

Caracterización química de ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* AT10 a partir de residuos de aceite de soja mediante HPLC-EM

Arelis Ábalos-Rodríguez.

Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente. Correos electrónicos: aabalos@cnt.uo.edu.cu. decanofcn@consejo.uo.edu.cu.

Recibido: 16 de abril de 2010.

Aceptado: 6 de septiembre de 2010.

Palabras clave: HPLC/MS, ramnolípidos, aceite de soja, combinación instrumental, *Pseudomonas aeruginosa*.
Key words: HPLC/MS, rhamnolipids, instrumental hybridization, *Pseudomonas aeruginosa*.

RESUMEN. La combinación instrumental cromatografía líquida-masas se aplica en la caracterización de hormonas, drogas, fármacos, ramnolípidos y otros compuestos. Los ramnolípidos son tensoactivos microbianos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* sobre diferentes sustratos. El residuo de soja, fracción final del refinado del aceite crudo, contiene fundamentalmente los ácidos linoleico (48,4 %) y oleico (21,1 %). En este trabajo, se determinó la composición química y estructural de los ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* AT10 sobre residuo de soja mediante la combinación instrumental Cromatografía Líquida de Alta Resolución-Espectrometría de Masas. La caracterización estructural de los ramnolípidos evidenció la presencia de ocho picos que corresponden a tres dirramnolípidos (51,5 %) $R_2C_{10}C_{10}$; $R_2C_{10}C_{12:1}$; $R_2C_{10}C_{12}$ y cinco monorramnolípidos (48,5 %) $R_1C_{10}C_{10}$; $R_1C_{10}C_{12:1}$; $R_1C_{10}C_{12}$; $R_1C_{12:2}$; $R_1C_{8:2}$. El electrospray negativo visualizó que la fragmentación más abundante de los monorramnolípidos fue la correspondiente al $[M-H]^-$ 169, en los homólogos $RhaC_{10}C_{10}$, $RhaC_{10}C_{12}$ y $RhaC_{10}C_{12:1}$, seguido de sus iones pseudomoleculares $[M-H]^-$ 503, 531 y 529, respectivamente. Para los dirramnolípidos $RhaRhaC_{10}C_{10}$, $RhaRhaC_{10}C_{12}$ y $RhaRhaC_{10}C_{12:1}$, se observó que el ion pseudomolecular $[M-H]^-$ 649, 675 y 677, respectivamente, fue el más abundante. La fragmentación del enlace éster diferenció entre sí a los mono y dirramnolípidos e identificó el isómero específico presente en la mezcla en los cuatro pares isoméricos $RhaC_{10}C_{12}/RhaC_{12}C_{10}$, $RhaC_{10}C_{12:1}/RhaC_{12:1}C_{10}$, $RhaRhaC_{10}C_{12}/RhaRhaC_{12}C_{10}$, $RhaRhaC_{10}C_{12:1}/RhaRhaC_{12:1}C_{10}$. El método permitió evaluar, además, la acumulación de cada homólogo en el medio durante la incubación.

ABSTRACT. The hybridization liquid chromatography-mass spectrometry is applied for the characterization of hormones, drugs, rhamnolipids and other compounds. The rhamnolipids are microbial tensoactives produced by *Pseudomonas aeruginosa* with different substrates. The soybean oil waste contains linoleic (48.4 %) and oleic (21.1 %) acids fundamentally. In this work was determined the chemical and structural composition of the rhamnolipids of the *Pseudomonas aeruginosa* AT10 with soybean oil waste utilizing instrumental hybridization High Pressure Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. The structural characterization of the rhamnolipids evidenced the presence of eight peaks that correspond to the dirhamnolipids (51.5 %) $R_2C_{10}C_{10}$; $R_2C_{10}C_{12:1}$; $R_2C_{10}C_{12}$ and the monorhamnolipids (48.5 %) $R_1C_{10}C_{10}$; $R_1C_{10}C_{12:1}$; $R_1C_{10}C_{12}$; $R_1C_{12:2}$; $R_1C_{8:2}$. The negative electrospray visualized that the most abundant fragmentation in the monorhamnolipids was the corresponding to the $[M-H]^-$ 169, in the homologous $RhaC_{10}C_{10}$, $RhaC_{10}C_{12}$ and $RhaC_{10}C_{12:1}$, that corresponding to the pseudomolecular ions $[M-H]^-$ 503, 531 and 529 respectively. For the dirhamnolipids $RhaRhaC_{10}C_{10}$, $RhaRhaC_{10}C_{12}$ and $RhaRhaC_{10}C_{12:1}$, it was observed that the pseudomolecular ion $[M-H]^-$ 649, 675 and 677, respectively, was the most abundant peak. The fragmentation of the ester link permitted to separate monorhamnolipids and dirhamnolipids among themselves and identified him at the specific isomer in the four equal isomers $RhaC_{10}C_{12}/RhaC_{12}C_{10}$, $RhaC_{10}C_{12:1}/RhaC_{12:1}C_{10}$, $RhaRhaC_{10}C_{12}/RhaRhaC_{12}C_{10}$, $RhaRhaC_{10}C_{12:1}/RhaRhaC_{12:1}C_{10}$. The hybridization HPLC/MS permitted to evaluate also the accumulation out of every counterpart during the time of cultivation. In the first 24 h only were detected the rhamnolipids $RhaRhaC_{10}C_{10}$ and $RhaC_{10}C_{10}$.

INTRODUCCION

La combinación instrumental cromatografía-espectrometría de masas (C-EM) es una poderosa herramienta de la Química Analítica actual que permite combinar la capacidad de separación de la cromatografía con el poder de discriminación e identificación de las técnicas espectroscópicas y espectrométricas.¹ Esta combinación se utiliza para caracterizar compuestos en diferentes matrices o a partir de un proceso biológico.

La combinación cromatografía gaseosa-espectrometría de masas ha sido utilizada en la determinación de hidrocarburos poliaromáticos y clorados,² pesticidas,³ metabolitos inorgánicos en fluidos biológicos,⁴ esteroides,⁵ polihidroxialcanoatos;⁶ mientras que la cromatografía líquida-espectrometría de masas es muy útil en la caracterización de hormonas,⁷ drogas y fármacos,⁸ ramnolípidos⁹⁻¹³ y otros compuestos.

Los ramnolípidos son tensoactivos microbianos aniónicos, producidos extracelularmente por la bacteria

Pseudomonas aeruginosa sobre sustratos solubles en agua (glucosa, etanol, glicerol, manitol) y no miscibles en agua (aceites vegetales, residuos oleosos de procesos industriales, derivados del petróleo).¹⁴ Los ramnolípidos reducen la tensión superficial e interfacial del sistema, se agrupan en micelas y estabilizan emulsiones aceite-agua¹⁰. La estructura general de estas moléculas contiene una (monorramnolípido) o dos (dirramnolípidos) unidades del anillo de α -L-ramnopiranosas unidas a una cadena de β -hidroxiácido. El anillo de α -L-ramnopiranosas es la parte invariable y polar en la molécula; mientras que la cadena carbonada, saturada o no, es la parte variable y no polar. La ramnosa se une a través de un enlace glicosídico a la cadena carbonada, enlace que también permite la unión entre las dos ramnosas. Si la molécula contiene dos cadenas carbonadas, se unen entre sí a través de un enlace éster (Fig. 1). La variabilidad de longitud de la cadena carbonada determina la existencia de una mezcla compleja de moléculas homólogas y no de una única molécula, por ello, frecuentemente el término ramnolípidos hace alusión a la mezcla de homólogos. Se han encontrado hasta 28 homólogos de ramnolípidos producidos por diferentes cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.¹⁴ Esta bacteria acumula intracelularmente, en presencia de un exceso de fuente de carbono, poli-hidroxicanoatos (PHAs); familia de poliésteres de ácidos (R)-3-hidroxicanoicos esterificados a través del grupo hidroxilo (OH) de la cadena del hidroxiácido.¹⁵ En este trabajo se determinó la composición química y la estructura de los ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* AT10, cultivada sobre residuo de aceite de soja como fuente de carbono, aplicando la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) combinada con la espectrometría de masas-electronebulización negativa (EM-EN).

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Todos los reactivos fueron de calidad puro para análisis (ppa); mientras que los disolventes fueron de grado HPLC, suministrados por Merck, Alemania.

Obtención y purificación de los ramnolípidos

Los ramnolípidos se obtuvieron a partir de tres cultivos ($n = 3$) de *Pseudomonas aeruginosa* AT10 y se utilizó un residuo de aceite de soja como fuente de carbono¹⁶. Finalizado el período de incubación de la bacteria, se removieron las células del medio y el sobrenadante se purificó según el método de Reiling¹⁷ por cromatografía en columna de Amberlita XAD-2 (Supelco, Bellefonte PA, USA), equilibrada con disolución estabilizadora de fosfato, 0,1 mol/L. La adsorción de los ramnolípidos se evaluó a través de la medición de la tensión superficial por el método del anillo a la salida de la columna hasta alcanzar un valor de 40 mN/m (tensiómetro Krüss K12 Helsinki, Finlandia). Se lavó la columna con agua destilada hasta obtener una tensión superficial de 72 mN/m, indicativo de que no quedaban restos de ácidos grasos libres en la columna. Finalmente, los ramnolípidos se eluyeron con metanol y el extracto orgánico se llevó a sequedad en un evaporador rotatorio (Büchi, Flawil, Switzerland).

Cuantificación de los ramnolípidos

Los ramnolípidos se cuantificaron por el método de la ramnosa. El contenido total de ramnolípidos se calculó a partir de la multiplicación del contenido de ramnosa por el factor 3.¹⁸

Cromatografía Líquida-Espectrometría de Masas (HPLC-EM)

A partir de una disolución metanólica de ramnolípidos (10 mg/mL), 10 μ L de muestra fueron analizados en un cromatógrafo Waters 2690 (Waters, Midford, EUA) acoplado a un detector de masas a través de una interfase con ionización a presión atmosférica. Esta configuración de la combinación instrumental (cromatógrafo – interfase – espectrómetro de masas) permite la introducción directa de la muestra desde la columna hacia el detector de masas. La separación cromatográfica se realizó en modo fase reversa bajo las condiciones siguientes: columna cromatográfica C₁₈ (SPHERISORB ODS2) de 150 x 4,6 mm y 0,5 μ m de ϕ_i (Teknochroma, San Cugat, España); fase móvil: acetonitrilo-agua (AcN/H₂O) con 0,1 % (v/v) de ácido acético en cada disolvente; gradiente de fase móvil se inició con 30 % de AcN durante 2 min y se incrementó su hasta 100 % en 30 min, la que se mantuvo durante 5 min y se retornó a las condiciones iniciales. Se utilizó un flujo de 1 mL/min y un sistema de split de 1 : 50. Para la elusión total de la muestra se adicionaron post-columna 200 μ L/min de acetona a través de una bomba de jeringa Phoenix 20 (Carlos Erba Instruments, Milán, Italia). La fase móvil y la acetona se mezclaron en una T (Valco). Los espectros de masas se obtuvieron con un cuadrupolo VG Platform II (Micromass, Manchester, Reino Unido) equipado con una fuente de iones por electronebulización (*electrospray*). Las condiciones de la ionización por electronebulización fueron: modo electronebulización negativa (EN), secado con nitrógeno calentado a 100 °C; introducción en el capilar a una velocidad de flujo de 400 μ L/h. Se aplicó un potencial de -3,5 kV al capilar y voltajes de extracción de -35 V para la detección de las moléculas y -80 V para la visualización de las fragmentaciones. Los resultados espectrales fueron obtenidos en un barrido de masas desde 100 a 750 m/z. La integración de las señales cromatográficas se realizó utilizando el programa MassLynx. Se analizaron tres muestras de cultivo con dos réplicas cada una.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los aceites vegetales y residuos oleosos favorecen la acumulación de grandes cantidades de ramnolípidos por diferentes cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, debido a la presencia de los ácidos grasos, que son incorporados directamente a la β -oxidación facilitando la síntesis de novo del β -hidroxiácido y la variedad de moléculas homólogas sintetizadas.

A partir del sobrenadante del cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* AT10 sobre residuo de soja, se cuantificaron 16,50 g/L de ramnolípidos, con una recuperación del 65 % (10,7 g/L). Con el método de Reiling¹⁷ se puede recuperar hasta un 70 % de los ramnolípidos. La literatura consultada^{9,10,13,14} no describe porcentajes de recuperación de los ramnolípidos. La separación cromatográfica de los ramnolípidos de *Pseudomonas aeruginosa* AT10 aplicando HPLC-EM demostró la presencia de ocho picos, los cuales se clasificaron de acuerdo con su ion pseudomolecular registrado en el espectro de masas. La detección de los ocho homólogos se verificó entre los 12 y 17 min (Tabla 1) del gradiente de fase móvil (AcN/H₂O) del HPLC. En la ionización por electronebulización en modo negativo solamente se visualizan las moléculas con carga negativa. La presencia del grupo carboxilo (COOH), muestra un ion pseudomolecular intenso [M-H]⁻ en los ramnolípidos, que se fragmenta poco en estas condiciones y porta la mayor información del ion total. La proximidad encontrada en los tiempos de retención

de los diferentes homólogos se debe a su similitud estructural (Tabla 1). La mezcla está formada por tres dirramnolípidos (51,5 %): $R_2C_{10}C_{10}$; $R_2C_{10}C_{12:1}$; $R_2C_{10}C_{12}$ y cinco monorramnolípidos (48,5 %): $R_1C_{10}C_{10}$; $R_1C_{10}C_{12:1}$; $R_1C_{10}C_{12}$; $R_1C_{12:2}$; $R_1C_{8:2}$. La cuantificación de los ramnolípidos se obtiene a partir de la intensidad relativa de su ión pseudomolecular aplicando un voltaje de extracción de -35 V y considerando además las sugerencias de Déziel.¹⁴ Individualmente, los homólogos mayoritarios son el dirramnolípido $R_2C_{10}C_{10}$ (31,9 %) detectado a m/z 649 y el monorramnolípido $R_1C_{10}C_{10}$ (25,2 %) con m/z 503. Estas moléculas son los clásicos ramnolípidos RL_1 y RL_2 que describió Itoh¹⁹ y que también aparecen descritos como mayoritarios en diferentes cepas de *P. aeruginosa*, independientemente del sustrato utilizado.^{9-11,13,14}

La mayoría de los ramnolípidos de la mezcla tienen al menos una cadena de ácido β -hidroxidecanoico; intermediario común en la síntesis de ramnolípidos y polihidroxialcanoatos en *Pseudomonas aeruginosa*.²⁰ La vía de síntesis de los ramnolípidos sugiere que el monorramnolípido $RhaC_{10}C_{10}$ es el precursor del dirramnolípido $RhaRhaC_{10}C_{10}$, por tanto por cada dirramnolípido que sea detectado, su homólogo monorramnolípido también debe ser detectado. En este trabajo se cumple para las moléculas $RhaRhaC_{10}C_{10}$, $RhaRhaC_{10}C_{12}$, $RhaRhaC_{10}C_{12:1}$. En el caso de los homólogos con dos instauraciones en la cadena del β -hidroxiácido solo se detectaron los monorramnolípidos $RhaC_{12:2}$ y $RhaC_{8:2}$. En las condiciones experimentales de este trabajo, no fue posible fijar la posición del doble enlace. Los homólogos detectados en el cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* AT10 contienen cadenas carbonadas entre 8 y 12 átomos de carbono, unidades de β -hidroxiácidos que coinciden con las cadenas de polihidroxialcanoatos que produce esta misma cepa en un cultivo con exceso de fuente de carbono.²¹

La electronebulización negativa, acompañada de una extracción de -80 V, permitió visualizar las fragmentaciones de cada molécula (Tabla 2). En el caso de los monorramnolípidos con dos cadenas carbonadas, el fragmento más abundante fue el correspondiente al ácido 3-hidroxidecanoato, $[M-H]^-$, (homólogos $RhaC_{10}C_{10}$, $RhaC_{10}C_{12}$, $RhaC_{10}C_{12:1}$), seguido del ion pseudomolecular $[M-H]^-$ 503, 531 y 529 respectivamente. En los dirramnolípidos ($RhaRhaC_{10}C_{10}$, $RhaRhaC_{10}C_{12}$, $RhaRhaC_{10}C_{12:1}$), se observó que el ion pseudomolecular $[M-H]^-$ 649, 675 y 677 respectivamente fue, en todos los casos, el más abundante.

Tabla 1. Estructura y abundancia relativa de los ramnolípidos de *P. aeruginosa* AT10 cultivada sobre residuo de soja determinadas mediante la aplicación de la combinación instrumental HPLC-EM.

Asignación probable	tr (min)	%	m/z
$RhaC_{8:2}$	12,2	6,8	301
$RhaRhaC_{10}C_{10}$	13,0	31,9	649
$RhaRhaC_{10}C_{12:1}$	14,2	6,7	675
$RhaC_{10}C_{10}$	14,8	25,2	503
$RhaRhaC_{10}C_{12}$	15,4	12,9	677
$RhaC_{12:2}$	16,0	6,4	357
$RhaC_{10}C_{12:1}$	16,0	7,1	529
$RhaC_{10}C_{12}$	17,2	2,8	531

Voltaje de extracción: -35 V. Total de compuestos saturados: 72 % e insaturados 27 %.

La fragmentación del enlace éster que une a las cadenas carbonadas es la más importante porque permite diferenciar entre sí a los mono y dirramnolípidos e identificar a su vez, en el caso de los cuatro pares isoméricos con cadenas carbonadas de diferente longitud ($RhaC_{10}C_{12}/RhaC_{12}C_{10}$, $RhaC_{10}C_{12:1}/RhaC_{12:1}C_{10}$, $RhaRhaC_{10}C_{12}/$

Tabla 2. Iones pseudomoleculares y fragmentaciones $[M-H]^-$ de los ramnolípidos homólogos de *P. aeruginosa* AT10 cultivada sobre residuo de aceite de soja. Voltaje de extracción -80 V.

Estructura	Masa	Fragmentación m/z	Abundancia relativa (%)
		$[M-H]^-$	
$RhaRhaC_{10}C_{10}$	650	649	100
		479	24
		339	16
		311	22
		169	40
		163	12
$RhaRhaC_{10}C_{12:1}$	676	675	100
		479	28
		195	8
		169	63
		311	15
		119	5
$RhaRhaC_{10}C_{12}$	678	103	15
		677	100
		311	3
		479	26
		169	14
		197	20
$RhaC_{10}C_{10}$	504	503	78
		333	20
		339	8
		169	100
		163	15
		119	13
$RhaC_{10}C_{12:1}$	530	103	28
		529	47
		365	6
		333	30
		169	100
		195	6
$RhaC_{10}C_{12}$	532	163	25
		119	17
		103	38
		531	80
		333	14
		197	25
$RhaC_{8:2}$	302	169	100
		301	NV
$RhaC_{12:2}$	358	357	NV

NV No visualizado.

RhaRhaC₁₂C₁₀, RhaRhaC₁₀C_{12:1}/RhaRhaC_{12:1}C₁₀) qué isómero específico estaba presente; ya que tienen el mismo valor m/z. La fragmentación del enlace éster ocurre por una ruptura heterolítica debido a que el par de electrones en el enlace C – O está más desplazado hacia el oxígeno y por tanto el carbono carbonílico (C = O), deficiente de electrones, los atrae con más fuerza debilitando el enlace éster (C – O). El carácter básico del grupo R' – O también condiciona la ruptura del enlace éster. Para los tres dirramnolípidos (Fig. 1b) fueron visualizadas las fragmentaciones con m/z 479 y m/z 311. El pico m/z 479 corroboró la presencia de los isómeros Rha Rha C₁₀C_{12:1} y Rha Rha C₁₀C₁₂. Si los isómeros Rha Rha C_{12:1}C₁₀ y Rha Rha C₁₂C₁₀ de sus respectivos pares estuviesen en la mezcla, se debieron visualizar los picos m/z 505 y 507 respectivamente (Tabla 2). Algunos estudios se apoyan en el uso de la combinación instrumental masa-masa (tandem) para determinar el isómero del par presente en la mezcla.¹¹ Cuando están presentes los dos isómeros del par, aquel que posea la cadena carbonada más corta directamente unida al anillo de α-L ramnopiranosil es el más abundante.^{9,11,14}

En el caso de los monorramnolípidos, el ion característico fue detectado a m/z 333 (Fig. 1a), el cual corresponde a la ruptura del enlace éster entre las cadenas carbonadas. La detección de esta señal confirmó que los isómeros contenidos en la mezcla de ramnolípidos de *Pseudomonas aeruginosa* AT10 fueron los monorramnolípidos Rha C₁₀C₁₂ y Rha C₁₀C_{12:1}. En la mezcla de ramnolípidos producida por *Pseudomonas aeruginosa* LBI, cultivada sobre jaboncillo de soja, también fueron detectados los homólogos R_nC₁₀C₁₂ y R_nC₁₀C_{12:1} (n = 1 ó 2), pero no sus respectivos isómeros.¹⁰ *Pseudomonas aeruginosa* UG2 cultivada sobre aceite de maíz solamente sintetizó los homólogos del tipo Rha Rha C₁₀C₁₂ y Rha Rha C₁₀C_{12:1},²² pero no sus respectivos pares isoméricos. La presencia de pares de isómeros en mezclas de ramnolípidos ha sido descrita únicamente para cepas de *Pseudomonas aeruginosa* cultivadas sobre aceite de oliva,⁹ glicerol¹¹ y ma-

nitól¹⁴ como sustratos. Las fragmentaciones de los iones pseudomoleculares de los homólogos Rha C_{12:2} y Rha C_{8:2} de *Pseudomonas aeruginosa* AT10 no fueron visualizadas a –80 V. Los ramnolípidos con cadenas insaturadas se han descrito principalmente durante el cultivo de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* sobre aceites vegetales en cuya composición predominan los ácidos grasos oleico (47T2),⁹ linoleico (UG2)¹⁷ o linolénico (LBI).¹⁰

La combinación HPLC/EM permitió evaluar también la acumulación de cada homólogo producido por *Pseudomonas aeruginosa* AT10 durante el tiempo de cultivo a partir del residuo de soja como sustrato. En las primeras 24 h de incubación solamente fueron detectados los ramnolípidos Rha Rha C₁₀C₁₀ y Rha C₁₀C₁₀ (Fig. 2), que fueron a su vez, los mayoritarios (Tabla 1). Del total de ramnolípidos acumulados en el medio a las 24 h (0,21 g/L); 0,14 g/L correspondieron al dirramnolípidos Rha Rha C₁₀C₁₀ y tan solo 0,07 g/L al monorramnolípidos Rha C₁₀C₁₀. Aproximadamente alrededor de las 30 h, coincidiendo con el incremento de la acumulación de ramnolípidos en el medio, tres nuevos homólogos fueron detectados: Rha Rha C₁₀C₁₂; Rha Rha C₁₀C_{12:1} y Rha C₁₀C_{12:1}. Sus concentraciones sin embargo, fueron muy bajas. A partir de las 48 h, se detectaron los monorramnolípidos Rha C₁₀C₁₂ (0,14 g/L), R₁C_{12:2} (0,17 g/L) y finalmente, entre las 72 y 96 h se detectó el monorramnolípidos Rha C_{8:2} (1,67 g/L). En este tiempo, se observó además, que la concentración del dirramnolípidos Rha Rha C₁₀C₁₂ disminuyó, mientras aumentaba la del dirramnolípidos Rha Rha C₁₀C₁₀ (Fig. 2). En el resto de los homólogos no se observaron cambios en sus concentraciones.

CONCLUSIONES

Del análisis realizado utilizando la combinación instrumental HPLC-EM, se pudo determinar que la cepa *Pseudomonas aeruginosa* AT10 acumula ocho ramnolípidos homólogos: Rha Rha C₁₀C₁₀ (4,76 g/L); Rha C₁₀C₁₀ (3,52 g/L); Rha C₁₀C_{12:2} (2,11 g/L); Rha C_{8:2} (1,95 g/L); Rha Rha C₁₀C₁₂ (1,87 g/L); Rha C₁₀C_{12:1} (1,06 g/L); Rha

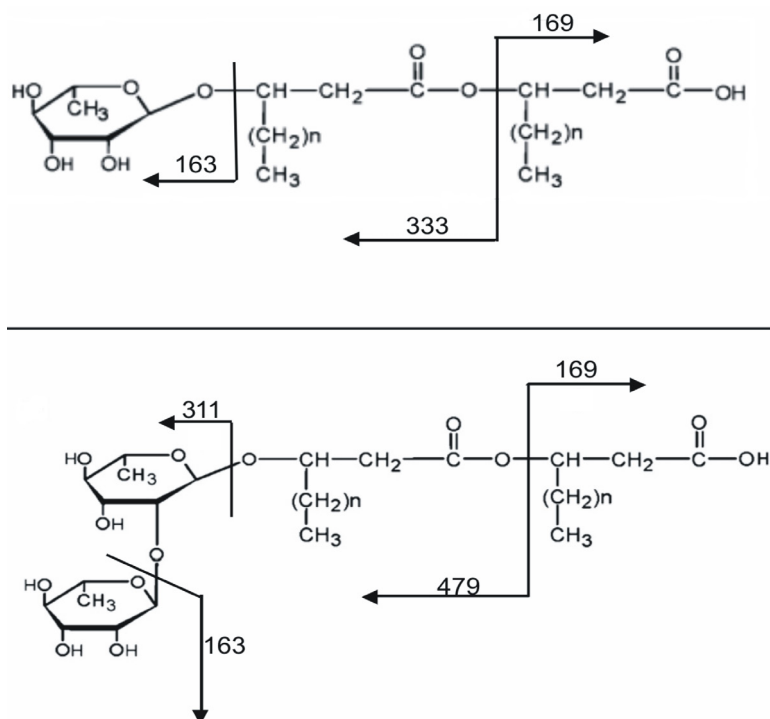


Fig. 1. Estructura química del mono Rha C₁₀C₁₀ (a) y dirramnolípidos Rha Rha C₁₀C₁₀ (b) producido por *P. aeruginosa* AT10 cultivada sobre residuo de aceite de soja. Se detallan las rupturas de los enlaces éster y glicosídico en ambos homólogos.

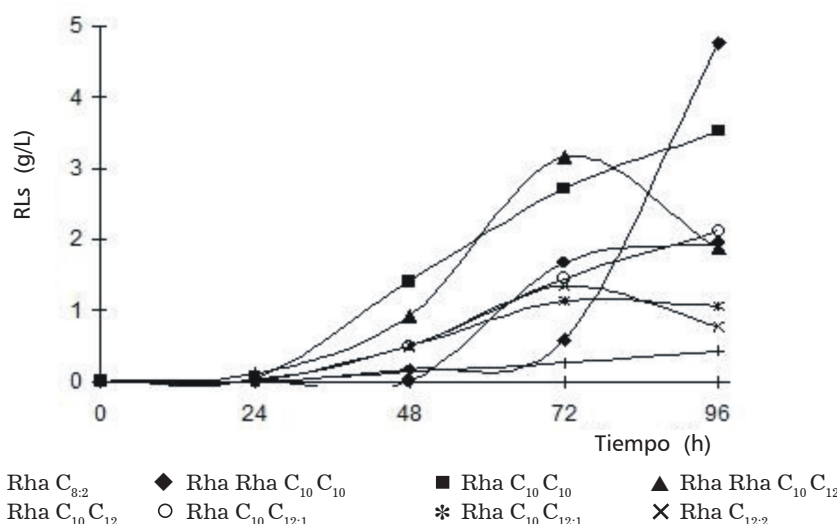


Fig. 2. Aplicación de la combinación HPLC-masas en la detección de los diferentes ramnolípidos de *Pseudomonas aeruginosa* AT10. Las cantidades en el gráfico representan la acumulación total de ramnolípidos en el medio.

$C_{12:2}$ (0,77 g/L) y Rha $C_{10}C_{12}$ (0,43 g/L). En esta mezcla predominan los homólogos saturados (72,8 %).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Vacárcel M, Gómez A. Técnicas analíticas de separación. Barcelona: Reverté SA: 2003;p.724-770.
- Deepika P, Anil K, Meda K, Pratyusha G, Somashaker M, Mark SD, *et al.* Determination of selected chlorohydrocarbons and polyaromatic hydrocarbons by gas chromatography-mass spectrometry in soils in Southwest Louisiana. *Microchemical Journal*. 2009;91:13-15.
- Min-Sun K, TaeWoo K, Heesoo P, Junheon Y, Kyunghee C, Jongki H. Determination of organochlorine pesticides in sediment using graphitized carbon black solid-phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2008;1208:25-33.
- Hagberg J. Analysis of brominated dioxins and furans by high resolution gas chromatography/high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2009;1216:376-384.
- Duffy E, Rambaud L, Le Bizec B, O'Keeffe M. Determination of hormonal growth promoters in bovine hair: Comparison of liquid chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry methods for estradiol benzoate and nortestosterone decanoate. *Analytica Chimica Acta*. 2009;637:165-172.
- Vidal J, Resina P, Haba E, Comas J, Manresa A, Vives T. Rapad 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 Van Leevenhock*. 2001;80:57-63.
- Yang Y, Shao B, Zhang J, Wu Y, Duan H. Determination of the residues of 50 anabolic hormones in muscle, milk and liver by very-high-pressure liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2009;877:489-496.
- Aoki Y, Hakamata H, Igarashi Y, Uchida K, Kobayashi H, Hirayama N, *et al.* Simultaneous determination of azaperone and azaperol in animal tissues by HPLC with confirmation by electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2009;877:166-172.
- Haba E, Ábalos A, Jáuregui O, Espuny MJ, Manresa AM. Use of liquid chromatography-mass spectroscopy for the studying the composition and properties of rhamnolipids produced by different strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Surfactant and Detergents*. 2003;6:155-161.
- Benincasa M, Ábalos A, Oliveira I, Manresa A. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2004;85:1-8.
- Monteiro AS, Sassaki GL, Meira JA, Krieger N. Molecular and structural characterization of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* DAUPE 614. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2007;147:1-13.
- Heyd M, Kohnert TH, Nusser M, Kirschhöfer F, Brenner-Weiss G, Franzreb M. Development and trends of biosurfactant analysis and purification using rhamnolipids as an example. *Anal Bioanal Chem*. 2008;391:1579-1590.
- Neil P, Price J, Karen J, Vermillion K, Tsung-Min K. MALDI-TOF mass spectrometry of naturally occurring mixtures of monorhamnolipids and dirhamnolipids. *Carbohydrate Research*. 2009;344:204-209.
- Déziel E, Lépine F, Dennie D, Boismenu D, Mamer O, Villemur R. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixture of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. *Biochim et Biophys Acta*. 1999;1440:244-252.
- Witholt B, Kessler B. Perspectives of medium chain length poly(hydroxyalkanoates), a versatile set of bacterial bioplastics. *Curr Opin in Biotechnol*. 1999;10:279-285.
- Ábalos A, Maximo F, Manresa A, Bastida J. Utilization of response surface methodology to optimize the culture media for the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. *J Chem Technol Biotechnol*. 2002;77:777-784.
- Reiling HE, Thanei-wyss U, Guerra-Santos LH, Hirt R, Käppeli O, Fiechter A. Pilot Plant Production of Rhamnolipid Biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*. 1986;51:985-989.
- Chandrasekaran, EV, Bemiller JN. *Methods in Carbohydrate Chemistry*. New York: Academic Press: 1980;p.89-97.
- Itoh S, Honda H, Tomita F, Suzuki T. Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* Grown on n-Paraffin. *The J Antibiotics*. 1971;24:855-859.
- Burger M, Glaser L, Burton RM. The Enzymatic Synthesis of a Rhamnose-Containing Glycolipid by Extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem*. 1963;238:2595-2602.
- Ábalos A, Espuny MJ, Bermúdez RC, Manresa A. Aplicación de la Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (GC/MS) en la caracterización química de los polihidroxialcanoatos de *Pseudomonas aeruginosa* AT10 *Revista Cubana de Química*. 2003;XV(3):3-10.
- Mata-Sandoval J, Karns J, Torrents A. Effect of nutritional and environmental conditions on the production and composition of rhamnolipids by *P. aeruginosa* UG2. *Microbiol Research*. 2001;155:249-256.