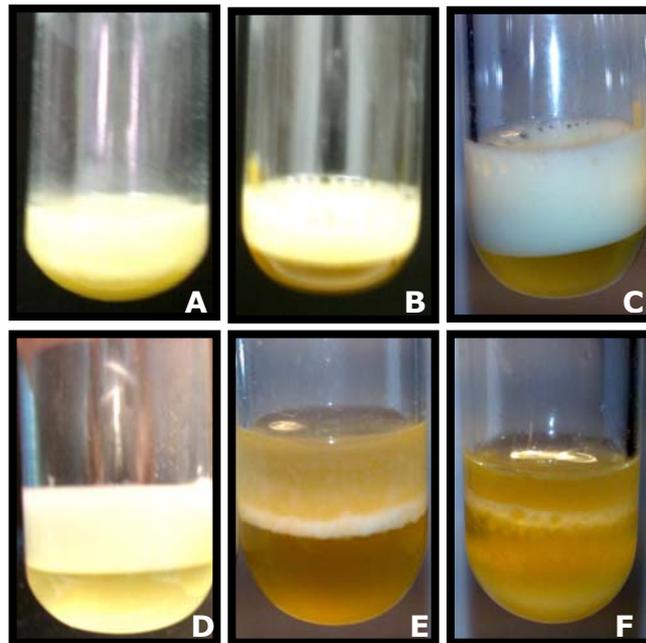


Figura 4.76. Durant l'elaboració del triangle de fases Oli de soja / Rhls / Aigua es donen diferents fenòmens de trencament de les emulsions. **A)** Sedimentació al punt (5 / 20 / 75); **B)** Cremat al punt (4,2 / 16,7 / 79,1); **C i D)** Cremat i floculació al punt (54 / 6,1 / 39,4) i (50 / 6,4 / 44,4) **E i F)** floculació i cremat als punts (48,5 / 12,1 / 39,4)(27,9 / 12,1 / 60).

Segons la tendència que s'observa al diagrama de la Figura 4.75 sembla que la concentració del 20% de Rhls assajada en les dispersions és insuficient per obtenir emulsions, tot i que amb proporcions d'aigua més elevades i d'oli de soja més baixes sembla que s'obtenen dispersions on més d'un 75% està emulsionat.

L'únic punt on gairebé s'aconsegueix una emulsió completa és el (5 / 20 / 75) (Figura 4.76 A), però es dona el fenomen de floculació, que la trenca. Probablement, si s'assagés una zona del triangle amb proporcions de Rhls més elevades obtindríem una bona zona d'emulsió. En la literatura no es troben gaires diagrames ternaris realitzats amb biotensioactius i oli de soja, però en l'estudi de Sadurní i col·laboradors amb Cremophor®EL(BASF) es troben dos únics punts d'emulsió total, una de convencional i una nanoemulsió afegint més quantitat de tensioactiu (Sadurní *et al.*, 2005).

4.4.4.3. Bioremediació i explotacions petrolieres. Sistema Petrolí de Casablanca /Rhls/Aigua (PC / R / A)

Si bé és cert que una part important dels hidrocarburs presents al medi ambient és biodegradable, cal remarcar que les taxes de biodegradació dels hidrocarburs estan limitades degut a la seva hidrofobicitat i baixa solubilitat en aigua (Alexander, 1999). Amb l'objectiu d'incrementar aquesta solubilitat per tal de millorar el procés de biodegradació d'aquests compostos hidrofòbics es planteja l'addició de tensioactius que els fan més biodisponibles (Van Hamme *et al.*, 2003).

Els tensioactius, en disminuir la tensió superficial del medi aquós, augmenten la solubilització i/o dispersió dels compostos de baixa solubilitat en aigua i, a més a més, canvien l'afinitat cèl·lula-hidrocarbur en augmentar la hidrofobicitat de la superfície cel·lular (Zhang *et al.*, 1994; Kanga *et al.*, 1997; Barkay *et al.*, 1999).

Així, l'ús d'agents emulsionants químics o microbians en la recuperació de petroli (EOR; Enhanced Oil Recovery) afavoreix la màxima i eficient explotació dels reservoris petrolers (Shennan *et al.*, 1987; Banat *et al.*, 2000). D'altra banda, en vessaments de petroli i derivats, la capacitat d'emulsificació dels tensioactius estimula la degradació dels contaminants per les poblacions microbianes (Beal *et al.*, 2000, Olivera *et al.*, 2000).

Tenint en compte la major diversitat estructural, biodegradabilitat i biocompatibilitat dels hidrocarburs (Desai *et al.*, 1997), l'ús potencial dels biotensioactius en les tecnologies de bioremediació sembla tenir més potencial en aquest camp que els tensioactius de síntesi (químics) (Ron *et al.*, 2001). Els biotensioactius més estudiats són els emulsans d'*Acinetobacter* sp. (Foght *et al.*, 1989; Barkay *et al.*, 1999) i el grup de Rhls produïts per diverses soques de *P. aeruginosa* (Van Dyke *et al.*, 1993, Zhang *et al.*, 1994, Abalos *et al.*, 2004).

La majoria dels estudis realitzats pel que fa a la influència dels biotensioactius sobre la degradació microbiana d'hidrocarburs s'ha portat a terme

amb compostos individuals com l'octadecà (Zhang *et al.*, 1992), fluorantè (Willumsen *et al.*, 1998) o fenantrè (Barkay *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1997). Tot i que, com succeeix per exemple en un vessament, l'estudi de la influència dels biotensioactius en la biodegradació de barreges complexes suposa una situació més propera a la realitat, els estudis realitzats amb aquestes barreges com ara el cru de petroli, són escassos (Foght *et al.* 1989).

Per això es decideix provar també amb el petroli de Casablanca (PC) el comportament de fase dels Rhls de *P. aeruginosa* 47T2 ΔAD igualment com a emulgent dins del sistema ternari PC/R/A, seguint el mateix mètode de valoració que amb la resta de compostos hidrofòbics emprats. En aquest cas es desconeix l'HLBr del petroli de Casablanca i, per tant, no es pot comparar amb l'HLB del tensioactiu com en els olis estudiats abans. Tot i així, sembla que la barreja dels Rhls de *P. aeruginosa* 47T2 ΔAD funciona bastant bé com a emulgent sobre aquest compost.

Els punts experimentals i l'estat de la dispersió que es dona a cada un d'ells es veu recollit a la Taula 4.16.

Taula 4.16. Quadre que representa els punts experimentals de les barreges (PC/R/A) utilitzades per l'elaboració del diagrama de fases ternari. Es comença l'experiència amb 6 punts inicials amb les proporcions indicades en negreta (**PC**: Petroli de Casablanca, **R**: Rhls i **A**: Aigua) i es realitzen 17 addicions d'aigua que fan variar les proporcions tal com s'indica.

1			2			3			4			5			6		
PC	R	A	PC	R	A	PC	R	A	PC	R	A	PC	R	A	PC	R	A
90	10	0	80	20	0	46	20	34	30	20	50	13	20	67	5	20	75
86	9,5	4,8	76	19	4,8	43,8	19	37,2	28,6	19	52,4	12,4	19	68,6	4,8	19	76,2
81	9,1	9,1	72,7	18,2	9,1	41,8	18,2	40	27,3	18,2	54,5	11,8	18,2	70	4,5	18,2	77,3
75	8,3	16,7	66,7	16,7	16,7	38,3	16,6	45,1	25	16,7	58,3	10,8	16,7	72,5	4,2	16,7	79,1
69,2	7,7	23,1	61,5	15,4	23,1	35,4	15,4	49,2	23,1	15,4	61,5	10	15,4	74,6	3,8	15,4	80,8
64,3	7,1	28,6	57,1	14,3	33,3	32,9	14,3	52,8	21,4	14,3	64,3	9,3	14,3	76,4	3,6	14,3	82,1
60	6,7	33,3	53,3	13,3	33,3	30,7	13,3	56	20	13,3	66,7	8,7	13,3	78	3,3	13,3	83,4
54	6,1	39,4	48,5	12,1	39,4	27,9	12,1	60	18,2	12,1	69,7	7,9	12,1	80	3	12,1	84,9
50	5,6	44,4	44,4	11,1	44,5	25,5	11,1	63,4	16,7	11,1	72,2	7,2	11,1	81,7	2,8	11,1	86,1
46,2	5,1	48,7	41	10,3	48,7	23,4	10,3	66,3	15,4	10,3	74,4	6,7	10,3	83,1	2,6	10,3	87,1
41,9	4,7	53,5	37,2	9,3	53,5	21,4	6,3	69,3	14	9,3	76,7	6	9,3	84,7	2,3	9,3	88,4
38,3	4,3	57,4	34	8,5	57,4	19,6	8,5	71,9	12,8	8,5	78,7	5,5	8,5	86	2,1	8,5	89,4
34	3,8	62,3	30,2	7,5	62,3	17,4	7,5	75,1	11,3	7,5	81,1	4,9	7,5	87,5	1,9	7,5	90,6
29,5	3,3	67,2	26,2	6,6	67,2	15,1	6,6	78,3	9,8	6,6	83,6	4,3	6,6	89,2	1,6	6,6	91,8
25,3	2,8	71,8	22,5	5,6	71,8	13	5,6	81,4	8,5	5,6	85,9	3,7	5,6	90,7	1,4	5,6	93
21,2	2,4	76,5	18,8	4,7	76,5	10,8	4,7	84,5	7	4,7	88,2	3,1	4,7	92,2	1,2	4,7	94,1
17,1	1,9	80,9	15,2	3,8	80,9	8,8	3,8	87,4	5,7	3,8	90,5	2,5	3,8	93,7	0,95	3,8	95,3
13,3	1,5	85,2	11,9	3	85,2	6,8	3	90,2	4,4	3	92,6	1,9	3	95,1	0,7	3	96,3

A la Figura 4.77 C es mostra el diagrama de fases ternari resultant. En vermell es mostren els tres punts d'emulsió total cinèticament estables a les 24 hores (5 / 20 / 75), (4,8 / 19 / 76,2), (4,2 / 16,7 / 79,1) (Figura 4.71 A). Un d'ells, el punt (4,2 / 16,7 / 79,1) (PC / R / A), s'il·lustra amb una fotografia (Figura 4.77 B).

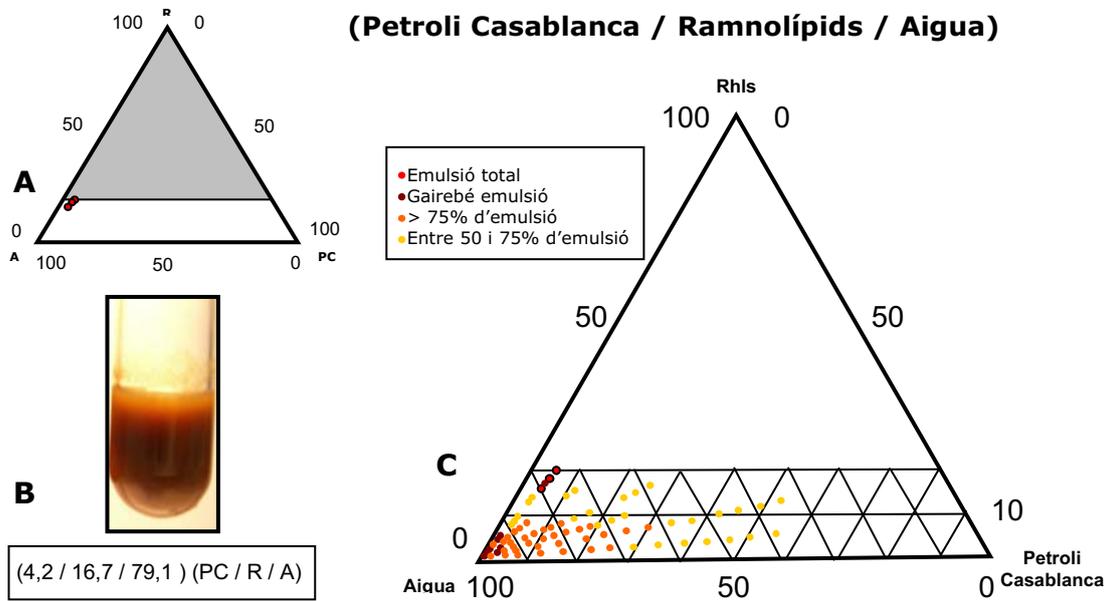


Figura 4.77. A) Diagrama de fases del sistema Petroli Casablanca / Rhls / Aigua a 25°C. Els punts vermells representen els punts d'emulsió total trobats. **B)** Fotografia d'una de les emulsions trobada al punt (PC / R / A) (48,5 / 12,1 / 39,4). **C)** Diagrama complet.

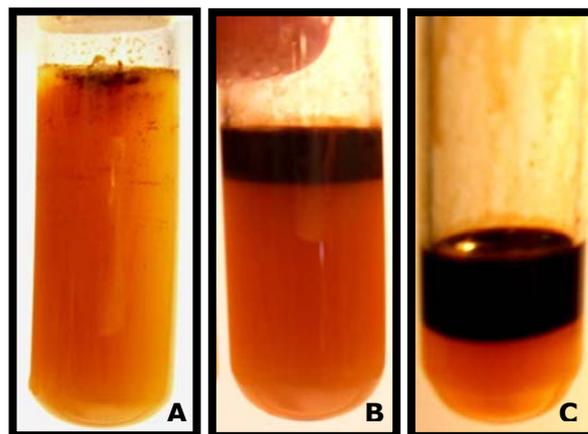


Figura 4.78. Durant l'elaboració del triangle de fases Petroli de Casablanca / Rhls / Aigua es donen diferents fenòmens de trencament de les emulsions. **A)** Floculació al punt (0,95 / 3,8 / 95,3) i **B i C)** Cremat als punts (46,2 / 5,1 / 48,7); (22,5 / 5,6 / 71,8).

Seguint el mateix patró de colors que la Taula 4.16, els punts vermells són zones d'emulsió total i els marrons aquelles que no arriben a ser emulsions totals per floculació i/o cremat (Robins *et al.*, 2002). La Figura 4.78 A n'és un exemple de floculació. En taronja es mostren els punts on més del 75% de la dispersió està emulsionada (Figura 4.78 B), i en groc les dispersions que presenten entre un 50 i el 75% de zona emulsionada (Figura 4.78 C). Si la fase d'emulsió no representa ni tan sols un 50% del volum total, els punts corresponents no es marquen al triangle.

A la Figura 4.77 C, que mostra el diagrama de fases ternari resultant, el triangle mostra una zona on les dispersions tenen més del 75% del seu volum emulsionat, on les proporcions de Rhls són menors del 10%, i la quantitat de petroli és baixa, concretament quan hi ha menys d'un 3% de petroli s'obtenen dispersions gairebé emulsionades per complet. Però les emulsions completes apareixen amb valors de Rhls propers al 20%, amb baixes proporcions de petroli de Casablanca i amb més del 75% d'aigua. Abalos i col·laboradors obtenen resultats similars amb Rhls obtinguts de *P. aeruginosa* AT10 (Abalos *et al.*, 2004) en un estudi més ampli (amb més punts inicials i amb un 10% de Rhls), i classifiquen amb ajuda del microscopi les emulsions parcials obtingudes com emulsions O/A/O.

Les anàlisis realitzades amb els diferents components hidrofòbics (miristat d'isopropil, oli d'oliva i de soja i el petroli de Casablanca) del comportament de fases de la barreja de Rhls produïda pel mutant de *P. aeruginosa* 47T2 Δ AD són estudis preliminars. El dilema fonamental a l'hora d'estudiar el comportament de fase d'un botensioactiu per l'elaboració d'un determinat producte, és la selecció adequada dels components del sistema ternari i les proporcions en què s'han de combinar per tal que el producte final reuneixi les condicions necessàries per l'aplicació desitjada. El diagrama de fases permet un coneixement complet de les possibilitats que un sistema pot oferir en quant als seus estats fàsics, en funció de les proporcions relatives dels seus components (Rosen, 2004).

Amb aquests diagrames s'ha aconseguit una petita aproximació a l'estudi d'aquests sistemes, ja que es fan servir baixes concentracions de biotensioactiu i es parteix d'unes composicions inicials determinades. Tot i que els resultats obtinguts presenten les seves limitacions, i encara queda un ampli rang de composicions diferents sense estudiar, marquen quines zones són més interessants per treballar-hi.

Els punts d'emulsió completa trobats als diferents assajos i que han estat marcats en vermell sobre els triangles són: (MI:0,2 / R:1,95 / A:97,85); (PC:5 / R:20 / A:75), (PC:4,8 / R:19 / A:76,2), (PC:4,2 / R:16,7 / A:79,1); (O:57,1 / R:14,3 / A:28,6), (O:53,3 / R:13,3 / A:33,3), (O:48,5 / R:12,1 / A:39,4), (O:32,9 / R:14,3 / A:52,8) i (O:3 / R:12,1 / A:84,9). Mentre que pels sistemes formats amb

el miristat d'isopropil i el petroli de Casablanca sembla que la zona d'emulsió es veu restringida a una regió molt petita i concreta del triangle on la proporció del component lipídic és baixa, pel sistema format amb oli d'oliva sembla que la regió d'emulsió és més ampla i no es limita només a la zona on la proporció de component lipídic és baixa.

Però no sempre s'obtenen punts d'emulsió completa, i més tenint en compte que no s'ha analitzat tot el triangle amb totes les proporcions possibles, sinó que s'ha restringit la zona d'estudi a la base del triangle on com a màxim la proporció de Rhls constitueix el 20% de la composició. El cas del sistema Oli de soja / Rhls / Aigua n'és un exemple clar, ja que no s'ha aconseguit trobar punts d'emulsió total dins l'àrea d'estudi. Probablement amb un examen més exhaustiu, amb un ventall de concentracions de Rhls més ampli, s'hauria pogut obtenir alguna zona d'emulsió.

L'ús de baixes concentracions de Rhls redueix els costos de producció, i ve justificat pel fet que més tard es vol incorporar aquest tensioactiu com un additiu o cosmètic, de manera que la quantitat a addicionar no ha de ser excessiva. Igualment, pel que fa a la bioremediació, per més que siguin bitensioactius biodegradables, el més adequat és addicionar el mínim de substàncies forànies a l'entorn. Una vegada es finalitzi l'anàlisi dels triangles sencers, rastrejant moltes més composicions diferents i sobretot composicions al voltant de les zones d'emulsió o on gairebé s'aconsegueixen emulsions i utilitzant olis diferents per formar nous sistemes ternaris, s'extrauran conclusions molt més fines i interessants de les propietats bioquímiques del biotensioactiu de *P. aeruginosa* 47T2 Δ AD. Però l'objectiu de l'estudi en el present treball era fer una aproximació preliminar per la introducció del biotensioactiu en possibles aplicacions industrials. I amb l'ajut d'altres estudis de tolerància al pH, temperatura i força iònica es podran corroborar les propietats que els fan interessants per potencials aplicacions i per les aplicacions que ja se'ls hi dona a alguns Rhls com a ingredients naturals en cosmètica, detergència, farmacologia i alimentació, o al camp agrícola per la dispersió de pesticides, així com per la bioremediació i la recuperació millorada d'olis.

5. CONCLUSIONS

5. CONCLUSIONS

1. No s'han observat diferències significatives en el sistema lipolític intra- i extracel·lular de la soca *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 respecte al de la soca tipus *Pseudomonas aeruginosa* PA01 i al de l'aïllat natural *Pseudomonas aeruginosa* 42A2. Això indica que tot i que les seves lipases estan implicades en el metabolisme dels lípids, no són directament responsables de la síntesi diferencial dels polímers extracel·lulars estudiats en aquest treball.
2. S'han obtingut els mutants *P. aeruginosa* 47T2 Δ AD i *P. aeruginosa* 42A2 Δ AD defectius per la producció de PHAs, fet que ha estat posat de manifest mitjançant un seguit de metodologies tant de caràcter fisicoquímic (MO, MET, RMN i quantificació gravimètrica) com molecular (anàlisi de les seqüències de l'ADN mutat).
3. No hi ha diferències significatives en la tendència de producció d'àcids grassos hidroxilats entre el mutant *P. aeruginosa* 42A2 Δ AD i la soca parental *P. aeruginosa* 42A2, si bé la quantitat dels productes alliberats és lleugerament inferior en el mutant, probablement degut a la disminució en la seva taxa de creixement.
4. Els biotensioactiu produït pel mutant PHA negatiu *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 Δ AD constitueix una barreja de vuit homòlegs: quatre di-Rhls (Rha₂-C₈-C₁₀, Rha₂-C₁₀-C₁₀, Rha₂-C₁₀-C_{12:1}, Rha₂-C₁₀-C₁₂ / Rha₂-C₁₂-C₁₀) i quatre mono-Rhls (Rha-C₈-C₁₀ / Rha-C₁₀-C₈, Rha-C₁₀-C₁₀, Rha-C₁₀-C_{12:1} / Rha-C_{12:1}-C₁₀, Rha-C₁₀-C₁₂ / Rha-C₁₂-C₁₀), de propietats fisicoquímiques similars al biotensioactiu de la soca parental *Pseudomonas aeruginosa* 47T2.
5. En les anàlisis del comportament fàsic mitjançant l'elaboració de diagrames ternaris de fase del biotensioactiu obtingut del cultiu de 96 hores del mutant *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 Δ AD, suplementat amb olis de fregit residual, els punts d'emulsió completa per les diferents fases hidrofòbiques assajades són: (MI:0,2 / R:1,95 / A:97,85); (PC:5 / R:20 / A:75), (PC:4,8 / R:19 / A:76,2), (PC:4,2 / R:16,7 / A:79,1); (O:57,1 / R:14,3 / A:28,6), (O:53,3 / R:13,3 / A:33,3), (O:48,5 / R:12,1 / A:39,4), (O:32,9 / R:14,3 / A:52,8) i (O:3 / R:12,1 / A:84,9). No s'han detectat punts d'emulsió total en els assajos amb l'oli de soja.

6. BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA

- Abalos, A., Pinazo, a., Infante, M.R., Casals, M., Garcia, F., Manresa, A.** (2001) Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. *Langmuir*. **17**:1367-1371.
- Abalos, A., Viñas, M., Sabaté, J., Manresa, M. A. i Solanas, A. M.** (2004) Enhanced Biodegradation of Casablanca Crude Oil by A Microbial Consortium in Presence of a Rhamnolipid Produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. *Biodegradation* **15(4)**: 249-260.
- Agència de Residus de Catalunya.** (2007). Programa de gestió de residus municipals a Catalunya. *PROGREMIC 2007-2012*. Barcelona: Departament de Medi Ambient i Habitatge de la Generalitat de Catalunya.
- Aguirre, P.M., Cacho, J.B., Folgueira, L., López, M., García, J. i Velasco, A.C.** (1990) Rapid fluorescence method for screening *Salmonella* spp. from enteric differential agars. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 148-149.
- Akar, A., Akkaya, E.U., Yesiladali, S.K., Celikyilmaz, G., Cokgor, E.U., Tamerler, C., Orhon, D., Cakar, Z.P.** (2006) Accumulation of polyhydroxyalkanoates by *Microlunatus phosphovorus* under various growth conditions, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **33 (3)**: 215-220.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A., Zang, J., Zang, Z., Miller, W., Lipman, D.L.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acid. Res.* **25**: 3389-3402.
- Alvarez H.M., Pucci O.H., Steinbüchel A.** (1997) Lipid storage compounds in marine bacteria. *Appl. Microb. Biotech.* **47**: 132-139.
- Alvarez, H. M., Mayer, F., Fabritius, D. i Steinbüchel, A.** (1996) Formation of intracytoplasmic lipid inclusions by *Rhodococcus opacus* strain PD630. *Arch. Microbiol.* **165**: 377-386.
- Anderson, A.J. i Dawes, E.A.** (1990) Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* **54**: 450-472.
- Anderson, M. i McCarthy, R.** (1972) Rapid and sensitive assay for free fatty acids using rhodamine 6G. *Anal. Biochem.* **45**: 260-270.
- Anguita, J., Rodríguez, I.B. i Naharro, G.** (1993) Purification, gene cloning, amino acid sequence analysis, and expression of an extracellular lipase from *Aeromonas hydrophila* human isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2411-2417.
- Anzai, Y., Kim, H., Park, J-Y., Wakabayashi, H., Oyaizu, H.** (2000) Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 1563-1589.
- Arino, S., Marchal, R. I Vandecasteele, J.P.** (1996) Identification and production of a rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas* species. *Appl. Microbiol.* **45**: 162-168.
- Arpigny, J.L. i Jaeger, K-E.** (1999) Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem. J.* **343**: 177-183.
- Attwood, D. i Florence, A.** (1983) Emulsions. Dins de : *Surfactants systems chemistry, pharmacy and biology*. Chapman and Hall ed. (New York) **pp**: 469-566.

- Babu, P.S., Vaidya, A.N., Bal, A.S., Kapur, R., Juwarkar, A., Khanna, P.** (1996) Kinetics of biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2 from industrial wastes. *Biotechnol. Lett.* **18**: 263-268.
- Baglioni, P., Berti, D., Bonini, M.** (2000) Preparation and stability of emulsions. *Chimica e L'industria (Milan)* **82(7)**: E1/1-E1/8.
- Banat, I. M.** (1995) Characterization of biosurfactants and their use in pollution removal-state of the art (review). *Acta Biotechnol.* **15**: 251-267.
- Banat, I., Makkar, R., y Cameotra, S.** (2000) Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**: 495-508.
- Barkay, T., S. Navon-Venezia, E. Z. Ron y E. Rosenberg.** (1999) Enhancement of solubilisation and biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by the bioemulsifier alasan. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:2697-2702.
- Bascomb, S.** (1987) Enzyme tests in bacterial identification. *Methods Microbiol.* **19**: 105-160.
- Bassas, M.** (2007) Estudi dels polihidroxicanoats acumulats per *Pseudomonas aeruginosa* 42A2: producció y caracterització. Tesi doctoral. Universitat de Barcelona.
- Bastida, J., Andrés, C., Culleré, J., Busquets, M. i Manresa, A.** (1999) Biotransformation of oleic acid into 10-hydroxy-8E-octadecenoic acid by *Pseudomonas* sp. 42A2. *Biotechnol. Lett.* **21**:1031-1035.
- Beal, R. i Betts, W.** (2000) Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Appl. Microbiol.* **89**: 158-168.
- Beisson, F., Tiss, A., Rivière, c. i Verger, R.** (2000) Methods for lipase detection and assay: a critical review. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 133-153.
- Benincasa, M.** (2001) Obtenção de biotensioativos a partir de resíduos da indústria de oleos vegetais. *Universidade Estadual Paulista. Instituto de Química.* Brasil.
- Berg, J.M., Stryer, L., Tymoczko, J.** (2007) Bioquímica. *Ed. Reverté S.A.* Versió de la 6a Edició anglesa.
- Björkling, F., Godtfredsen, S.E. i Kirk, o.** (1991) The future impact of industrial lipases. *TIBTECH* **9**: 360-363.
- Bofill, C., Prim, N., Mormeneo, M., Manresa, A., Pastor, F.J. i Diaz, P.** (2009) Differential behaviour of *Pseudomonas* sp. 42A2 LipC, a lipase showing greater versatility than its counterpart LipA. Acceptat *Biochimie*.
- Bornscheuer, U.T.** (2002) Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *Fems microbiol. Rev.* **26 (1)**: 73-81
- Boyer, R.** (2000) Lípidos, membranes biológicas y transporte celular. *Conceptos en Bioquímica* (Internacional Thomson, Eds). pp.238-256. México, D.F.
- Brandl, H., Gross, R.A., Lenz, R.W., Fuller, R.C.** (1990) Plastics from bacteria and for bacteria: poly(β -hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **41**: 77-93.
- Bredenbruch, F., Nimitz, M., Wray, V., Morr, M., Muller R. i Häussler, S.** (2005) Biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkilquinolines. *J. Bacteriol.* **187**: 3630-3635.

- Burger, M., Glaser i L. Burton, R.M.** (1963) The enzymatic synthesis of a rhamnose-containing glycolipid by extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **238**: 2723-2731.
- Campos-García, J., Caro, A. D., Nájera, R. Miller-Maier,R.M., Al-Tahhan, R. A. i Soberón-Chávez, G.** (1998) The *Pseudomonas aeruginosa* *rhIG* gene encodes a NADPH-dependent b-ketoacyl reductase which is specifically involved in rhamnolipid synthesis. *J. Bacteriol.* **180**: 4442-4451.
- Casini, E., de Rijk, T. C., de Waard, P., Eggink, G.** (1997) Synthesis of poly(hydroxyalkanoate) from hydrolyzed linseed oil. *J. Environ. Polym. Degr.* **5**: 153-158.
- Castro, H. F. de; Mendes, A. A.; Santos, J. C. dos i Aguiar, C. L. de.** (2004) Modification of oils and fats by biotransformation. *Quím. Nova* [online]. **27(1)**: 146-156.
- Chahiniana, H., Ninib, L., Boitardc, E., Dubèsc, J.P., Comeaub, L.C. i Sardad, L.** (2002) Distinction between esterases and lipases: a kinetic study with vinyl esters and TAG. *Lipids* **37(7)**: 653-662.
- Chandrasekaran, E. V., i Bemiller, J. N.** (1980) Constituent analyses of glycosaminoglycans. *Methods Carbohydr. Chem.* **8**: 89-96.
- Chayabruta, C. i Wu, J.** (2001) Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* under denitrification: Effects of limiting nutrients and carbon substrates. *Biotechnol. Bioeng.* **72**: 25-33.
- Chitnis, C. E. i Ohman, D. O.** (1993) Genetic analysis of the alginate biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa* shows evidence of an operonic structure *Molec. Microbiol.* **8 (3)**: 583-590.
- Christie, W.W.** (1986) The positional distribution of fatty acids in triacylglycerides. En: The analysis of oils and fats. Editores: Hamilton, R.J. y Rossell, J.B. Elsevier Applied Science. London. pp: 313-339.
- Christie, W.W.** (2003) *Lipid Analysis (3rd Edition)*; Isolation, separation, identification and structural analysis of lipids. (Oily Press, Bridgwater).
- Chrost, R.J. i Krambeck, H.J.** (1986) Fluorescence correction for measurement of enzyme activity in natural waters using methylumbelliferyl-substrates. *Arch. Hydrobiol.* **106(1)**: 79-90.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y. i Hsu, L.** (1972) Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria: Genetic Transformation of *Escherichia coli* by R-Factor DNA. *PNAS.* **69 (8)**: 2110-2114.
- Cooper, D. G. i Paddock, D.A.** (1984) Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 173-176.
- Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. DeBeer, D. Caldwell, D. Korber & G. James.** (1994) Biofilms, the customized microniche. *J. Bacteriol.* **176**: 2137-2142.
- Culleré, J.** (2002) Utilització de l'àcid oleic per *Pseudomonas* sp 42A2. Tesi doctoral. Universitat de Barcelona.
- Culleré, J., Durany, O., Busquets, M., Manresa, A.** (2001) Biotransformation of oleic acid into (E)-10-hydroxy-8-octadecenoic acid and (E)-7, 10-dihydroxy-8-octadecenoic acid by *Pseudomonas* sp. 42A2 in an immobilized system. *Biotechnol. Lett.* **3(23)**: 215-219.

- Curley, J. M., Lenz, R.W. i Fuller, R. C.** (1996) Sequential production of two different polyesters in the inclusion bodies of *Pseudomonas oleovorans*. *J. Biological Macromol.* **19**: 29-34.
- Dahl, G.B.** (1994) Stability of Vitamins in Soybean Oil Fat Emulsion Under Conditions Simulating Intravenous Feeding of Neonates and Children. *J. Parenter. Enteral. Nutr.* **18(3)**: 2234-2239.
- Davey, M.E., Caiazza, N.C. i O'Toole, G.A.** (2003) Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J.Bacteriol.* **185**: 1027-1036.
- Davis, E.N., Wallwn, J.C., Rohwedder, W.K. i Rhodes, R.A.** (1969) Microbial hydration of cis-9 alkenoic acids. *Lipids* **4**: 356-362.
- De Andrés, C. Mercadé, E., Guinea, J. i Manresa, M.A.** (1994) 7,10-Dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid produced by *Pseudomonas* 42A2: evaluation of different cultural parameters of the fermentation. *World J Mocrbiol. Botechnol.* **10**: 106-109.
- De Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubizik, U. i Timmis, K.N.** (1990) Mini-TnS Transposon Derivatives for Insertion Mutagenesis, Promoter Probing, and Chromosomal Insertion of Cloned DNA in Gram-Negative Eubacteria. *J. Bacteriol.* **11**: 6568-6572.
- Deleu, M., Paquot, M.** (2004) From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. *C.R. Chimie* **7**.
- Dennis, D., Liebig, C., Holley, T., Thomas, K. S., Khosla, A., Wilson, D. i Augustine, B.** (2003) Preliminary analysis of polyhydroxyalkanoate inclusions using atomic force microscopy. *FEMS Microbiol. Lett.* **226**: 113-119.
- Desai, J.D. i Banat, I.M.** (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61(1)**: 47-64.
- Deziel, E., Lepine, F., Milot, S. i Villemur, R.** (1999) Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP. *Biochim. Biophys. Acta.* **1485**: 145-152.
- Deziel, E., Lepine, F., Milot, S. i Villemur, R.** (2003) rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*, 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiol.* **149**: 2005-2013.
- Díaz, P., Prim, N. i Pastor, F. I. J.** (1999) Direct fluorescence-based lipase activity assay. *BioTech.* **27**: 696-700.
- Doi, Y. y Abe, C.** (1990) Biosynthesis and characterization of a new bacterial copolyester of 3-hydroxyalkanoates and 3-hydroxy- ω -chloroalkanoates. *Macromol.* **23**: 3705-3707.
- Dutta, J. R. i Banerjee, R.** (2006) Isolation and characterization of a newly isolated *Pseudomonas* mutant for protease production. *Braz. arch. biol. technol.* **49 (1)**: 37-47.
- Eggink, G., de Waard, P., Huijberts, G.N.M.** (1995) Formation of novel poly(hydroxyalkanoates) from long-chain fatty acids. *Can. J. Microbiol.* **41**: 14-21.
- Eggink, G., van der Wal, H., Huijberts, G.N.M., de Waard, P.** (1993) Oleic acid as a substrate for poly-3-hydroxyalkanoate formation in *Alcaligenes eutrophus* and *Pseudomonas putida*. *Ind. Crops. Prod.* **1**: 157-163.
- Eldridge, J. M.** (1997) The analysis of surfactants in cosmetics. *Surfactant science series.* **68**: 83-104.

- El-Sharkawy, S., W. Yang, Dostal, L. i Rosazza, J.P.N.** (1992) Microbial oxidation of oleic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**(7): 2116-2122.
- Fabritius, D., Schäfer, H. J., i Steinbüchel, A.** (1996) Identification and production of 3-hydroxy- Δ^9 -cis -1,18-octadecenedioic acid by mutants of *Candida tropicalis*. *Appl. Microbiol. Biotech.* **45**: 342-348.
- Fernández, D., Rodríguez, E., Bassas, M., Viñas, M., Solanas, A. M., Llorens, J., Marqués, A. M. i Manresa, A.** (2005) Agro-industrial oily wastes as substrates for PHA production by the new strain *Pseudomonas aeruginosa* NCIB 40045: Effect of culture conditions. *Biochem. Eng. J.* **26** (2-3): 159-167.
- Foght, J. M., D. L. Gutnick y D. W. S. Westlake.** (1989) Effect of emulsan on biodegradation of crude oil by pure and mixed cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:36-42.
- Fojan, P., Jonson, P.H., Petersen, M.T.N. i Petersen, S.B.** (2000) What distinguishes an sterase from a lipase: A novel structural approach. *Biochimie.* **82**: 1033-1041.
- Fukui, T. i Doi, Y.** (1998) Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plant oils by *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**: 333-336.
- Gámiz, M.** (2007) Tecnologías sostenibles para la gestión de residuos en Ventanilla (Lima). Aprovechamiento energético del Biogás (PFC). Barcelona, Universitat Politècnica de Catalunya.
- Generalitat de Catalunya, Departament de Medi Ambient, Junta de residus** (1999) Catàleg de residus de Catalunya, ISBN 84-393-4842-8.
- Gerhardt, P. Ed.; Murray, R. G.** (1994) Methods for general and molecular bacteriology. Ed.; Wood, W.A. Ed.; Krieg, N.R. Ed.
- Gerhardt, P., Krieg, N.R., Murray, R.G.E.** (1994) Methods for General and Molecular Bacteriology. *Amer. Soc. Microbiol.* EEUU.
- Gilbert, E.J., Drodzd, J.W., i Jones, C.W.** (1991) Physiological regulation and optimization of lipase activity in *Pseudomonas aeruginosa* EF2. *J. Gener. Microbiol.* **137**: 2215-2221.
- Godtfredsen, S.E.** (1993) Lipases. Enzymes in food processing. Ed. Nagodawithana, T. i Reed, G. *Academic Press.* pp 205-216.
- Gracia, A., Lachaise, J., Marion, G. i Schechter, R.S.** (1989) A study of the required hydrophile-lipophile balance for emulsification. *Langmuir.* **5** (6): 1315-1318.
- Griebel, R., Smith, Z., Merrick, J.M.** (1968) Metabolism of poly- β -hydroxybutyrate. I. Purification, composition and properties of native poly- β -hydroxybutyrate granules from *Bacillus megaterium*. *Biochem.* **7**: 3676-3681.
- Griffin, W.C.** (1949) Classification of surface-active agents by "HLB". *J. Soc. Cosmet. Chem.* **1**: 311-326.
- Griffith F.** (1928) The significance of pneumococcal types. *J Hyg.* **27**: 113-159.
- Guerra-Santos, L., Käppeli, O. i Fiechter, A.** (1984) *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 301-305.
- Guerrero, A., Casals, I., Busquets, M., León, i. i Manresa, M.A.** (1997) Oxidation of oleic acid to (E)-10-hydroperoxy-8-octadecenoic acid and (E)-10-hydroxy-8-octadecenoic acid by *Pseudomonas* sp. 42A2. *Biochim. Biophys. Acta.* **1347**: 75-81.

- Gunstone, F.D.** (1999) Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. *J. Sci. Food. Agric.* **79**: 1535-1549.
- Gunther, N.W. IV, Nunez, A., Fett, W. i Solaiman, D.K.** (2005) Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chororaphis*, a nonpathogenic bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 2288-2293.
- Gutiérrez, A., del Río, J. C., Martínez, M.J. i Martínez, A.T.** (2001) The biotechnological control of pitch in paper pulp manufacturing. *Trends Biotechnol.* **19 (9)**: 340-348.
- Haba, E., Abalos, A., Jáuregui, O., Espuny, M. J. i Manresa, A.** (2003) Use of liquid chromatography-mass spectroscopy for studying the composition and properties of rhamnolipids produced by different strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Surf. Det.* **6 (2)**: 155-161.
- Haba, E., Espuny, M. J., Busquets, M. i Manresa, A.** (1999) Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. *J. Appl. Microbiol.* **88**: 379-387.
- Haba, E., Espuny, M.J., Busquets, M. and 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. i Manresa, A.** (2002) Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044. *Biotech. Bioengin.* **81(3)**: 316-322.
- Hall, T. A.** (1999) Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp.* **41**: 95-98.
- Hamilton, R.J.** (1995) Waxes: Chemistry, molecular biology and functions. Editor: Hamilton R.J. The Oily Press. Dundee.
- Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166(4)**: 557-80.
- Hanahan, D., Jessee, J. i Bloom, F.R.** (1991) Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol.* **204**: 63-113.
- Hancock, R. E. W. i Woodruff, W. A.** (1988) Roles of porin and β -lactamase in intrinsic antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Infect. Dis.* **10**: 770-775.
- Handelsman, T. i Shoham, Y.** (1994) Production and characterization of an extracellular thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **40**: 435-443.
- Hängi, U.J.** (1990) Pilot scale production of PHB with *Alcaligenes latus*. En: *Novel biodegradable microbial polymers*. Dawes, E.A., (ed.), Kluwer, Dordrecht, **pp.**: 60-65.
- Hardwood, J.** (1989) The versatility of lipases for industrial uses. *TIBS* **14**: 12-126.
- Harms, M., Mackeben, S. i Müller-Goymann, C.C.** (2005) Thermotropic transition structures in the ternary system lecithin/isopropyl myristate/water *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Engin. Aspects.* **259 (1-3)**: 81-87.
- Hartree, E.F.** (1972) Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.*, **48**: 422-427.
- Hasan, F., Shah, A.A. i Hameed, A.** (2006) Industrial applications of microbial lipases. *Enz. Microbial Technol.* **39(2)**: 235-251.

- Hasan, N.M.Y., Moss, S.H. i Pouton, C.W.** (2006) Preparation of Solid Self-Micro-emulsified Lipid Systems (SMELS) for the Delivery of Hydrophobic Drugs. Jordan International pharmaceutical Conference (JIPC).
- Häuser, A. R., Kang, P. J. I Engel, J. N.** (1998) *PepA*, a secreted protein of *Pseudomonas aeruginosa*, is necessary for cytotoxicity and virulence. *Molec. Microbiol.* **27 (4)**: 807-818.
- Häussler, S., Nitz, M., Domke, T., Wray, V. i Steinmetz, I.** (1998) Purification and characterization of a cytotoxic exolipid o *Burkholderia pseudomallei*. *Infect Immun.* **66**: 1588-1593.
- Häussler, S., Rohde, M., von Neuhoff, N., Nitz, M. i Steinmetz, I.** (2003) Structural and functional cellular changes induced by *Burkholderia pseudomallei* rhamnolipid. *Infect. Immun.* **71**: 2970-2975.
- Herzenberg, L. A., Parks, D., Sahaf, B., Perez, O., Roederer, M. i Herzenberg, L.A.** (2002) The History and Future of the Fluorescence Activated Cell Sorter and Flow Cytometry: A View from Stanford *Clinic. Chem.* **48**: 1819-1827.
- Heusch, R., Bayer AG, Leverkusen** (2002) Emulsions in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA); **A9**: 297-333.
- Hoffmann, N. i Rehm, B. H. A.** (2004) Regulation of polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **237 (1)**: 1-7.
- Holland, H.L. i Weber, H.K.** (2000) Enzymatic hydroxylation reactions. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**: 547-553.
- Hollowayb, B.W., Krishnapillai, V. i Morgan, A.F.** (1979) Chromosomal genetics of *Pseudomonas*. *Microbiol. Rev.* **43(1)**: 73-102.
- Holmberg, K., Jonson, B., Kronberg, B. I Lindman, B.** (2002) Surfactants and polymers in aquos solution, *2^aEd Wiley and Sons*.
- Hommel, R.K. i Ratledge, C.** (1993) Biosynthetic mechanisms to low molecular weight surfactants and their precursor molecules. Dind de: *Biosurfactants: production and applications*. Kosaric, N (ed). New York: Marcel Dekker. **pp**: 3-65.
- Hoppe, H.G.** (1983) Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: measuraments by means of methylumbelliferyl-substrates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **11**: 299-308.
- Hou, C.T, Bagby, M.O., Plattner, R.D. i Koritala, S.** (1991) A novel compound, 7,10-dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid from oleic acid by bioconversion. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **68**: 99-101.
- Hou, C.T. i Bagby, M.O.** (1992) 10-Hydroxy-8(Z)-octadecenoic acid, and intermediate in the bioconversion of oleic acid to 7,10-dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid. *J. Ind. Microbiol.* **9**:103-107
- Hou, C.T., Kuo, T.M. i Lanser, A.C.** (2002) Value-added products through bioprocessing: new hydroxy fatty acids. *Inform.* **13**: 307-316.
- Huerta L., López-Balderas, N., Larralde, C. i Lamoyi, E.** (2006) Discriminating in vitro cell fusion from cell aggregation by flow cytometry combined with fluorescence resonance energy transfer. *J. Virol. Met.* **138 (1-2)**: 17-23.

- Huisman, G.W., Leeuwde, O., Eggink, G., Witholt, B.** (1989) Synthesis of poly-3-hydroxyalkanoates is a common feature of fluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1949-1954.
- Ishigami, Y., Gama, Y., Ishii, F., y Choi, Y.** (1993) Colloid chemical effect of polar head moieties of a rhamnolipid-type biosurfctant. *Langmuir.* **9**: 1634-1636.
- Itoh, S., Honda, H., Tomita, F. i Suzuki, T.** (1971) Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on n-paraffin. *The J. Antibiotics.* **24 (12)**: 855-859.
- Jaeger, K.E. i Eggert, T.** (2002) Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**: 390-397.
- Jaeger, K.E. i Reetz, M.T.** (1998) Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *TIBTECH* **16**: 396-403.
- Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W. i Reetz, M.T.** (1999) Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**: 315-351.
- Jaeger, K.E., Ransac, S., Dijkstra, B.W. Colson, C., Heuvel, M., Y Misset, O.** (1994) Bacterial lipases. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**: 29-63.
- Jaeger, K.E., Scheidinger, B., Rosenau, F., Werner, M., Lang, D., Dijkstra, B.W., Schimossek, K., Zonta, A. i Reetz, M.T.** (1997) Bacterial lipases for biotechnological applications. *J.Molec.Catal. B. Enzym.* **3**: 3-12.
- Jarvis, F.G. i Johnson, M.J.** (1949) A glyco-lipid by *pseudomonas aeruginosa*. *J. Am. Chem. Soc.* **71**: 4124-4126.
- Jendrossek, D., R. Handrick.** (2002) Microbial degradation of *polyhydroxyalkanoates*. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**: 403-432.
- Jesús Campos-García, J., Caro, A.D., Nájera, R., Miller-Maier, R.M., Al-Tahhan, R.A. i Soberón-Chávez, G.** (1998) The *Pseudomonas aeruginosa* rhIG Gene Encodes an NADPH-Dependent β -Ketoacyl Reductase Which Is Specifically Involved in Rhamnolipid Synthesis. *J Bacteriol.* **180**(17): 4442-4451.
- Jia, Y., Kappock, T.J., Frick, T., Sinskey, A.J., Stubbe, J.** (2000) Lipases provide a new mechanistic model for polyhydroxybutyrate (PHB) synthases: characterization of the functional residues in *Chromatium vinosum* PHB synthase. *Biochem.* **39**: 3927-3936.
- Jia, Y., Yuan, W., Wodzinska, J., Park, C., Sinskey, A.J., Stubbe, J.** (2001) Mechanistic studies on class I polyhydroxybutyrate (PHB) synthase from *Ralstonia eutropha*: classes I and III synthases share a similar catalytic mechanism. *Biochem.* **40**: 1011-1019.
- Junyapraserta, V. B., Boonmea, P., Songkrob, S., Krauelc, K. i Radesc, T.** (2007) Transdermal delivery of hydrophobic and hydrophilic local anesthetics from o/w and w/o Brij 97-based microemulsions. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* (www.cspscanada.org) **10(3)**:288-298.
- Kademi, A., Aït-Abdelkader, N., Fakhreddine, L. I Baratti, J.C.** (2000) Characterization of a new thermostable esterase from the moderate thermophilic bacterium *Bacillus circulans*. *J. Molec. Catal. B: Enzym.* **10**: 395-401.
- Kaneshiro, T., Kuo, T.M. i Nakamura, L.K.** (1999) Conversion of unsaturated fatty acids by bacteria isolated from compost. *Curr. Microbiol.* **38**: 250-255.

- Kaneshiro, T., Nakamur, L.K. i Bagby M.O.** (1995) Oleic acid transformation by selected strains of *Sphingobacterium thalpophilum* and *Bacillus cereus* from composed manure. *Current Microbiology* **31**: 62-67.
- Kanga, S. A., J. S. Bonner, C. A. Page y M. A. Mills.** (1997) Solubilization of naphthalene and methyl substituted naphthalenes from crude oil using biosurfactants. *Environ Sci. Technol.* **31**:556-561.
- Kato, T., Yamaguchi, Y., Abe, N., Uyehara, T., Namai, T., Kodama, M. i Shiobara, Y.** (1985) Structure and synthesis of unsaturated trihydroxy C₁₈ fatty acids in rice plant suffering from rice blast disease. *Tetrahedron Lett.* **26**: 2357-2360.
- Kim D Y; Rhee Y H.** (2003) Biodegradation of microbial and synthetic polyesters by fungi. *Appl. Microbial. Biotechnol.* **61 (4)**: 300-308.
- Kim, H., Gadner, H.W. i Hou, C.T.** (2000) Production of isomeric 9,10,13, (9,12,13)-trihydroxy-11E(10E)-octadecenoic acid from linoleic acid by *Pseudomonas aeruginosa* PR3. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnonology* **25**: 109-115.
- Kim, H.K., Park, S.Y., Lee, J.K. i Oh, T.K.** (1998) Gene cloning and characterization of thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* LI. *Biosc. Biotechnol. Biochem.* **62**: 66-71.
- Kim, Y.B. y Lenz, R.W.** (2001) Polyesteres from microorganims. En: *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology: Biopolyesters, Vol. 71.* Babel, W. y Steinbüchel, A. (eds), Springer, Berlin, pp.: 51-79.
- Kim, Y.B., Lenz, R.W., Fuller, R.C.** (1991) Preparation and characterization of poly(β -hydroxyalkanoates) obtained from *Pseudomonas oleovorans* grown with mixtures of 5-phenylvaleric acid and *n*-alkanoic acids. *Macromol.* **24**: 5256-5360.
- Kiska, D.L. i Gilligan, P.H.** (2003) *Pseudomonas*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington D.C., ASM Press, pp. 719-28.
- Kiu C., Syn, C. i Swarup, S.** (2000) A Scalable Protocol for the Isolation of Large-Sized Genomic DNA within an Hour from Several Bacteria. *Analytical Biochem.* **278 (1)**: 86-90.
- Klinke, S., de Roo, G., Witholt, B., Kessler, B.** (2000) Role of *phaD* in accumulation of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) in *Pseudomonas oleovorans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3705-3710.
- Knothe, G., Dunn, R.O. i Bagby, M.O.** (1995) Surface tension studies on novel allylic mono-and dihydroxy fatty compounds. A method to distinguish *erythro/threo* diastereomers *J. Am. Oil Chem Soc* **72**: 43-47.
- Köhler, T., Curty, L.K., Barja, F., Van Delden, C. I Pechère, J-C.** (2000) Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent of cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J. Bacteriol.* **182**: 5990-5996.
- Kosaric, N.** (1993) Biosurfactants: Production: Properties: Applications. *Ed. Informa Healthcare*. 1a ed. (Taylor & Francis Inc.).
- Koshino, H., Togiya, S., Yoshihara, T., Sakamura, S., Shimanuki, T., Sato, T. and Tajimi, A.** (1987) Tour fungitoxic C-18 hydroxy unsaturated fatty acids from stromata of *Epichloe thyphina*. *Tetrahedron Lett.* **28**: 73-76.
- Koshkin N. I. , Shirkévich M. G.** (1975) Manual de Física. *Editorial Mir*

- Kownatzki, R., Tummeler, B. i Doring, G.** (1987) Rhamnolipid of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum of cystic fibrosis patients. *Lancet*. **1**: 1026-1027.
- Kragelund, C., Nielsen, J. L., Thomsen, T. R. & Nielsen, P. H.** (2005). Ecophysiology of the filamentous Alphaproteobacterium *Meganema perideroedes* in activated sludge. *FEMS Microbiol. Ecol.* **54 (1)**:111-122.
- Kralova, I., Sjöblom, J.** (2009) Surfactants used in food industry: a review. *J. Dispersion Sci. Technol.* **30**: 1363-1383.
- Krishna, G. I Sheth, B.B.** (1999) A Novel Self Emulsifying Parenteral Drug Delivery System. *J. Pharm Sci. Technol.* **53(4)**: 168-176.
- Kuo, T.M., Kaneshiro, T. i Hou, C.T.** (2002) Microbial conversions of fatty acids to value-added products. *Lipids biotechnology*. (Kuo, T.M. and Gardner, H.W.) New York, Marcel Dekker, Inc. pp. 605-628.
- Kuo, T.M., Kim, H. i Hou, C.T.** (2001) Production of a novel compound, 7,10,12-trihydroxy-8(E)-octadecenoic acid from ricinoleic acid by *Pseudomonas aeruginosa* PR3. *Curr.Microbiol.* **43**: 198-203.
- Kuo, T.M., Lanser, A.C., Nakamura, L.K. i Hou, C.T.** (2000) Production of 10-Ketostearic acid and 10-Hydroxystearic acid by strains of *Sphingobacterium thalpophilum* isolated from composted manure. *Curr. Microbiol.* **40**: 105-109.
- Kuo, T.M., Menthey, L.K. i Hou, C.T.** (1998) Fatty Acid Bioconversions by *Pseudomonas aeruginosa* PR3. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **75**: 875-879.
- Kuo, T.M., Nakamura,L.N. i Lanser, A.C.** (2002) Conversion of Fatty Acids by *Bacillus sphaericus* -Like Organisms. *Current Microbiol.* **45**: 265-271.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.
- Lageveen, R.G., Huisman, G.W., Preusting, H., Ketelaar, P., Eggink, G., Witholt, B.** (1988) Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: effect of substrates on formation and composition of poly(R)-3-hydroxyalkanoates and poly(R)-3-hydroxyalkenoates. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2924-2932.
- Lang L. i Wullbrandt D.** (1999) Rhamnose lipids-biosynthesis, microbial production and application potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**:22-32.
- Lederberg J., Tatum E.L.** (1946). "Gene recombination in *E. coli*". *Nature* **158**: 558.
- Lee, S.Y.** (1996) "Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria". *Trends Biotechnol.* **14**: 431-438.
- Lee, S.Y., Choi, J.I., Wong, H.H.** (1999) Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: Mini-review . *Int. J. Biol. Macromol.* **25**: 31-36.
- Lee, S.Y., Choi, W.J., Steinbuechel, A., Choi, C.Y.** (1996) Cell recycle fed batch production of a highly unsaturated polyhydroxyalkanoate from 1,3-butanediol by *Pseudomonas* sp A33. *J. Environ. Pol. Deg.* **4**: 103-112.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M.** (1993) Principios de bioquímica. Capítulo 9. Lípidos. 2ª ed. Ediciones Omega.
- Lemoinge M** (1925) Etudes sur l'autolyse microbienne acidification par formation d'acide β -oxybutyrique. *Ann Inst. Pasteur Paris* **39**: 144.

- Lenz, R.W. i Marchessault, R.H.** (2005) Bacterial polyesters: Biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. *Biomacromol.* **6**: 1-18.
- Luengo, J.M., García, B., Sandoval, A., Navarro, G., Olivera, E.** (2003) Bioplastics from microorganisms. *Curr. Op. Microbiol.* **6**: 1-10.
- Luzier, W.D.** (1992) Materials derived from biomass/biodegradable materials. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **89**: 839-842.
- Macrae, A.R.** (1989) The versatility of lipases for industrial uses. *TIBS* **14**: 125-126.
- Madison, L.L. i Huisman, G.W.** (1999) Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* **63**: 21-53.
- Maier, M. R., i G. Soberón-Chávez.** (2000) Pseudomonas aeruginosa rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**: 625-633.
- Mainkar, A.R. i Jolly, C.I..** (2001) Formulation of natural shampoos. *Internat. J. Cosm. Sci.* **23 (1)**: 59-62.
- Malcolmson, C., Lawrence, M.J.** (1993) A comparison of the incorporation of model steroids into non-ionic micellar and microemulsion systems. *J. Pharm. Pharmacol.* **45**: 141-143.
- Manafi, M., Kneifel, W. i Bascomb, S.** (1991) Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics. *Microbiol. Rev.* **pp** 335-348.
- Martínez, A. i Soberón-Chávez, G.** (2001) Characterization of the *lipA* gene encoding the major lipase from *Pseudomonas aeruginosa* strain IGB83. *Appl Microbiol Biotechnol.* **56**: 731-735.
- Marx ,C.J. i Lidstrom, M.E.** (2002) Broad-Host-Range *cre-lox* System for Antibiotic Marker Recycling in Gram-Negative Bacteria. *BioTech.* **33**:1062-1067.
- Mata-Sandoval, J. C., Karns, J. i Torrents, A.** (2001) Effect of nutritional and environmental conditions on the production and composition of rhamnolipids by *P. aeruginosa* UG2. *Microbiol. Res.***155(4)**:249-256.
- Mata-Sandoval, J., Karns, J. i Torrents, A.** (1999) A High-performance liquid chromatography method for the characterization of rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil. *J. Chromat.* **864**: 211-220.
- Mata-Sandoval, J., Karns, J. i Torrents, A.** (2000) Effect of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG 2 on the solubilization of pesticides. *Environ.Sci. Tecghnol.* **34**: 4923-4930.
- Mata-Sandoval, J., Karns, J., y Torrents, A.** (1999) High-performance liquid chromatography method for the characterization of rhamnolipids mixture produce by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil. *J. Chromat.* **864**: 211-220.
- Mathews, C.K., van Holde, K.E.** (1996) Bioquímica. 2ª ed. *Mc Graw-Hill Interamericana.*
- Mathews, C.K., van Holde, K.E. y Ahern, K.G.** (2000) Lipids, membranes and cellular transport. In *Biochemistry*, 3rd edn. Adison Wesley Longman, Inc. **pp.** 315–324. San Francisco, CA.
- Matsufuji, M., Nakata, K. I Yoshimoto, A.** (1997) High production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* growing on ethanol. *Biotechnol. Lett.* **19**: 1213-1215.
- Matsusaki, H., Manji, S., Taguchi, K., Kato, M., Fukui, T., Doi, Y.** (1998) Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-

- hydroxyalkanoate) biosynthesis genes in *Pseudomonas* sp. strain 61-3. *J. Bacteriol.* **180**: 6459-6467.
- Mattick, J. S., Whitchurch, C. B. i Alm, R. A.** (1996) The molecular genetics of type-4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa* - a review. *Gene* **179 (1)**: 147-155.
- McNiff, B.L.** (1977) Clinical use of 10% soybean oil emulsion. *Amer. J. Hosp. Pharm.* **34**: 1080-1086.
- Mercadé, M., Espuny, M. i Manresa, A.** (1997) The use of oil substrate for biosurfactant production. *Recent. Res. Devel. in Oil Chem.* **1**: 177-185.
- Mercadé, M.E., Manresa, M. A., Robert, M., Espuny, M. J., Andrés C. i Guinea, J.** (1993) Olive oil mill effluent (OOME): New substrate for biosurfactant production. *Biores. Technol.* **43**: 1-6.
- Mercadé, M.E., Robert, M., Bosch, P., Espuny, M.J., Manresa, M.A. i Guinea, J.** (1988) New surfactant isolated from *Pseudomonas* 42A2. *Journal of American Oil Chemistry and Society* **65**: 1915-1916.
- Miller, R. M.** (1995) Biosurfactant-facilitated remediation of metal-contaminated soils. *Environ. Health Perspect.* **103(Suppl)**: 59-62.
- Mohan, P.K., Nakhla, G., and Yanful, E.K.** (2006) Biokinetics of biodegradability of surfactants under aerobic, anoxic and anaerobic conditions. *Water Res.* **40**: 533-540.
- Monteiro, S. A., Sasaki, G.L., de Souza, L.M., Meira, J.A., de Araújo J.M., Mitchell, D.A., Ramos, L.P. i Krieger, N.** (2007) Molecular and structural characterization of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* DAUPE 614. *Chem. Physics Lipids* **147**: 1-13.
- Mulligan, C.N.** (2005) Environmental applications for biosurfactants. *J. Environ Pollut.* **133**: 183-198.
- Mulligan, C.N., i Gibbs, B.F.** (1989) The economics of biosurfactants. *Dins de: Biosurfactants. Production. Properties. Applications. N. Kosaric, ed.* (N.Y: Marcel Dekker), pp: 329-373.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. i Erlich, H.** (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51**: 263-273.
- Murray, J. M., Lindsay, H. D., Munday, C. A. i Carr, A. M.** (1997) Role of *Schizosaccharomyces pombe* RecQ homolog, recombination, and checkpoint genes in UV damage tolerance. *Mol. Cell. Biol.* **17 (12)**: 6868-6875.
- Myers, M., Richmond, R.C. i Oakeshott, J.G.** (1988) On the origins of esterases. *Mol. Biol. Evol.* **5**: 113-119.
- Nankevis, R., Davis, S.S. i Day, N.H.** (1994) Studies on the intravenous pharmacokinetics of three retinoids in the rat. *Int. J. Pharm.* **101**: 249-256.
- Negre-Salvayre, A., Dagan, A. Gatt, S.I Salvayre, R.S** (1993). Use of pyrene-methyl-laurate for fluorescence-based assay for determination of lipase activity in intact living lymphoblastoid cells and for the diagnosis of acid lipase deficiency. *Biochem. J.* **294**: 885-891.

- Nicky C. Caiazza, Robert M. Q. Shanks, and G. A. O'Toole** (2005) Rhamnolipids Modulate Swarming Motility Patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **187 (21)**: 7351-7361.
- Nitschke, M., Costa, S.G., Contiero, J.** (2005) Rhamnolipid surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. *Biotechnol Prog.* **21(6)**: 1593 -600.
- Noordman, W, Ji, W., Brusseau, M. y Janssen, D.** (1998) Effects of rhamnolipids biosurfactants on removal of phenantrene from soil. *Environ. Sci. Technol.* **32**: 1806-1812.
- Noordman, W., Bruining, J., Wietzes, P., y Janssen, D.** (2000) Facilitated transport of a PAH mixture by a rhamnolipid biosurfactat in porous silica matrices. *J. Contaminant Hydrology.* **44**: 119-140.
- Nthangeni, M.B., Patterton, H.G., Van Tonder, A., Vergeer, W.P. i Litthauer, D.** (2001) Over-expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: a comparative report on *Bacillus* lipases. *Enz. Microbiol. Technol.* **28**: 705-712.
- O'Brien, C.** (1999) Sustainable production – a new paradigm for a new millennium. *Int. J. Prod. Econom.* **60-61**: 1-7.
- Ochsner, U. A., K. Koch, A. Fietcher, & J. Reiser** (1994) Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **176**: 2044-2054.
- Ochsner, U.A., Fiechter, A. i Reiser, J.** (1994b) Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlAB genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. *J. Biol. Chem.* **269(31)**: 19787-19795.
- Ochsner, U.A. i Reiser, J.** (1995) Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92(14)**: 6424-6428.
- Ochsner, U.A., Hembach, T. i Fiechter, A.** (1995b) Production of rhamnolipid biosurfactants. *Adv. Biochem. Bioeng.* **53**: 89-118.
- O'Leary, N.D., O'Connor, K. E., Ward, P., Goff, M. i Dobson, A. D. W.** (2005) Genetic Characterization of Accumulation of Polyhydroxyalkanoate from Styrene in *Pseudomonas putida* CA-3. *Appl. Environ. Microbiol.* **71(8)**: 4380-4387.
- Olivera, N., Commendatore, M., Morán, A., y Esteves, J.** (2000) Biosurfactant-enhanced degradation of residual hydrocarbons from ship bilge wastes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 70-73.
- Olvera, C., Goldberg, J.B., Sánchez i Soberón-Chávez, G.** (1999) The *Pseudomonas aeruginosa* *algC* gene product participates in rhamnolipids biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **179**: 85-90.
- Oradd, G., Lindblom, G., Fontell, K. i Ljusberg-Wahren, H.** (1995) Phase Diagram of Soybean Phosphatidylcholine-Diacylglycerol-Water Studied by X-Ray Diffraction and ³¹P_ and Pulsed Field Gradient 1H-NMR: Evidence for Reversed Micelles in the Cubic Phase. *Biophys. J.* **68**: 1856-1863.
- Padley, F.B., Gunstone, F.D. i Harwood, J.L.** (1994) Occurrence and characteristics of oils and fats. En : *The Lipid Handbook*. Editores: Gunstone, F.D., Harwood, J.L. y Padley, F.B. 2ª ed. Chapman & Hall, London, pp. 47-223

- Page, W.J.** (1992) Production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter vinelandii* UWD in beet molasses culture. *FEMS Microbiol. Rev.* **103**: 149-158.
- Palleroni, N.J.** (1984) Pseudomonadaceae. *Dins de: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. *Kreig, N.R., and Holt, J.G. (eds)*. (Baltimore: Williams & Wilkins) **pp**: 141-219.
- Panda, T. i Gowrishankar, B.S.** (2004) Production and applications of esterases *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67(2)**: 160-169.
- Parra, J.L., Pastor, J., Comelles, F., Manresa, M.A. i Bosch, M.P.** (1990) Studies of biosurfactants obtained from olive oil. *Tenside Surfact. Deterg.* **27**: 302-306.
- Patel, R.M. i Desai, A.J.** (1997) Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. *Lett. Appl. Microbiol.* **25**: 91-94.
- Peláez, M.** (2000). Caracterización de los estólidos producidos por la cepa *Pseudomonas* sp.42A2 a partir de aceites residuales. *Máster en Biología Experimental*. Universitat de Barcelona.
- Peláez, M., Orellana, C., Marqués, A., Busquets, M., Guerrero, A. i Manresa, A.** (2003) Natural estolides produced by *Pseudomonas* sp. 42A2 grown on oleic acid: Production and characterization. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **80(9)**: 859-866.
- Pham, T. H., Webb, J. S. i Rehm, B. H. A.** (2004) The role of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* in rhamnolipid and alginate production as well as stress tolerance and biofilm formation. *Microbiol.* **150**: 3405-3413.
- Poirier, Y.** (2002) Polyhydroxyalkanoate synthesis in plants as a tool for biotechnology and basic studies of lipid metabolism. *Prog. Lipid Res.* **41**: 131-155.
- Poirier, Y., Nawrath, C., Somerville, C.** (1995) Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers, in bacterial and plant. *Biotechnol.* **13**: 142-150.
- Poutanen, K.** (1997). Enzymes: an important tool in the improvement of quality of cereal foods. *Trends Food Sci. Technol.* **8**: 300-306.
- Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A.** (1999) Microbiology. Capítulo 40. Microorganisms as Components of Ecosystems. 4^a ed. Ed. Mc. Graw Hill.
- Prieto, L.M., Michelon, M., Burkert, J. F. M., Kalil S. J. i Burkert, C. A. V.** (2008) The production of rhamnolipid by a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a southern coastal zone in Brazil **71 (9)**: 1781-1785.
- Prieto, M.A., Buhler, B., Jung, K., Witholt, B., Kessler, B.** (1999) PhaF, a polyhydroxyalkanoate-granule-associated-protein of *Pseudomonas oleovorans* GPo1 involved in the regulatory expression system for *pha* genes. *J. Bacteriol.* **181**: 858-868.
- Prim, N., Blanco, A., Martínez, J., Pastor, F.I.J. i Diaz, P.** (2000) *estA*, a gene coding for a cell-bound esterase from *Paenibacillus* sp. BP-23, is a new member of the bacterial subclass of type B carboxylesterases. *Res. Microbiol.* **151 (4)**: 303-312.
- Prim, N., Bofill, C., Pastor, F.I. i Diaz, P.** (2006) Esterase EstA6 from *Pseudomonas* sp. CR-611 is a novel member in the utmost conserved cluster of family VI bacterial lipolytic enzymes. *Biochimie.* **88(7)**: 859-67.

- Prim, N., Sánchez, M. Ruiz, C., Pastor, F. I. J. i Diaz, P.** (2003) Use of methylumbeliferyl-derivative substrates for lipase activity characterization. *J. Molec. Catalysis B: Enzym.* **22 (5-6)**: 339-346.
- Qinhong Wang, Xiangdong Fang, Baojun Bai, Xiaolin Liang, Patrick J. Shuler, William A. Goddard III, Yongchun Tang** (2007) Engineering Bacteria for Production of Rhamnolipid as an Agent for Enhanced Oil Recovery. *Biotechnol. Bioengin.* **98(4)**: 842-853.
- Quénéé L, Lamotte D i Polack B.** (2005) Combined sacB-based negative selection and cre-lox antibiotic marker recycling for efficient gene deletion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotech.* **38**: 63-67.
- Rahim, R., Burrows, LL., Monteiro, M.A., Perry, M.B. i Lam J.S.** (2000) Involvement of the rml locus in core oligosaccharide and O polysaccharide assembly in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol.* **146(Pt 11)**: 2803-2814.
- Reetz, M.T.** (2002). Lipases as practical biocatalysts. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6**: 145-150.
- Rehm, B. H. A., Mitsky, T. A. i Steinbüchel, A.** (2001) Role of Fatty Acid De Novo Biosynthesis in Polyhydroxyalkanoic Acid (PHA) and Rhamnolipid Synthesis by Pseudomonads: Establishment of the Transacylase (PhaG)-Mediated Pathway for PHA Biosynthesis in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67(7)**: 3102-3109.
- Rehm, B.H.A.** (2003) Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochem. J.* **376**: 15-33.
- Rehm, B.H.A. i Steinbüchel, A.** (1999) Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. *Int. J. Biol. Macromol.* **25**: 3-19.
- Rehm, B.H.A., Krüger, N., Steinbüchel, A.** (1998) A new metabolic link between fatty acid de novo synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis—the *phaG* gene from *Pseudomonas putida* KT2440 encodes a 3-hydroxyacyl-acyl carrier protein coenzyme A transferase. *J. Biol. Chem.* **273**: 24044-24051.
- Rehm, B.H.A., Qi, Q., Beermann, Br.B., Hinz, H.J., Steinbüchel, A.** (2001b) Matrix-assisted in vitro refolding of *Pseudomonas aeruginosa* class II polyhydroxyalkanoate synthase from inclusion bodies produced in recombinant *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **358**: 263-268.
- Reiling HE, Thanei-Wyss U, Guerra-Santos LH, Hirt R, Käppeli O, Fiechter A.** (1986) Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 985-989.
- Reynolds, E.S.** (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Bio.*, **17**:208-212.
- Rivas, H. i Gutiérrez, X.** (1999) Los surfactantes: comportamiento y algunas de sus aplicaciones en la industria petrolera. *Acta Científica Venezolana*, **50 (1)**: 54-65.
- Robert, M.** (1989) Aislamiento y selección de microorganismos productores de tensioactivos. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona.
- Robert, M. Mercadé, M. E., Bosch, P., Parra, J.L., Espuny, M.J., Manresa, A. I Guinea, J.** (1989) Effect of carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T. *Biotechnol. Lett.* **11**: 871-874.
- Roberts D.W.,** (2000) Aquatic toxicity—Are surfactant properties relevant? *J. Surfactants Detergents*, **3(3)**: 309-315.

- Robins, M.M., Watson, A.D., Wilde, P.J.** (2002) Emulsions-creaming and rheology. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **7(5-6)**: 419-442.
- Rodríguez Carmona, E.** (2006) Aplicación de la metodología de superficies de respuesta en matraces y estrategias de producción en biorreactor para la obtención de biomasa y polihidroxicanoatos por *Pseudomonas aeruginosa* 42A2. Tesis doctoral. Universitat de Barcelona.
- Rodríguez, E.; Espuny, M.J.; Manresa, A.; Guerrero, A.** (2001) Identification of (E)-11-hydroxy-9-octadecenoic acid and (E)-9-hydroxy-10-octadecenoic acid by biotransformation of a waste oil with *Pseudomonas* sp32T3. *J. Amer. Oil Chem. Soc. (JAOCS)* **(78), 6**: 593-597.
- Rogel, A.M., Stone, W.L. i Adenbojono, F.O.** (1989) A novel spectrophotometric assay for lipase activity using cis-parinaric acid. *Lipids* **24**: 518-524.
- Römling, U., Fiedler, B., Boßhammer, J., Grothues, D., Greipel, J., von der Hardt, H. & Tümmler, B.** (1994) Epidemiology of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *J. Infect. Dis.* **170**, 1616-1621.
- Ron, E.Z. i Rosenberg, E.** (2001) Natural roles of biosurfactants. *Environ. Microbiol.* **3(4)**: 229-236.
- Rosen, M.** (1974) Relationship of structure to properties in surfactants. II, Efficiency in surfaces or interfacial tension reduction. *J. Am. Oil Chem. Soc* **51**: 461-465.
- Rosen, M.** (2004) Surfactants and Interfacial Phenomena. Wiley y Sons, ed. (Wiley Interscience: New York) (3a edició , Original 1989).
- Rosen, M.J.** (2003) Micelle formation by surfactants. Dins de: *Surfactants and interfacial phenomena*. John Wiley and Sons 3 Ed. **pp.**: 105-154.
- Rosenberg, E. i Ron, E.Z.** (1999) High- and low-molecularmass microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 154-162.
- Ruiz, C., Pastor, F.I.J. i Diaz, P.** (2004) Isolation of lipid- and polysaccharide-degrading micro-organisms from subtropical forest soil, and analysis of lipolytic strain *Bacillus* sp. CR-179. *Lett. Appl. Microbiol.* **40 (3)**: 218 - 227.
- Sadurní, N.** (2006) Estudi de la formació de nano-emulsions de fase externa aquosa i solubilització de fàrmacs lipòfils. Universitat de Barcelona.
- Sadurní, N., Solans, C., Azemar, N., García-Celma, M.J.** (2005) Studies on the formation of O/W nano-emulsions, by low-energy emulsification methods, suitable for pharmaceutical applications. *Europ. J. Pharm. Sci.* **26(5)**: 438-445.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. i Maniatis, T.** (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. *2nd edn Cold Spring Harbor Laboratory Press* New York : Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sanger, F., Nicklen, S. i Coulson, A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceed. Nat. Acad. Sci. USA.* **74**: 5463-5467.
- Santos-Magalhaes, N.S., Pontes, A. I Pereire, V-M.W.** (2000) Colloidal carriers for benzathine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. *Int. J. Pharm.* **208**: 71-80.
- Schaeffer T. L., Cantwell, S. G., Brown, J. L., Watt, D. S. & Fall, R. R.** (1979) Microbial growth on hydrocarbons: terminal branching inhibits biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**: 742-746.

- Schenk T, Schuphan I, Schmidt B.** (1995) High-performance liquid chromatographic determination of the rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Chromatogr. A*. **693**: 7–13.
- Schmid, R. i Verger, O.** (1998) Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**: 1608-1633.
- Schroepfer, G.J.** (1966) Stereospecific conversion of oleic acid to 10-hydroxystearic acid. *J. Biol. Chem.* **241**: 5441-5447.
- Schubert, P., Steinbüchel, A., Schlegel, H.G.** (1988) Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* genes for synthesis of poly- β -hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**: 5837-5847.
- Serafim, L. S., Lemos, P.C., Levantesi, C., Tandoi, P., Santos, H. i Reis, M. A. M.** (2002) Methods for detection and visualization of intracellular polymers stored by polyphosphate-accumulating microorganisms. *J. Microbiol. Met.* **51 (1)**: 1-18.
- Shennan, J., Levi, J.** (1987) In situ microbial enhanced oil recovery. En *Biosurfactants and Biotechnology*, Kosaric, N., Cairns, W.L., y Gray, N.C.C. eds. (N.Y.: Marcel Dekker), **pp.** 163-181.
- Shimamura, E. i Kasuya, K.** (1994) Physical properties and biodegradability of microbial poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Macromol.* **27**: 878-880.
- Shreve, B. R., Moore, P. A., Daniel, T. C. i Edwards, D. R.** (1995) Reduction of phosphorus in runoff from fieldapplied poultry litter using chemical amendments. *J. Environ. Qual.* **24**: 106–111.
- Sim, L., Ward, O. P. i Li, Z-Y** (1997) Production and characterisation of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* **9 (4)**: 232-238.
- Singh, A., Singh et al., 2007an Hamme, J.D. i Ward, O.P.** (2007) Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotech. Advances.* **25**: 99-121.
- Slater, S.C., Voige, W.H., Dennis, D.E.** (1988) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly- β -hydroxybutyrate biosynthetic pathway. *J. Bacteriol.* **170**: 4431-4436.
- Smet, M.J., Eggink, G., Witholt, B., Kingma, J., Wynberg, H.** (1983) Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane. *J. Bacteriol.* **154**: 870-878.
- Smith, A.W. i Iglewski, B.H.** (1989) Transformation of *Pseudomonas aeruginosa* by electroporation. *Nucl. Acids. Res.* **17**: 10.509.
- Soberón-Chávez G. i B Palmeros.** (1994) *Pseudomonas* lipases: Molecular genetics and potential industrial applications. *Critical Rev. Microbiol.* **20**: 95-105.
- Soberón-Chávez, G.** (2004) Biosynthesis of rhamnolipids. *Dins de: Ramos J-L (Ed) Pseudomonas. Biosynthesis of macromolecules and molecular metabolism.* Kluwer/Plenum, New York **pp**: 173-189.
- Soberon-Chávez, G., Aguirre-Ramírez, M., Sánchez, R.** (2005) The *Pseudomonas aeruginosa* RhlA enzyme is involved in rhamnolipid and polyhydroxyalkanoate production. *Ind. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 675-677.

- Soberon-Chávez, G., Lépine i F., Déziel, E.** (2005b) Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **68**: 718-725.
- Solaiman, D. K. Y.** (1998) Genetic transformation of *Pseudomonas oleovorans* by electroporation. *Biotechnology Techniques.* **12**: 829-832.
- Solans, C., Esquena, J., Azemar, N. i García-Celma, M.J.** (2001) Sistemas tensioactivos coloidales: microemulsiones y sus aplicaciones como medios de solubilización y reacción. *Química e Industria* **522**: 423-430.
- Solsona, T.** (2001) Estudi i aplicacions de fosfines ambifíliques en catàlisis i radiofarmàcia. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Song, J. J., Yoon, S. C., Yu, S. M. i Lenz, R. W.** (1998) Differential scanning calorimetric study of poly(3-hydroxyoctanoate) inclusions in bacterial cells. *International J. Biol. Macromol.* **23**: 165-173.
- Spiekermann, P. , Rehm, B., Kalschever, R., Banmeister, D., Steinbüchel, A.** (1999) A sensitive, viable-colony screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. *Arch. Microbiol.* **171**: 73-80.
- Spiekermann, P., Rehm, B. H. A., Kalscheuer, R., Baumeister, D. i Steinbüchel, A.** (1999) A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. *Arch. Microbiol.* **171 (2)**: 73-80.
- Spiers, A.J., Buckling, A. i Rainey, P.B.** (2000) The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiol.* **146**: 2345-2350.
- Spurr, A.R.** (1969) A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy, *J. Ultrastuct. Res.* **26**: 31-43.
- Stainer, R. Y., Palleroni, N. J. i Duodoroff, M.** (1966) The aerobic *Pseudomonas*: a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* **43**: 159-271.
- Steinbüchel, A.** (1991) Polyhydroxyalkanoic acids. Dins de: *Biomaterials: novel materials from biological sources*. Byrom, D. (ed.), Stockton Press, New York, **pp.**: 124-213.
- Steinbüchel, A. i Hein, S.** (2001) Biochemical and molecular basis of synthesis of polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **71**: 81-123.
- Steinbüchel, A. i Valentin, H.E.** (1995) Diversity of bacterial poly-hydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiol. Lett.* **128**: 219-228.
- Steinbüchel, A., Lütke-Eversloh, T.** (2003) Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochem. Engin. J.* **16**: 81-96.
- Stodola, F.H., Vesonder, R.F. i Wickerham, L.J.** (1965) 11-hydroxy-*trans*-8-dodecenoic acid lactone, a 12 membered-ring compound from a Fungus *Biochem.* **4**: 1390-1394.
- Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock RE, Lory S, Olson MV.** (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature.* **406(6799)**: 959-964.

- Sudesh, K., Gan, Z., Maehara, A. i Doi, Y.** (2002) Surface structure, morphology and stability of polyhydroxyalkanoate inclusions characterised by atomic force microscopy. *Polym. Degrad. Stabil.* **77 (1)**: 77-85.
- Sudesh, K., Tay, B. Y. i Lee, C. Y.** (2008) Occurrence of poly (hydroxyalkanoate) in the gut homogenate of a phylogenetically higher termite: *Macrotermes carbonarius* *Can. J. Chem.* **86**: 512-515.
- Sugihara, A., Shimada, Y., Nomura, A., Terai, T., Imatasu, M., Nagai, Y., Nagao, T., Watanabe, Y., i Tominaga, Y.** (2002) Purification and Characterization of a Novel Cholesterol Esterase from *Pseudomonas aeruginosa*, with Its Application to Cleaning Lipid-stained Contact Lenses. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**: 2347-2355.
- Sullivan D, Coleman D** (1998) *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 329-334.
- Suriyamongkol P, Weselake R, Narine S, Moloney M, and Shah S.** (2007) Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants - a review. *Biotechnol. Adv.* **25(2)**: 148-75.
- Syldatk, C. i Wagner, F.** (1987) Production of biosurfactants. Dins de: *Biosurfactants and biotechnology*. Koraric N, Cairns WL, Gray NCC eds. (New York: Marcel Dekker), pp: 89-120.
- Syldatk, C., Lang, S., i Wagner, F.** (1985) Chemical and physical characterization of four interfacial-active rhamnolipids from *Pseudomonas* sp DSM 2874. *Z. Naturforsch.* **40c**, 51-60.
- Syldatk, C., Lang, S., Matulovic, V. i Wagner, F.** (1985b) Production of four interfacial active rhamnolipids from n-alkanes or glycerol by resting cells of *Pseudomonas* species DSM 2847. *Z. Naturforsch.* **40c**: 61-67.
- Taguchi, S., Maehara, A., Takase, K., Nakahara, M., Nakamura, A., Doi, Y.** (2001) Analysis of mutational effects of a polyhydroxybutyrate (PHB) polymerase on bacterial PHB accumulation using an in vivo assay system. *FEMS Microbiol. Lett.* **198**: 65-71.
- Tahzibi, A., Kamal, F. i Assadi, M. M.** (2004) Improved Production of Rhamnolipids by a *Pseudomonas aeruginosa* Mutant. *Iran. Biomed. J.* **8 (1)**: 25-31.
- Tan, I.K.P., Sudesh, K.K., Theanmalar, M., Gan, S.N., Gordon, B.** (1997) Saponified palm kernel oil and its major free fatty acids as carbon substrates for the production of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* PGA1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**: 207-211.
- Timm, A i Steinbüchel, A** (1992) Cloning and molecular analysis of the poly (3-hydroxyalkanoic acid) gene locus of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Euro. J. Biochem.* **209**: 15-30.
- Timm, A. i Steinbüchel, A.** (1990) Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3360-3367.
- Timm, A., Wiese, S. i Steinbüchel, A.** (1994) A general method for identification of polyhydroxyalkanoic acid synthase genes from pseudomonads belonging to the rRNA homology group I. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 669-675.
- Tindall KR i Kunkel TA** (1988). "Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase". *Biochem.* **27**: 6008-13.

- Tokiwa, Y. i Calabria, B.P.** (2004) Degradation of microbial polyesters. *Biotechnol. Lett.* **26**: 1189-1189.
- Tuleva, B.K., Ivanov, G.R. y N. Christova.** (2002) Biosurfactant production by a new *Pseudomonas putida* strain. *Z. Naturforsch.* **57**: 356-360.
- Ubbink, J. i Schär-Zammaretti, P.** (2005) Probing bacterial interactions: integrated approaches combining atomic force microscopy, electron microscopy and biophysical techniques *Micron.* **36**: 293-320.
- Valentin, H.E., Mitsky, T.A., Mahadeo, D.A., Tran, M., Gruys, K.J.** (2000) Application of a propionyl coenzyme A synthetase for poly(3-hydroxypropionate-co-3-hydroxybutyrate) accumulation in recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 5253-5258.
- Valentin, H.E.S., Reiser, S. i Gruys, K.J.** (2000b) Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) formation from γ -aminobutyrate and glutamate. *Biotech. Bioengin.* **67**: 291-299.
- Van Dyke, M. I., P. Couture, M. Brauer, H. Lee y T. J. Trevors.** (1993) *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactant: structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. *Can. J. Microbiol.* **39**:1071-1078.
- Van Hamme, J. D., A. Singh y O. P. Ward.** (2003) Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**:503-549.
- Verger, R.** (1997) Interfacial activation of lipases: Facts and artefacts. *TIB TECH.* **15**: 32-38.
- Vidal-Mas, J., Resina-Pelfort, O., Haba, E., Comas, J., Manresa, A. i Vives-Rego, J.** (2001) Rapid flow cytometry – Nile red assessment of PHA cellular content and heterogeneity in cultures of *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 (NCIB 40044) grown in waste frying oil. *Antonie Leeuwenhoek.* **80(1)**: 57-63.
- Villeneuve, P., Muderhwa, J.M. Graille, J. i Haas, M.J.** (2000) Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *J. Molec. Catal. B: Enzym.* **9**: 113-148.
- Vrionis, H. A., Daugulis, A. J. i Kropinski, A. M.** (2002) Identification and characterization of the AgmR regulator of *Pseudomonas putida* : role in alcohol utilization. *Appl. Microbiol. Biotech.* **58 (4)**: 469-475.
- Wahaba, A.A., Kermashaa, S., Bisakowskia, B. i Morin, A.** (1999) Characterization of partially purified extracellular lipase fractions from *Pseudomonas fragi* CRDA 037. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **76(11)**: 1301-1308.
- Wallen, L.L. i Rohwedder, W.K.** (1974) Poly- β -hydroxyalkanoate from activated sludge. *Environ. Science Technol.* **8**: 576-579.
- Wallen, L.L., Benedict, R.G. i Jackson, R.W.** (1962) The microbial production of 10-hydroxystearic acid. *Arch.Biochem. Biophys.* **99** 549-553.
- Wang, C.S. i Hartsuck, J.A.** (1993) Bile salt-activated lipase. A multiple function lipolytic enzyme. *Biochim. Biophys. Acta*, **1166**: 1-19.
- Wang, J.G. i Bakken, L.R.** (1998) Screening of soil bacteria for poly- β -hydroxybutyric acid production and its role in the survival of starvation. *Microbiol. Ecol.* **35**: 94-101.

- Wang, P., Coram, M., Tang, H., Fitzgibbon, M. P., Zhang, H., Yi, E., Aebbersold, R. i Mcintosh, M.** (2007) A statistical method for chromatographic alignment of LC-MS data. *Biostatistics* **8 (2)**: 357-367.
- Warner-Bartnicki't, A.L. i Miller, R. V.** (1992) Characterization of Stress-Responsive Behavior in *Pseudomonas aeruginosa* PAO: Isolation of Tn3-lacZYA Fusions with Novel Damage-Inducible (din) Promoters. *J. Bacteriol.* **174 (6)**: 1862-1868.
- West, S. E. i Iglewski, B. H.** (1988) Codon usage in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Res.* **16(19)**: 9323-9335.
- Wilhelm, S., Rosenau, F., Becker, S., Buest, S., Hausmann, S., Kolmar, H. i Jaeger, K.E.** (2007) Functional cell-surface display of a lipase-specific chaperone. *Chem. Biochem* **8**: 55-60.
- Wilhelm, S., Tommassen, J. & Jaeger, K. E.** (1999) A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* **181**: 6977-6986.
- Williams, S.F., D.P. Martin, D.M. Horowitz I O.P. Peoples** (1999) PHA applications: addressing the prices performance issue I. Tissue engineering. *International J. Biol. Macromol.* **25**: 111-121.
- Willumsen, P. A., U. Karlson y P. H. Prichard.** (1998) Response of fluoranthene-degrading bacteria to surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**:475-483.
- Witholt, B. i Kessler, B.** (1999) Perspectives of medium chain length poly-(hydroxyalkanoates), a versatile set of bacterial bioplastics. *Curr. Op. Biotechnol.* **10**: 279-285.
- Wohlfarth, S., Hoesche, C., Strunk, C. i Winkler, U.K.** (1992) Molecular genetics of the extracellular lipase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Gen. Microbiol.* **138(7)**: 1325-1335.
- Wollett, L.A., Beitz, D.C., Hood, R.L. i Aprahamian, S.** (1984) An enzymatic assay for activity of lipoprotein lipase in serum. *Anal. Biochem.* **143**: 25-29.
- Wu, H., Ramachandran, C., Weiner, N.D. i Roessler, B.J.** (2001) Topical transport of hydrophilic compounds using water-in-oil nanoemulsions. *Inter. J. Pharm.* **220 (1-2)**: 63-75.
- Yakimov, M., Timmis, K., Wray, V., Fredrickson, H.** (1995) Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1706-1713.
- Yamane, T., Fukunaga, M., Lee, Y.W.** (1996) Increased PHB productivity by high-cell-density fed-batch culture of *Alcaligenes latus*, a growth-associated PHB producer. *Biotechnol. Bioeng.* **50**: 197-202.
- Yeagle, P.L.** (1985) Cholesterol and the cell membrane. *Biochem. Biophys. Acta.* **822**: 267-287.
- Zajic, J. i Seffens, W.** (1984) Biosurfactants. *Crit Rev Biotechnol* **12**: 87-107.
- Zhang, J. i Miller, R.** (1992) Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas rhamnolipid* surfactant (biosurfactant). *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2101-2106.
- Zhang, Y. M. i R. M. Miller.** (1994) Effect of a *Pseudomonas rhamnolipid* biosurfactant on cell hydrophobicity and bid biod biodegradation of octadecane. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:2101-2106.

Zhang, Y., W. J. Walter, J. Maier y R. M. Miller. (1997) Effect of rhamnolipids on the dissolution, bioavailability, and biodegradation of phenanthrene. *Environ. Sci. Technol.* **31**:2211-2217.

Zock, J., Cantwell, C., Swartling, J., Hodges, R., Pohl, t., Sutton, K., Rosteck, P., McGilvray, D. i Queener, S. (1994) The *Bacillus subtilis pnbA* gene encoding *p*-nitrobenzyl esterase: cloning, sequence and high-level expression in *Escherichia coli*. *Gene.* **151**: 37-43.

Patent No. 7,262,171 Use of Rhamnolipids in Wound Healing, Treating Burn Shock, and Cosmetics, E.E.U.U.; **Application No. 07075613.5** Use of Rhamnolipids in Wound Healing, Treating Burn Shock, and Cosmetics, U.E. *Aurora Advanced Beauty Labs, Inc.*

<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>

http://www.seimc.org/control/revi_Bacte/psaeru.htm

7. ANNEX

7. ANNEX

Detecció i identificació dels Rhls mitjançant la caracterització per HPLC(EM) (Apartat 4.3.2.1 de Resultats i discussió)

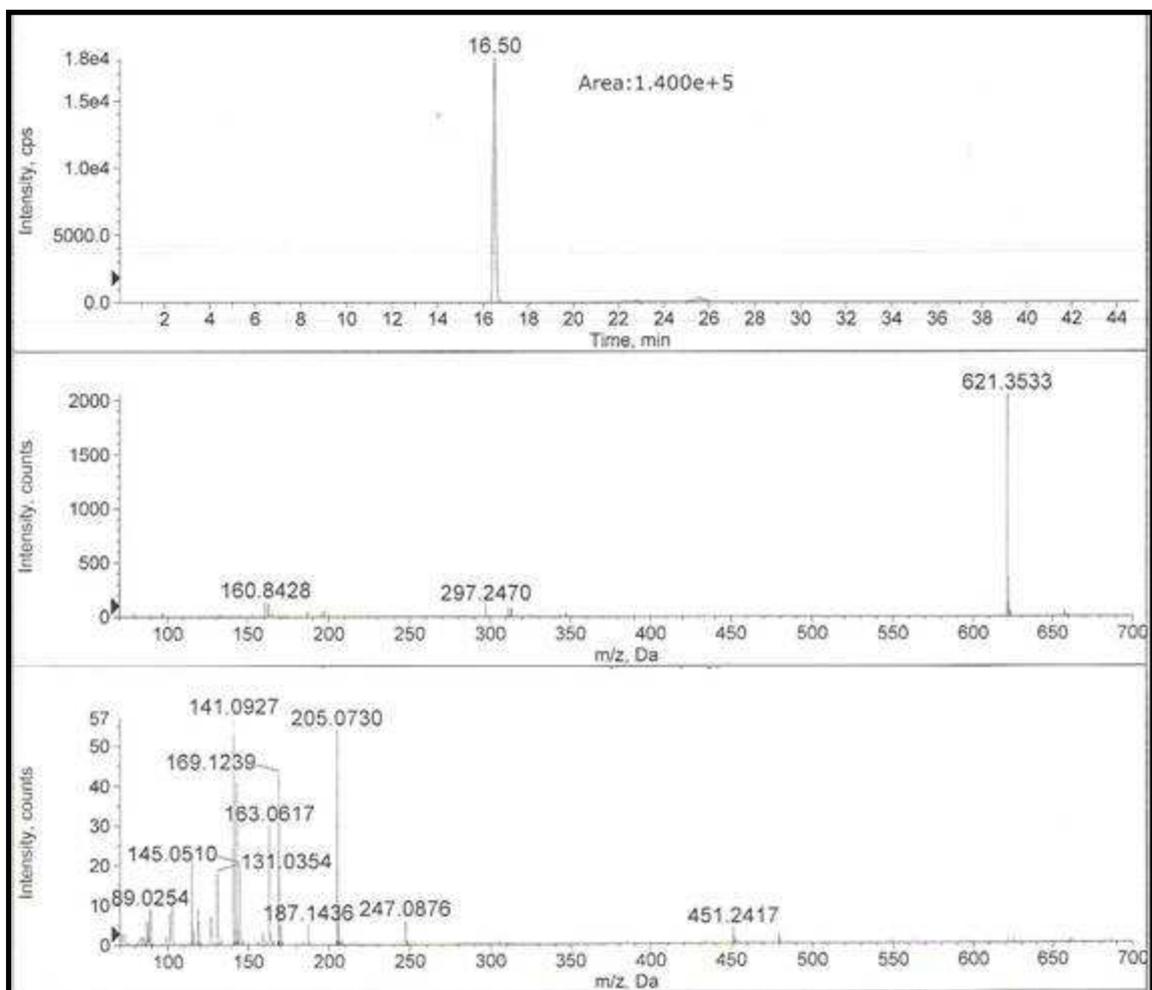


Figura A.1. XIC i TOF dels di-Rhls $R_2-C_8-C_{10}$ i $R_2-C_{10}-C_8$ amb iò pseudomolecular de massa molecular 621 m/z. Les fragmentacions més freqüents en m/z són 451, 311, 169, 141 pel Rhl $R_2-C_8-C_{10}$ 479, 311, 169, 141 pel $R_2-C_{10}-C_8$. Tots dos Rhls són presents a la barreja perquè es detecta tant 451 m/z com 479 m/z.

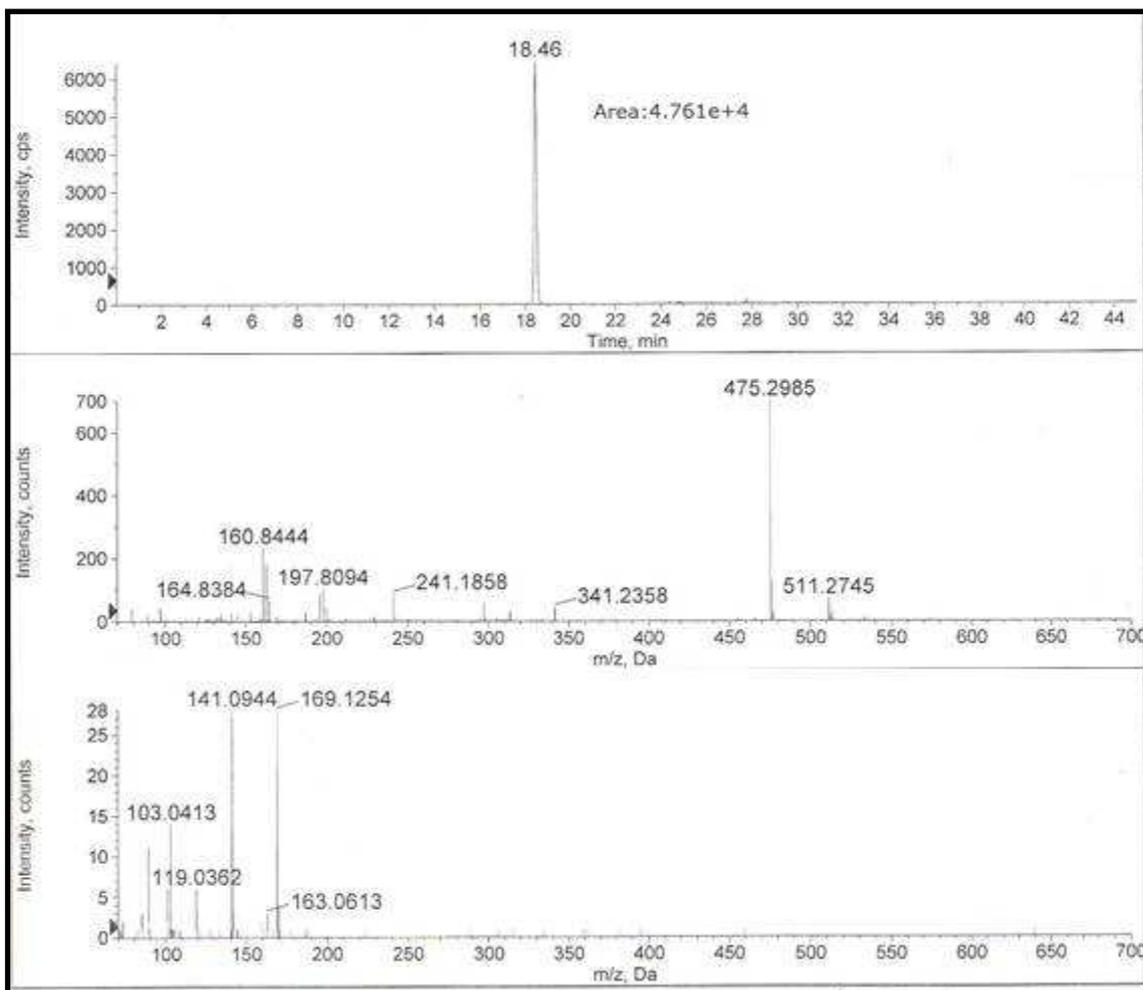


Figura A.2. Figura 7.1. XIC i TOF dels mono-RhIs R-C₈-C₁₀ i R-C₁₀-C₈ amb iò pseudomolecular de massa molecular 475 m/z. Les fragmentacions més freqüents en m/z són 311, 305, 169, 141 pel Rhl R-C₈-C₁₀ 333, 311, 169, 141 pel R-C₁₀-C₈. Els fragment més grans que diferencien entre un i l'altre Rhl no es detecten per la força d'impacte, així no es pot diferenciar quin des dos és present o si estan tots dos a la barreja.

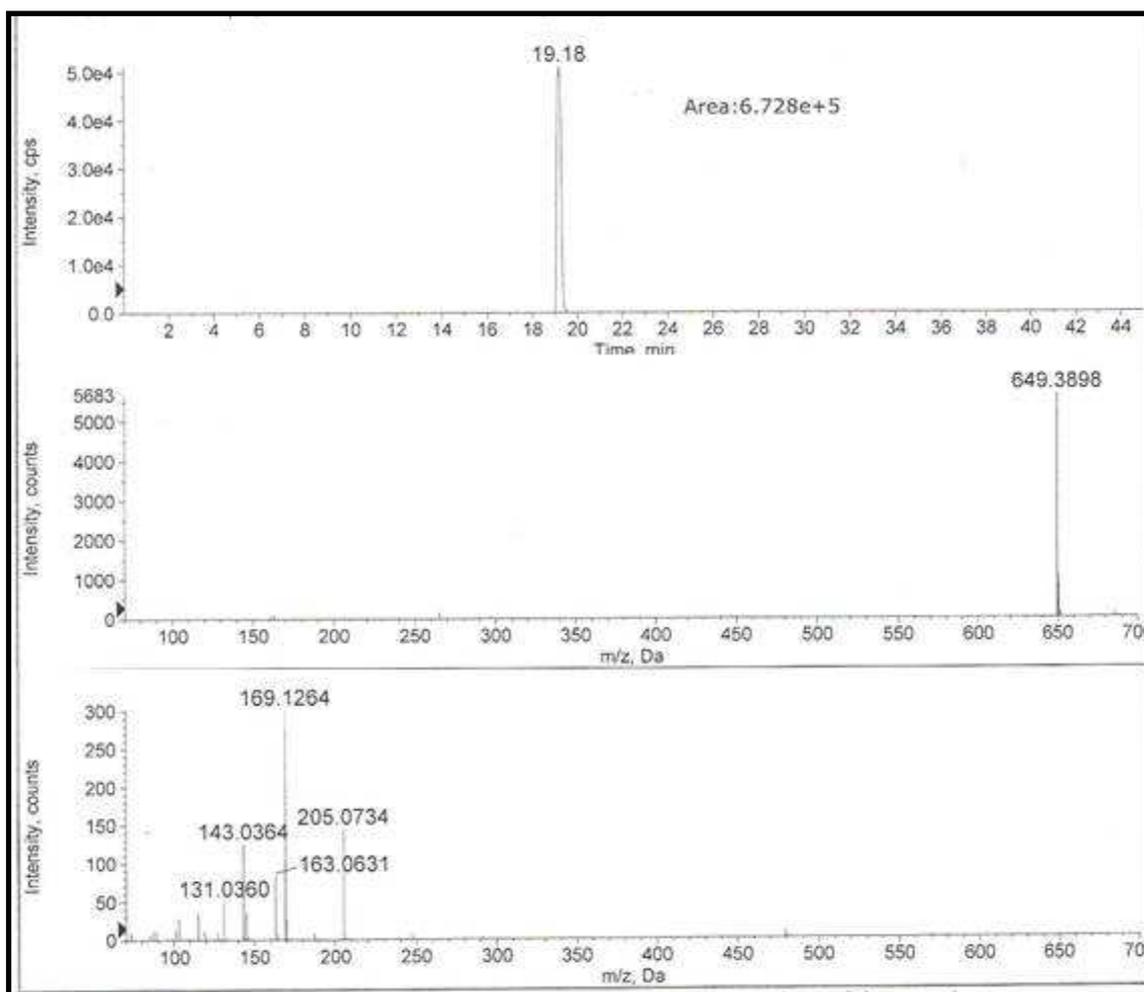


Figura A.3. XIC i TOF del di-Rhl R₂-C₁₀-C₁₀ amb iò pseudomolecular de massa molecular 649 m/z. Les fragmentacions més freqüents en m/z són 479, 339, 169.

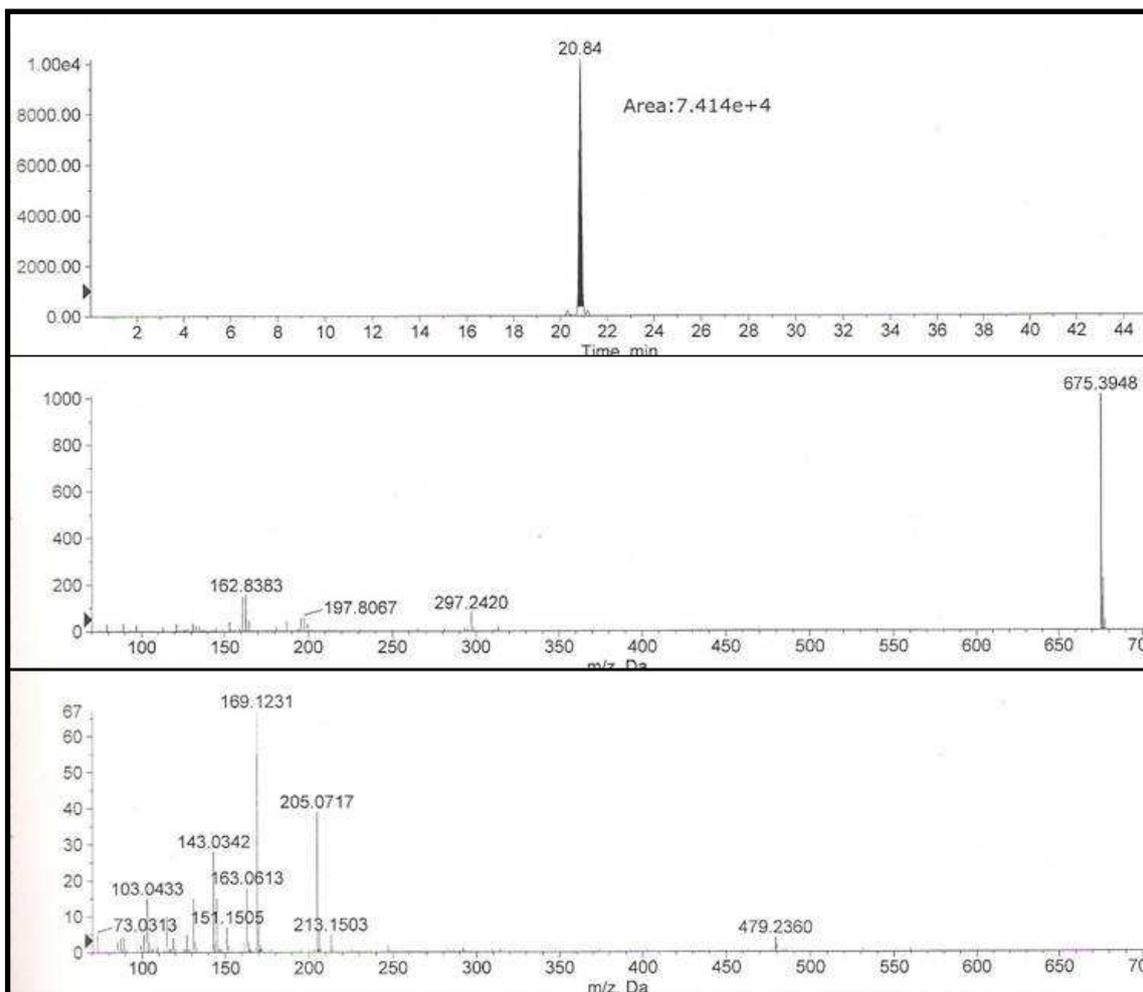


Figura A.4. XIC i TOF dels di-RhIs $R_2-C_{10}-C_{12:1}$ i $R_2-C_{12:1}-C_{10}$ amb iò pseudomolecular de massa molecular 675 m/z. Les fragmentacions més freqüents en m/z són 479, 365, 195, 169 pel Rhl $R_2-C_{10}-C_{12:1}$ i 505, 365, 195, 169 pel $R_2-C_{12:1}-C_{10}$. Dels fragment més grans que diferencien entre un i l'altre Rhl només es detecta el de m/z 479, així només podem afirmar que l'homòleg $R_2-C_{10}-C_{12:1}$ és present a la barreja, però caldria repetir l'anàlisi disminuint la força d'impacte per detectar els fragments més grans.

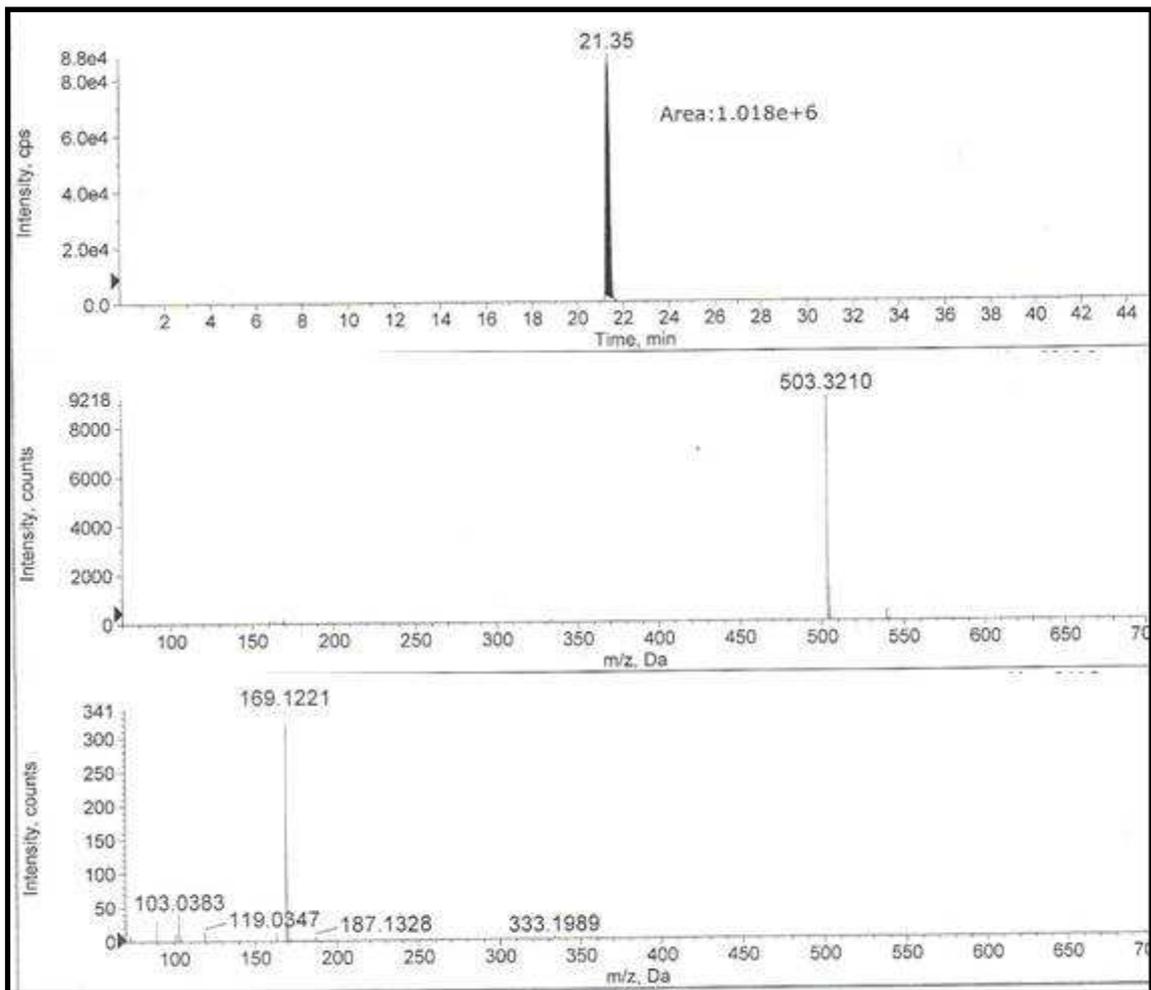


Figura A.5. XIC i TOF del mono-Rhl R-C₁₀-C₁₀ amb iò pseudomolecular de massa molecular 503 m/z. Les fragmentacions més freqüents en m/z són 339, 333, 169.

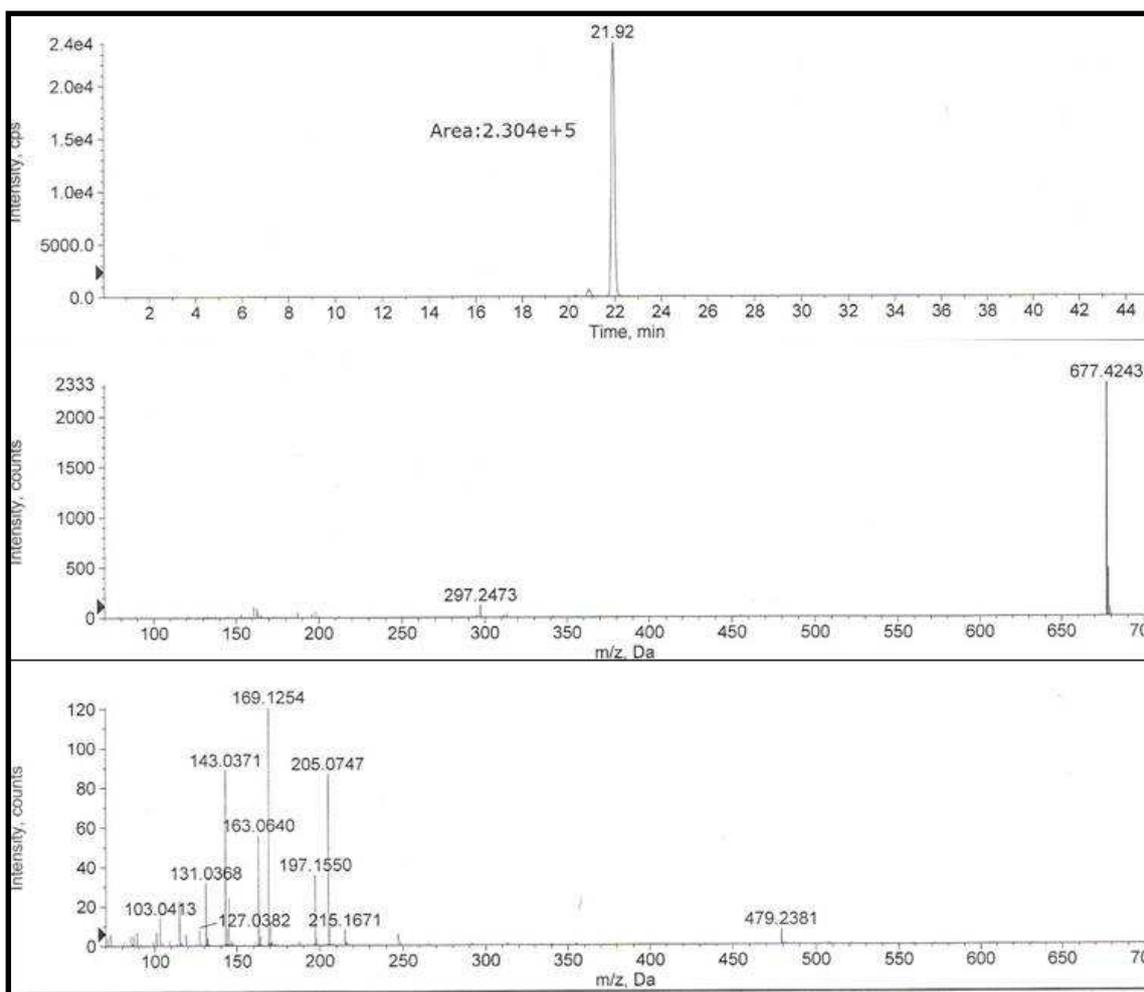


Figura A.6. XIC i TOF dels di-Rhls $R_2-C_{10}-C_{12}$ i $R_2-C_{12}-C_{12}$ amb iò pseudomolecular de massa molecular 677 m/z. Les fragmentacions més freqüents en m/z són 479, 367, 197, 169 pel Rhl $R_2-C_{10}-C_{12}$ i 507, 367, 197, 169 pel $R_2-C_{12}-C_{10}$. Dels fragment més grans que diferencien entre un i l'altre Rhl només es detecta el de m/z 479, així només podem afirmar que l'homòleg $R_2-C_{10}-C_{12}$ és present a la barreja però caldria repetir l'anàlisi disminuint la força d'impacte per detectar els fragments més grans.

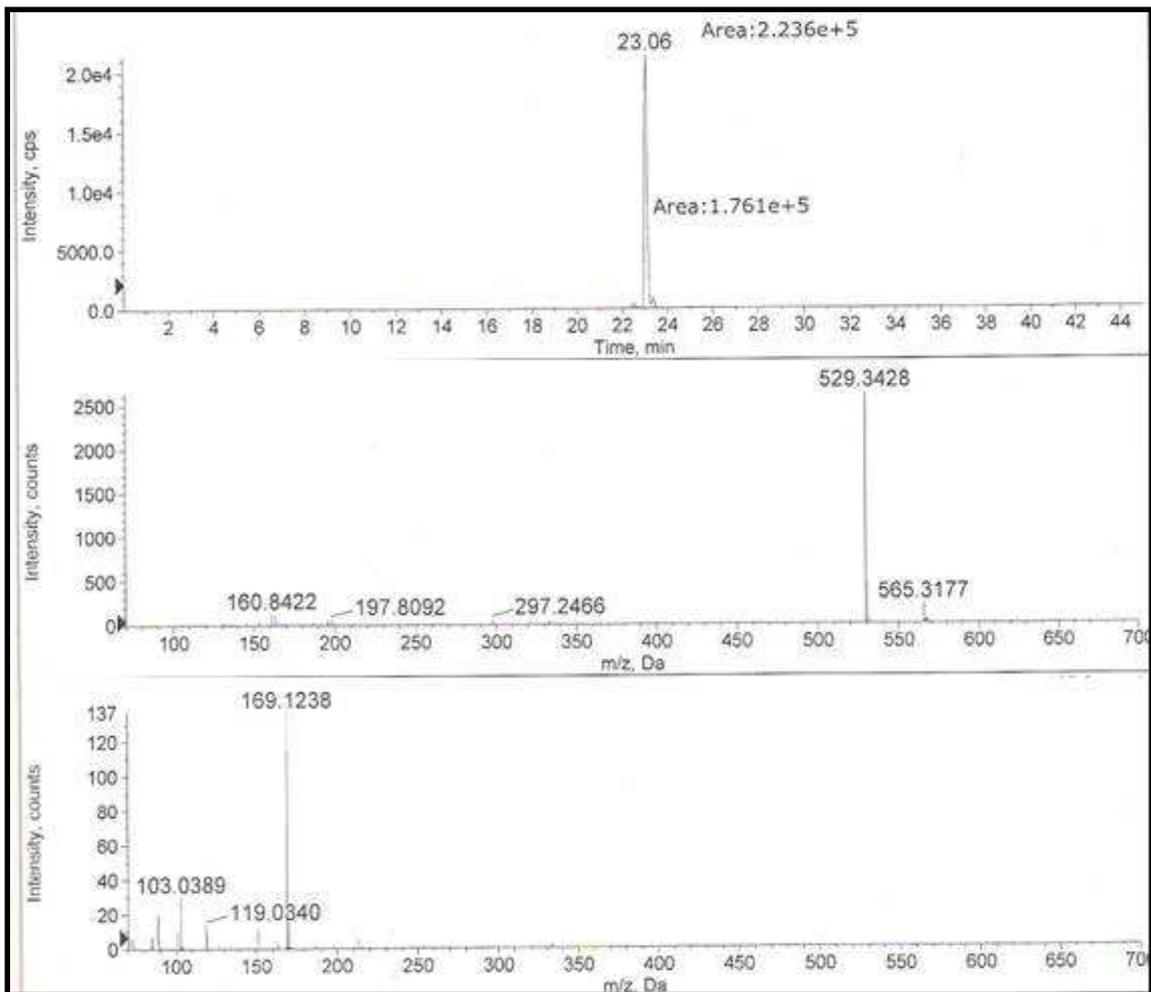


Figura A.7. XIC i TOF del mono-Rhl R-C_{12:1}-C₁₀ amb iò pseudomolecular de massa molecular 529 m/z. Les fragmentacions més freqüents en m/z són 365, 359, 195, 169.

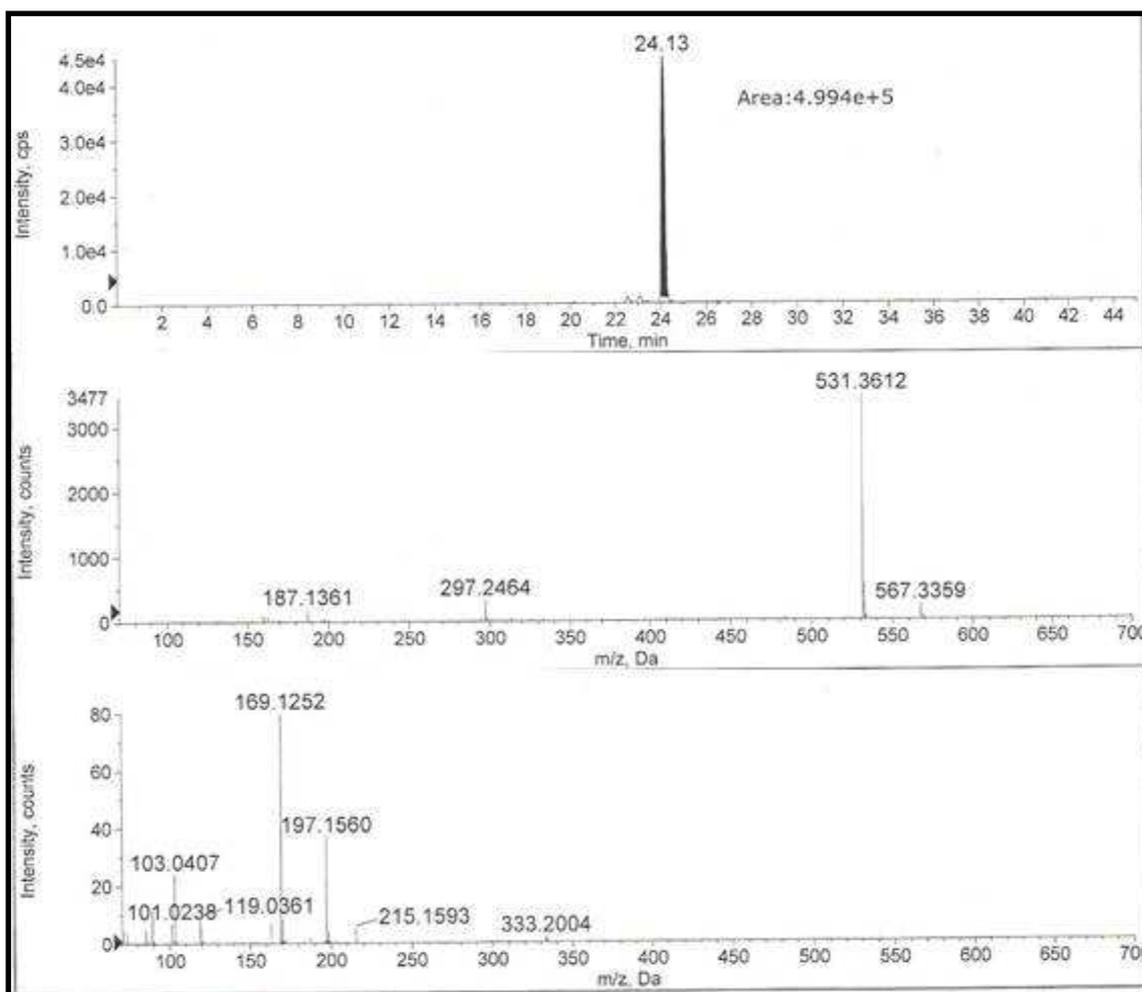


Figura A.8. XIC i TOF dels mono-RhIs R-C₁₀-C₁₂ i R-C₁₂-C₁₀ amb iò pseudomolecular de massa molecular 531 m/z. Les fragmentacions més freqüents en m/z són 367, 333, 197, 169 pel Rhl R-C₁₀-C₁₂ i 367, 361, 197, 169 pel R-C₁₂-C₁₀. Dels fragment més grans que diferencien entre un i l'altre Rhl només es detecta el de m/z 333, així només podem afirmar que l'homòleg R-C₁₀-C₁₂ és present a la barreja, però caldria repetir l'anàlisi disminuint la força d'impacte per detectar els fragments més grans.

