



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

TAMIRES MINUCELLI

**PRODUÇÃO DE SOFOROLIPÍDIOS DE *Candida bombicola*  
ATCC 22214 EM SUBSTRATOS INDUSTRIAIS DE BAIXO  
CUSTO E APLICAÇÃO EM BIORREMEDIAÇÃO**

---

Londrina  
2015

TAMIRES MINUCELLI

**PRODUÇÃO DE SOFOROLIPÍDIOS DE *Candida bombicola*  
ATCC 22214 EM SUBSTRATOS INDUSTRIAIS DE BAIXO  
CUSTO E APLICAÇÃO EM BIORREMEDIAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos necessários à obtenção de título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Maria Antonia Pedrine  
Colabone Celligoi.

Londrina  
2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

M668p Minucelli, Tamires.

Produção de soforolipídios de *Candida bombicola* ATCC 22214 em substratos industriais de baixo custo e aplicação em biorremediação / Tamires Minucelli. – Londrina, 2015.  
96 f. : il.

Orientador: Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi.  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2015.  
Inclui bibliografia.

1. Biotecnologia – Teses. 2. Soforolipídios – Produção – Teses. 3. Biossíntese – Teses. 4. *Candida bombicola* – Teses. 5. Solos – Biorremediação – Teses. I. Celligoi, Maria Antonia Pedrine Colabone. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 663.1

TAMIRES MINUCELLI

**PRODUÇÃO DE SOFOROLIPÍDIOS DE *Candida bombicola* ATCC  
22214 EM SUBSTRATOS INDUSTRIAIS DE BAIXO CUSTO E  
APLICAÇÃO EM BIORREMEDIAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos necessários à obtenção de título de Mestre em Biotecnologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Antonia Pedrine  
Colabone Celligoi  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Márcia Luciana Cazetta  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia -  
UFRB

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marta Viviana Torres  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 01 de Abril de 2015

*“Nada é mais fatal para o progresso da mente humana do que achar que nossas visões da ciência são definitivas, que nossos triunfos são completos, que não há mistérios na natureza e que não há mundos novos a conquistar.”*

**Humphry Davy**

***Dedico esse trabalho à minha família,  
meu tesouro mais precioso.***

## AGRADECIMENTOS

*À Deus, por mais essa etapa concluída com sucesso. Agradeço por ajudar a manter o foco, perseverança e fé nos momentos que me faltaram confiança.*

*À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi, por aceitar me orientar compartilhar seu conhecimento e experiência; aos incentivos e paciência, principalmente nos momentos mais complicados; pela confiança e amizade. Agradeço por esses anos compartilhados, que contribuíram para minha evolução pessoal e profissionalmente;*

*À minha família, pelo amor incondicional, paciência e apoio nos meus momentos achei perderia minha sanidade. Por acreditarem e na minha capacidade e sempre despertarem o melhor de mim;*

*Às minhas queridas amigas companheiras de pesquisa e vida Agnes Magri e Nicole Pan, por dividir a experiência e conhecimento profissional, mas principalmente pelo apoio moral e emocional, não permitindo nunca que eu desanimasse. Agradeço por estarem presentes na minha vida, por tornarem esse tempo mais fácil e divertido;*

*Aos meus amigos, Francine, Daniela, Larissa B., Angélica, Larissa M, Fátima, Leandro, Alex e Lucas, agradeço pela amizade, companheirismo, amor e incentivo em todos os momentos;*

*Aos queridos amigos do Laboratório de Bioquímica e Biotecnologia, a Janaína, Hannia, Ana Paula, Karina, Jaqueline, Dieyssi, Ismael, pela troca de experiências e conhecimentos. Ao Marcos Roberto pela disponibilidade e auxílio na minha pesquisa. Ao Renato por toda ajuda e suporte nas análises dos espectros e pelas conversas descontraídas;*

*Aos técnicos de laboratório Nelson Janeiro Rodriguez e Jurandir Pereira Pinto minha imensa gratidão pela boa vontade, disponibilidade em todos os momentos;*

**Ao Prof. Dr. Dionísio Borsato do Departamento de Química, por toda atenção e ajuda nas análises estatísticas.**

**Ao Prof. Dr. Galdino Andrade Filho e do Laboratório de Ecologia Microbiano, no departamento de Microbiologia, pela colaboração intelectual nos ensaios de biorremediação, pelo espaço cedido em laboratório para o experimento. Pela oportunidade de trabalhar com pessoas incríveis como a Dra. Marta Viviana Torres e pelo reencontro com minha querida amiga Vanessa Fogaça de Freitas.**

**Ao Prof. Dr. Omar do Laboratório de Solos, no Departamento de Agronomia, ao Tadeu pela caracterização do solo utilizado nos ensaios de biorremediação.**

**Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, pela atenção, apoio, colaboração e auxílios prestados.**

**À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.**

**Ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia, pela oportunidade de desenvolver este trabalho.**

MINUCELLI, Tamires. **Produção de soforolipídios de *Candida bombicola* ATCC 22214 em substratos industriais de baixo custo e aplicação em biorremediação.** 2015. 97 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

## RESUMO

Os soforolipídios são biossurfactantes compostos por uma sefaroze ligada a um ácido graxo. As suas propriedades tensoativas possibilitam um amplo potencial de aplicação. Esses compostos são sintetizados por diversas cepas do gênero *Candida* na presença de uma fonte hidrofílica e hidrofóbica de carbono. Neste trabalho foi avaliada a produção de soforolipídios por *Candida bombicola* ATCC22214 utilizando o melaço de cana de açúcar, caldo de cana, sacarose ou glicose como fonte hidrofílica e a gordura de frango ou óleo de girassol como fonte hidrofóbica. A composição da melhor combinação foi otimizada utilizando um Box-Behnken. Os soforolipídios produzidos foram caracterizados estruturalmente por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e por ressonância magnética nuclear (RMN). Foram determinadas propriedades tensoativas: tensão superficial, concentração micelar crítica (CMC) e índice de emulsificação. Os soforolipídios produzidos foram aplicados na biorremediação de solos contaminados com óleo lubrificante, juntamente com consórcio bacteriano comercial (*Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*). A melhor produção de soforolipídios foi de 16,83 g L<sup>-1</sup> em gordura de frango com glicose. A condição otimizada para a produção dos SLP foi 75 g L<sup>-1</sup> de gordura de frango, 77,5 g L<sup>-1</sup> de glicose, 2,5 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura e sem ureia, atingindo 41,63 g L<sup>-1</sup>. A composição dos soforolipídios produzidos são da forma lactônica diacetilada, com capacidade de diminuir a tensão superficial da água de 70 mN/m para de 35 mN/m, CMC de 65 mg L<sup>-1</sup> e mostraram capacidade emulsificante em óleo lubrificante, n-heptano e tolueno. Os resultados obtidos sugerem que esses compostos possuem potencial na aplicação em biorremediação de solos contaminados. Os soforolipídios ao serem adicionados ao consórcio bacteriano (*Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*) apresentaram degradação mais alta do que apenas com os microrganismos comerciais. A melhor eficiência de biodegradabilidade do óleo lubrificante foi de 4%, onde foi adicionado 1 g de soforolipídios e 4g do consórcio bacteriano por Kg de solo.

**Palavras-chaves:** Soforolipídios. *Candida bombicola*. Gordura de frango. Solo contaminado. Biorremediação

MINUCELLI, Tamires. **Production of sophorolipid by *Candida bombicola* ATCC 22214 in low cost substrates and application in biorremedioation.** 2015. 97 p. Dissertation (Master's Degree in Biotechnonology) – State University of Londrina, Londrina, 2015.

## ABSTRACT

The sophorolipids are biosurfactants composed of a sepharose linked to a chain hydroxy fatty acid. Their surface-active properties allow a wide application potential. The sophorolipids are synthesized by several strains of *Candida* in the presence of hydrophilic and hydrophobic sources. In this work, was evaluated the production of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC2214, using sugar cane molasses, cane juice, sucrose or glucose as hydrophilic source and the chicken fat or sunflower oil as hydrophobic source. The composition of the best combination was optimized using a Box-Behnken design. The sophorolipids produced were characterized by Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and nuclear magnetic resonance (NMR). The surface-active properties such as surface tension, critical micelle concentration (CMC) and emulsification index were also determined. Finally, the sophorolipids were applied in the bioremediation lubricating oil contaminated soils by increasing the availability of this contaminant to be degraded by commercial bacterial consortium (*Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*). The highest yield was 16,83 g L<sup>-1</sup> in chicken fat with glucose. The optimal condition get 41,63 g L<sup>-1</sup> of sophorolipids in 75 g L<sup>-1</sup> of chicken fat, 7,5 g L<sup>-1</sup> of glucose, 2,5 g L<sup>-1</sup> of yeast extract and without urea. The sophorolipids produced were diacetilada lactonic form, capable of reducing the surface tension of water from 70 mN / m to 35 mN / m, CMC 65 mg L<sup>-1</sup> and showed to be good emulsifiers for lubricating oil, n-heptane and toluene. The results suggest that these glycolipids have the great potential to be used in bioremediation of contaminated soils. The sophorolipids together with the bacterial consortium showed the highest degradation of the lubricating oil when compared to the commercial microorganisms. The best efficiency of biodegradability of the lubricating oil was 4% by adding 1 g Kg<sup>-1</sup> of soforolipídios and 4 g Kg<sup>-1</sup> of bacterial consortium.

**Keywords:** Sophorolipids. *Candida bombicola*. Chicken fat. Contaminated soil. Bioremediation.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	Formas estruturais mais comuns de soforolipídios compostos por ácido graxo C18:1 produzidos por diferentes espécies de microrganismos.....	22
<b>Figura 2 -</b>	Formas diméricas (A e B) e formas triméricas (C e D) de soforolipídios produzidos por <i>Candida</i> sp. NRRL Y-27208.....	23
<b>Figura 3 –</b>	Soforolipídios não convencionais produzidos por cepa <i>Wicherhamiella domercqiae</i> var. CGMCC 1576 .....	24
<b>Figura 4 –</b>	Esquema da biossíntese dos soforolipídios.....	27
<b>Figura 5 -</b>	Ensaio de respirometria .....	53

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Biossurfactantes de baixo e alto peso molecular e seus microrganismos produtores.....	20
<b>Tabela 2 –</b>	Microrganismos produtores de soforolipídios.....	31
<b>Tabela 3 –</b>	Resíduos e subprodutos para a produção de SLP e as melhores produções descritas por diferentes autores .....	40
<b>Tabela 4 –</b>	Ensaio com as diferentes combinações das fontes hidrofílicas e hidrofóbicas de carbono para produção de SLP por <i>Candida bombicola</i> .....	47
<b>Tabela 5 –</b>	Planejamento Box Behnken 33 com variáveis e sua resposta $y_1$ = produção de soforolipídios por <i>Candida bombicola</i> .....	48
<b>Tabela 6 –</b>	Ensaio para biorremediação de solos com o Enzilimp acrescidos de soforolipídios.....	53

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
2.1	GERAL .....	18
2.2	ESPECÍFICOS .....	18
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>19</b>
3.1	BIOSURFACTANTES.....	19
3.2	SOFOROLIPÍDIOS.....	21
3.2.1	Estrutura dos Soforolipídios.....	21
3.2.2	Biossíntese de Soforolipídios.....	25
3.2.3	Propriedades dos Soforolipídios .....	28
3.3	MICROORGANISMOS PRODUTORES .....	30
3.3.1	Candida bombicola .....	32
3.4	FATORES QUE ATUAM NA PRODUÇÃO DE SOFOROLIPÍDIOS .....	33
3.5	RESÍDUOS INDUSTRIAIS .....	38
3.6	APLICAÇÕES DOS SOFOROLIPÍDIOS.....	40
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>43</b>
4.1	MATERIAL.....	43
4.1.1	Microrganismos .....	43
4.1.2	Substratos Industriais de Baixo Custo .....	44
4.1.3	Meio de Preservação e Inóculo .....	44
4.1.4	Solo.....	44
4.2	MÉTODOS.....	44
4.2.1	Caracterização da Gordura de Frango .....	44
4.2.2	Preparo do Melaço e Caldo de Cana.....	45
4.2.3	Preservação da Candida bombicola .....	46
4.2.4	Inóculo .....	46
4.2.5	Avaliação das Fontes de Hidrofílicas e Hidrofóbicas para a Produção de Soforolipídios.....	46

4.2.6	Otimização do Meio de Cultivo para Produção de SLP por <i>Candida bombicola</i> Aplicando Planejamento Box Behnken 33.....	47
4.2.7	Determinação de Biomassa.....	48
4.2.7.1	Curva de biomassa.....	48
4.2.7.2	Quantificação de biomassa.....	49
4.2.8	Quantificação de Soforolipídios.....	49
4.2.9	Quantificação de Açúcares Totais Residuais e Óleo Residual.....	49
4.2.10	Caracterização dos Soforolipídios.....	50
4.2.10.1	Espectroscopia de Infravermelho (IV) com Transformada de Fourier (FTIR).....	50
4.2.10.2	Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN).....	50
4.2.10.3	Determinação tensão superficial.....	51
4.2.10.4	Determinação da concentração micelar crítica (CMC).....	51
4.2.10.5	Índice de emulsificação.....	51
4.2.11	Aplicação do SLP na Biorremediação de Solos Contaminados com Óleo Lubrificante em Ensaios Laboratorial.....	52
4.2.12	Análise Estatística.....	54
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>5.1</b>	<b>ARTIGO – Sophorolipis production by <i>Candida bombicola</i> ATCC 22214 and potencial application in the bioremediation.....</b>	<b>56</b>
<b>ABSTRACT</b>	.....	<b>57</b>
<b>INTRODUCTION</b>	.....	<b>58</b>
<b>MATERIALS AND METHODS</b>	.....	<b>59</b>
<b>RESULTS</b>	.....	<b>61</b>
<b>DISCUSSION</b>	.....	<b>64</b>
<b>ACKNOWLEDGEMENTS</b>	.....	<b>66</b>
<b>REFERENCE</b>	.....	<b>66</b>

6	<b>CONCLUSÕES</b> .....	77
7	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA</b> .....	78
	<b>ANEXOS</b> .....	87
	<b>ANEXO A –</b> Perfil cromatográfico do padrão FAMEmix Supleco®.....	88
	<b>ANEXO B –</b> Perfil cromatográfico da gordura de frango.....	89
	<b>ANEXO C -</b> Normas para a submissão do artigo para o periódico <i>Applied Microbiology and Biotechnology</i> .....	90

## 1 INTRODUÇÃO

A levedura *Candida bombicola* se destaca como produtora de soforolipídios (SLP), um biossurfactante que, em sua porção hidrofílica, contém uma sefarose ligada à uma cadeia de ácido graxo, sua porção hidrofóbica. As moléculas de SLP podem estar na forma acídica ou na forma lactônica, na qual ocorre uma esterificação entre o ácido carboxílico do ácido graxo e a hidroxila da sefarose. Os SLP são sintetizados como uma mistura complexa de formas acídicas e lactônicas, que podem apresentar outras variações, como a presença de acetilações na sefarose ou no tamanho e presença de instaurações na cadeia de ácido graxos, o que conferem propriedades variadas.

Os soforolipídios (SLP) são muito semelhantes aos surfactantes químicos, com vantagens de apresentarem baixa toxicidade e serem completamente biodegradáveis não causando danos ao meio ambiente. Também devido à sua alta seletividade e atividade específica em condições extremas de temperatura, pH e salinidade podem ser utilizados em diferentes aplicações industriais como agrícola, alimentícia, petrolífera, cosmética, farmacêutica e ambiental.

Para possível aplicação dos biossurfactantes é necessário desenvolvimento de processos mais econômicos de produção, que pode ser a utilização de resíduos industriais e sua conversão eficiente e sustentável em produtos de alto valor agregado por meio de processos fermentativos. Dentre os substratos de baixo custo para produção de soforolipídios destacam-se gordura animal, óleo de fritura, resíduos de ácidos graxos, águas residuais de laticínios, soro de leite, ácidos graxos do sebo, melação de soja, glicerol bruto e melação de cana.

Aliados aos substratos de baixo custo, a otimização dos componentes do meio é uma etapa importante no processo fermentativo e a metodologia estatística vem como uma ferramenta para a otimização de processos objetivando altos rendimentos.

Considerando as aplicações e o custo elevado dos soforolipídios, estratégias como substratos de baixo custo para a formulação do meio de fermentação e a otimização das condições para alta produção devem ser empregadas. Este trabalho se propôs a utilizar gordura residual da indústria de frango para a produção de soforolipídios por *Candida bombicola* e sua aplicação em processos de biorremediação de solo contaminado com óleo lubrificante.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

- Produzir sofrorolipídios por *Candida bombicola* ATCC 22214 em substratos industriais e aplicar na biorremediação de solos.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a produção de sofrorolipídios em diferentes substratos industriais (melaço e caldo de cana de açúcar, sacarose, glicose, óleo de girassol e gordura de frango) por *Candida bombicola*;
- Otimizar a produção variando a composição meio de cultivo;
- Caracterizar química e estruturalmente os SLP produzidos por *Candida bombicola* na condição otimizada;
- Avaliar a capacidade dos sofrorolipídios na biorremediação de solo contaminados com óleo lubrificante.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 BIOSSURFACTANTES

Os biossurfactantes são surfactantes naturais produzidos por diversos microrganismos e possuem propriedades muito semelhantes aos surfactantes químicos, pois possuem propriedades tensoativas, ou seja, são capazes de alterar a tensão superficial da solução em que estão presentes (SOLAIMAN, 2005).

As moléculas dos biossurfactantes são anfífilas (NITSCHKE, PASTORE, 2002), possuem uma extremidade hidrofóbica que é usualmente composta por uma longa cadeia de ácidos graxos, hidroxi-ácidos graxos ou  $\alpha$ -alquil  $\beta$ - hidroxi-ácidos graxos e a outra extremidade hidrofílica, que pode ser um carboidrato, aminoácido, peptídeo cíclico, fosfato, ácido carboxílico ou álcool (MULLIGAN, 2005). Esses agentes tensoativos costumam acumular nas interfaces água/ar e água/óleo, bem como em superfícies ar/sólidos e líquido/sólidos resultando na redução das forças de repulsão entre as diferentes fases e permitindo que estas interajam, misturando-se mais facilmente e formando emulsões (SOBERÓN-CHÁVEZ, 2010).

Os biossurfactantes são principalmente classificados de acordo com sua estrutura química e pela origem microbiana (FAKRUDDIN, 2012), sendo divididos em dois grupos: de baixo peso molecular ou alto peso molecular (Tabela 1). Os de baixo peso molecular geralmente são glicolipídios, como a trealolipídios, soforolipídios e rhamnolipídios ou são lipopeptídeos, como surfactina, gramicidina S e polimixina. Os de alto peso molecular são polissacarídeos anfipáticos, proteínas, lipopolissacarídeos, lipoproteínas ou um complexo desses biopolímeros. Os emulsificantes de baixo peso molecular são mais eficientes em diminuir a tensões superficial e interfacial, enquanto as de alto peso molecular em estabilizar emulsões óleo e água (DESAI; BANAT, 1997; ROSENBERG; RON, 2013). Devidos a essas propriedades os biossurfactantes possuem amplas aplicações em áreas como agricultura, médica, farmacêutica, cosmética, alimentícia e biorremediação.

Tabela 1 - Biossurfactantes de baixo e alto peso molecular e seus microrganismos produtores.

	<b>Biossurfactante</b>	<b>Microrganismo produtor</b>	<b>Referência</b>
<b>Baixo Peso Molecular</b>	Rhamnolipídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Lang e Wullbrandt (1990)
	Trealolipídios	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Lang e Philip (1998)
	Soforolipídios	<i>Torulopsis bombicola</i>	Davila et al. (1997)
	Glicolipídios	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	Abraham et al. (1998)
	Vicosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Neu e Poralla (1990)
	Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>	Liu et al. (2010)
	Gramicidina S	<i>Bacillus brevis</i>	Katz e Demain (1977)
	Polimixinas	<i>Bacillus polymyxa</i>	Suzuki et al. (1965)
	Serrawettina	<i>Serratia marcescens</i>	Pruthi e Cameotra (1997)
	Lipopetídios	<i>Bacillus licheniformis</i>	Horowitz e Griffin (1991)
	Streptofactina	<i>Streptomyces tendae</i>	Richter et al. (1998)
	Ácido corinomicólico	<i>Nocardia erythropolis</i>	MacDonald et al. (1981)
	Fosfolipídio	<i>Acinetobacter spp.</i>	Kaeppli e Finnerty (1980)
Ácidos graxos	<i>Widespread</i>	MacDonald et al. (1981)	
<b>Alto Peso Molecular</b>	RAG-1 emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1	Rosenberg et al. (1979)
	BD4 emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> BD413	Kaplan e Rosenberg (1982)
	Alasan	<i>Acinetobacter radioresistens</i> KA53	Navon-Venezia et al. (1995)
	Glicoproteína	<i>Antartic bacterium</i>	Gutierrez et al. (2007)
	Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> A2	Rosenberg (1993)
	Mannana-lipídio-proteína	<i>Candida tropicalis</i>	Kaeppli et al. (1984)
	Liposan	<i>Candida lipolytica</i>	Cirigliano e Carman (1984)
	Emulsan 378	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Persson et al. (1988)
	Complexo proteico	<i>Methanobacterium</i> <i>thermoautotrophium</i>	De Acevedo e McInerney (1996)
	Inseticida Emulsificante	<i>Pseudomonas tralucida</i>	Appaiah e Karanth (1991)
	Emulsificante termofílico	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Gunjar et al. (1995)
	Acetilheteropolissacarídeo	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Ashtaputre e Shah (1995)
	Emulsificante de alimentos	<i>Candida utilis</i>	Shepherd et al. (1995)
	Polissacarídeo sulfatado	<i>Halomonas eurihalina</i>	Calvo et al. (1998)
	Fator PM	<i>Pseudomonas marginalis</i>	Burd e Ward (1996)
	Polissacarídeo extracelular	<i>Pseudomonas putida</i> ML2	Bonilla et al. (2005)
	Emulcian	<i>Phormidium</i> J-1	Fattom e Shilo (1985)

**Fonte:** Rosenberg e Ron (2013) modificada

Os biossurfactantes apresentam importantes funções para sobrevivência dos fungos e leveduras, como o aumento da biodisponibilidade de substratos hidrofóbicos, motilidade, adesão, sinalização e diferenciação celular, formação de biofilmes, competição por nichos, amensalismo, atividade antimicrobiana, fonte de armazenamento de carbono e comunicação microbiana. (RON; ROSENBERG, 2001; VAN HAMME; SINGH; WARD, 2006).

## 3.2 SOFOROLIPÍDIOS

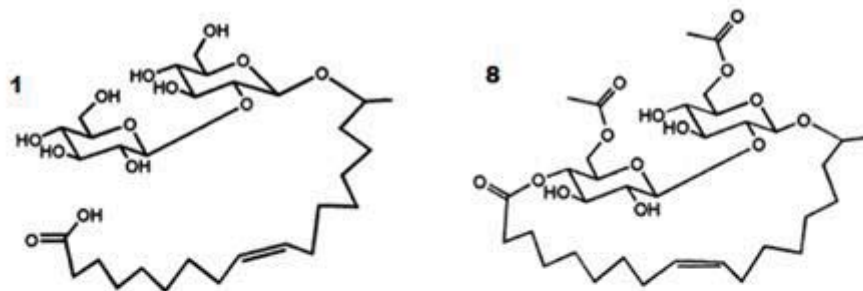
Os soforolipídios (SLP) são glicolipídios extracelulares, aniônicos e como surfactante, são moléculas anfifílicas que interagem entre as fases de sistemas heterogêneos, possuindo uma cabeça com um carboidrato e uma cauda lipídica.

### 3.2.1 Estrutura dos Soforolipídios

A molécula de soforolipídio é composta por uma cauda hidrofóbica de ácidos graxos, geralmente com 16 ou 18 carbonos (com uma ou mais insaturações) e uma cabeça hidrofílica contendo a sefarose, um dissacarídeo de glicose com uma ligação  $\beta$  - 1,2 (2'-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-1- $\beta$ -D-glicopiranosose) que pode ser acetilada nas posições 6' e/ou 6'' (ASMER et al., 1988; DAVILA et al. 1993; VAN BOGAERT et al., 2007). A cauda hidrofóbica da molécula está ligada glicosidicamente à sefarose, o que diferencia os soforolipídios dos alquilpoliglucosídios sintéticos, que apresentam uma ligação éster entre as porções hidrofílicas e hidrofóbicas da molécula (SOLAIMAN et al., 2014).

O grupo terminal carboxílico do ácido graxo pode estar livre que corresponde à cadeia aberta, que é a forma acídica (Figura 1.1) ou inteiramente esterificada no grupo 4'' (mais raramente 6' ou 6'') que é a forma lactônica (Figura 1.8), enquanto o terminal com ácidos graxos pode encontrar-se hidroxilados no carbono terminal  $\omega$  ou sub-terminal  $\omega$ -1 (KOSTER et al., 1995; RAU et al., 2001; NUÑEZ et al., 2001).

Figura 1 - Formas estruturais mais comuns de soforolipídios compostos por ácido graxo C18:1 produzidos por diferentes espécies de microrganismos

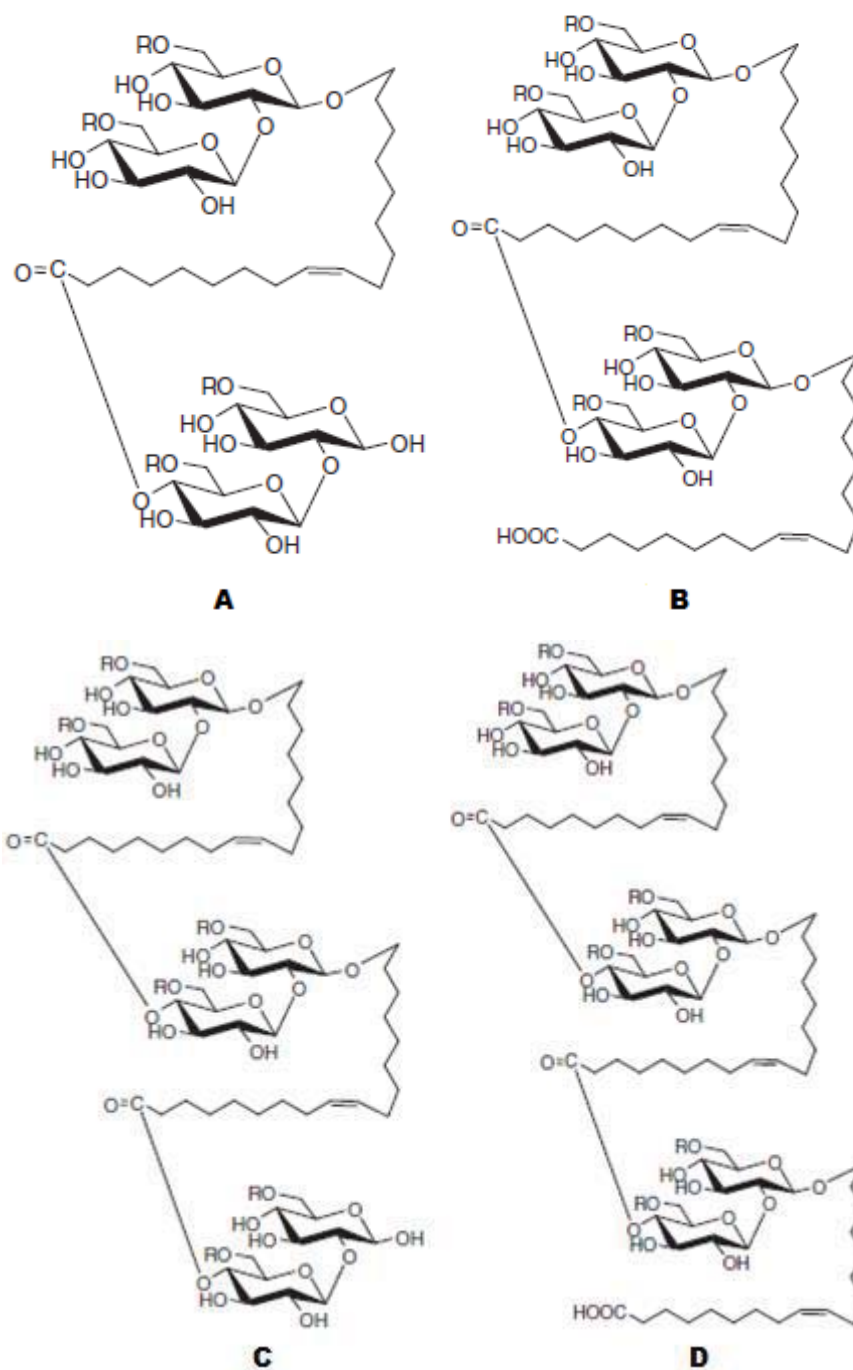


Composição	R'	R''	Forma	Notação	M <sub>r</sub>
1	H	H	Lactônica	Glc-Glc-1'4"-C18:1	604
2	H	H	Acídica	Glc-Glc-1'-C18:1	622
3	H	Acetil	Lactônica	GlcOAc-Glc-1'4"-C18:1	646
4	Acetil	H	Lactônica	Glc-GlcOAc-1'4"-C18:1	646
5	H	Acetil	Acídica	GlcOAc-Glc-1'-C18:1	664
6	Acetil	H	Acídica	Glc-GlcOAc-1'-C18:1	664
7	Acetil	Acetil	Lactônica	GlcOAc-GlcOAc-1'4"-C18:1	688
8	Acetil	Acetil	Acídica	GlcOAc-GlcOAc-1'-C18:1	706

Fonte: Koster et al. (1995) e Rau et al. (2001)

Geralmente são obtidos como uma mistura que pode ser constituída por 40 tipos diferentes de soforolipídios (SMYTH et al., 2010). Recentemente, Price et al. (2012) relatam a ocorrência também de soforolipídios na forma poliméricas diméricas (Figura 2-A, B) e triméricas (Figura 2-C, D) pela nova levedura *Candida* sp. NRRL Y-27208.

Figura 2 - Formas diméricas (A e B) e formas triméricas (C e D) de sofrorolípídios produzidos por *Candida* sp. NRRL Y-27208.



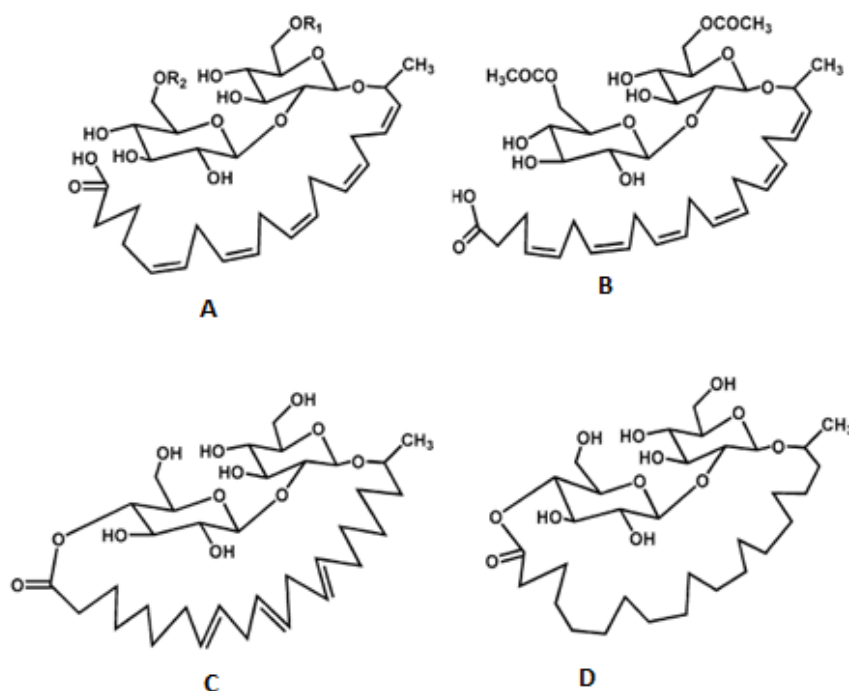
Fonte: Price et al. (2012).

Microrganismos sintetizam diversos perfis de sofrorolípídios, a *Candida bombicola* se destaca por produzir principalmente sofrorolípídios na forma lactônica, diacetilados (posição 6', 6'') com cadeias de ácidos graxos monoinsaturados com 16 ou 18 átomos de carbono, em uma menor proporção,

formas ácidas não acetiladas ou monoacetiladas (posição 6'') (ASMER et al., 1988; SOLAIMAN et al., 2004). A *Candida apicola* é uma espécie próxima filogeneticamente da *C. bombicola* e dessa forma os glicolipídios e as características de produção são muito semelhantes (SPENCER; GORIN; TULLOCH, 1970). Enquanto, a *Candida batistae* produz sofrorolipídios ácidos C18:0 diacetilados em maiores quantidades que a forma lactônica (KONISHI et al., 2008).

A levedura *Wickerhamiella domercqiae* Y2A produz até 19 tipos diferentes de sofrorolipídios com C18:0, C18:1, C18:2, C16:0, C16:1, C16:2 na forma lactônica e ácidas monoacetiladas, diacetiladas e não acetiladas, sendo a forma lactônica produzida em menor quantidade (CHEN et al., 2006a; MA et al., 2011). No entanto, a *W. domercqiae* Y2A (LI et al., 2013), quando cultivada com óleo de peixe, que é rico em ácidos graxos poli-insaturados, é capaz de produzir alguns sofrorolipídios não convencionais de cadeias longas, como: SLP ácidos não- mono- e diacetilado C20:5 n-3 (Figura 3.A); SLP ácido diacetilado C22:6 n-3 (Figura 3-B); SLP não acetilado lactônico C22:3 n-8 (Figura 3-C) e SLP não acetilado lactônico 20:0 (Figura 3-D).

Figura 3 – Sofrorolipídios não convencionais produzidos por cepa *Wickerhamiella domercqiae* var. CGMCC 1576.



Fonte: Li et al. (2013).

Os SLP produzidos por *Rhodotorula bogoriensis* são característicos por apresentarem cadeias de ácidos graxos maiores que C18, as formas predominantes são de ácidos graxos C22:0 e pequenas quantidades de C24:0 e somente na forma acídica, pois não apresentam as cadeias de ácidos graxos terminais ou subterminais, apresentam hidroxilação interna e subsequentemente vinculadas (NUÑEZ et al., 2004).

### 3.2.2 Biossíntese de Soforolipídios

Os sofrorolipídios são metabólitos secundários e sua biossíntese ocorre na presença de um substrato hidrofílico (glicose) e um lipofílico (alcanos, ésteres, álcoois, aldeídos e ácidos graxos). Inicialmente é necessário a disponibilização dos ácidos graxos a partir dos substratos lipofílicos, encontrados no meio. Segundo a Figura 4, na presença de triacilgliceróis as lipases liberaram os ácidos graxos (Etapa 1) e quando a síntese ocorre a partir de alcanos há enzimas específicas que oxidam o alcano ao seu ácido graxo correspondente (Etapa 2) (COOPER; PADDOCK, 1984; CAVALERO; COOPER, 2003; VAN BOGAERT; ZHANG; SOETAERT, 2011; OLIVEIRA et al., 2014)

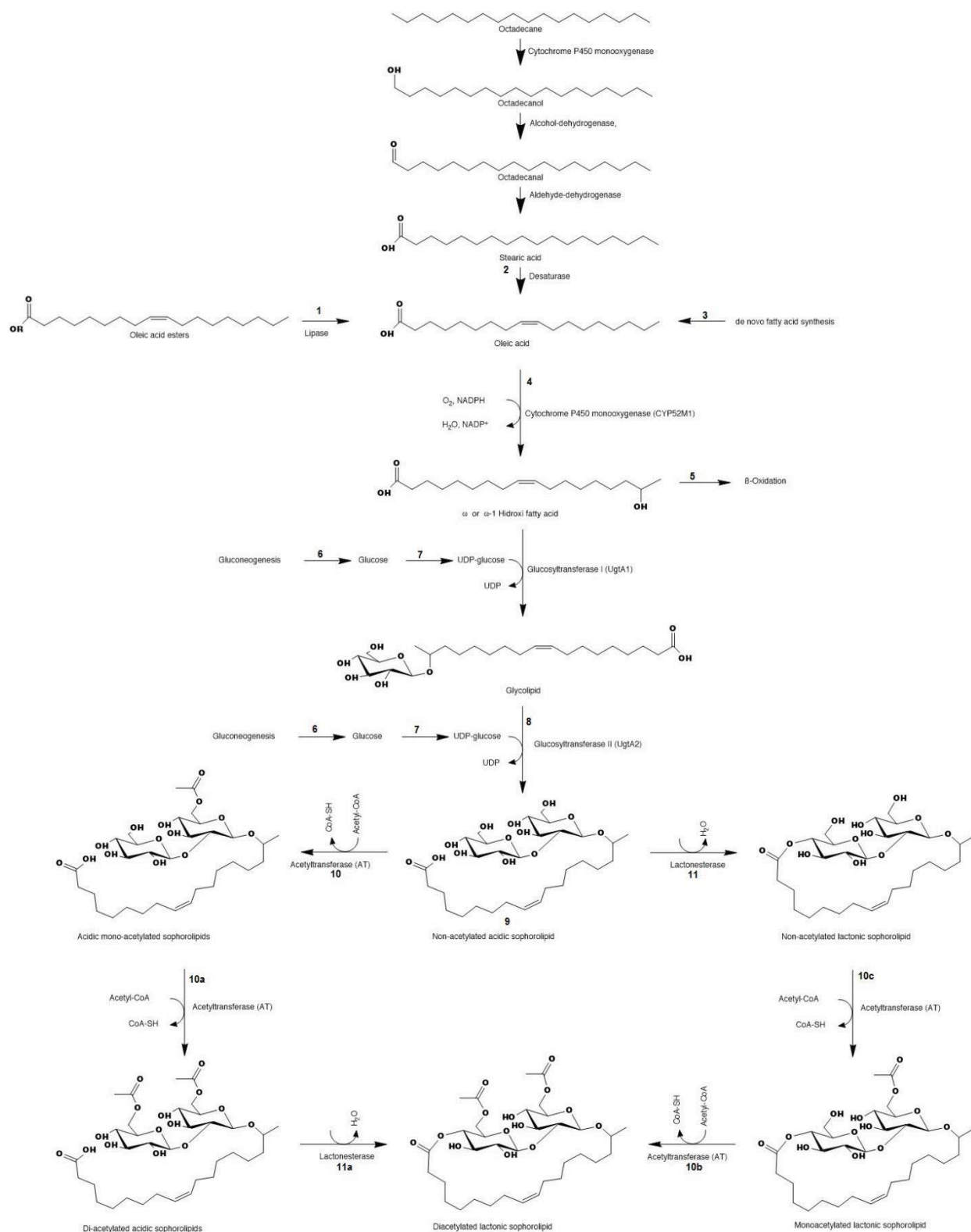
Após a liberação dos ácidos graxos há duas vias possíveis para esses produtos serem hidroxilados:

- Síntese de novo: o ácido graxo entra na via de  $\beta$ -oxidação e o substrato oxidado libera um Acetil-CoA por volta. O Acetil-CoA está envolvido em várias rotas, mas aqui será destinado a formação de uma nova cadeia longa de ácidos graxos, que então será hidroxilado e incorporado ao SLP (Etapa 3);
- Incorporação direta: não ocorre a oxidação do substrato via  $\beta$ -oxidação, em vez disso é imediatamente hidroxilado. O resultado é um ácido graxo hidroxilado com o mesmo comprimento da cadeia do substrato e que então será incorporado no SLP (CAVALERO; COOPER, 2003; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2010).

Ao contrário dos ácidos graxos, não há evidências da incorporação direta de açúcares nos glicolipídios. Göbbert, Lang e Wagner (1984) observaram que, independente do açúcar utilizado como substrato (glicose, frutose, manose, sacarose, maltose e rafinose) a porção hidrofílica do SLP é sempre a sefarose. Hommel et al. (1994) realizaram experimentos com glicose marcada  $^{13}\text{C}$  e os resultados indicaram que grande parte da glicose disponível no meio é metabolizada pela via glicolítica, assim, a glicose adicionada nos soforolipídios é proveniente da gliconeogênese (Etapa 6).

Se não houver uma fonte hidrofóbica no meio, os ácidos graxos serão formados por *síntese de novo* e se a concentração de glicose for baixa, parte dos ácidos graxos serão utilizados para a manutenção celular em vez de síntese de SLP (VAN BOGAERT et al, 2007).

Figura 4 – Esquema da biossíntese dos sofrorolipídios.



Fonte: Oliveira et al. (2014).

Na etapa 4 os ácidos graxos serão hidroxilados no carbono terminal ( $\omega$ ) ou subterminal ( $\omega-1$ ), esta hidroxilação é realizada pela ação da enzima citocromo P450 mono-oxigenase NADPH dependente que pertence à família CYP52, ligada a membrana celular. Esses podem ser metabolizados via  $\beta$ -oxidação (Etapa 5) ou atuar como precursor para a síntese de soforolipídios (HOMMEL et al., 1994; VAN BOGAERT et al., 2009; VAN BOGAERT; ZHANG; SOETAERT, 2011).

Na etapa 7, primeira molécula de glicose é ligada ao grupo hidroxila do ácido graxo através da glicosiltransferase I no C1'. Em um passo subsequente, a segunda glicose é adicionada ao C2'' pela glicosiltransferase II (Etapa 8) (VAN BOGAERT et al., 2007) e ambas as enzimas utilizam UDP-glicose como substrato (ESDERS; LIGHT, 1972). Como resultados são obtidos os SLP acídicos não acetilados (Etapa 9).

Esses SLP podem sofrer modificações por esterificações internas (lactonização) e acetilações. A acetilação da sefaroze nas posições C6' e C6'' são mediadas por uma acetil transferase dependente de Acetil-CoA (Etapa 10; 10a; 10b e 10c). A lactonização do SLP ocorre pela reação de esterificação do grupo carboxila do ácido graxo com o grupo hidroxila da sefaroze. A maioria das formas lactônicas são esterificadas na posição 4'', enquanto uma pequena parte é esterificada nas posições 6' ou 6'' (Etapas 11; 11a) pela enzima lactonaesterase que se encontra ligada a parede celular (CIESIELSKA et al., 2014).

### 3.2.3 Propriedades dos Soforolipídios

A mistura das formas acídicas e lactônicas, os diferentes graus de acetilação, o comprimento da cadeia de ácido graxo, saturações e posição de hidroxilações influenciam as propriedades físicas, químicas e biológicas dos soforolipídios (GLENNIS; COOPER, 2006; ASHBY; SOLAIMAN; FOGLIA, 2008).

Em relação às propriedades tensoativas, quando os SLP estão em água, diminuem a tensão superficial de 72,80 mN/m para aproximadamente 40-30 mN/m, a concentração micelar crítica (CMC) de 11 a 250 mg L<sup>-1</sup> e o balanço hidrofílico/lipofílico de 10 a 13, indicando que podem ser aplicados como detergentes e estabilizantes de emulsões óleo/água (VAN BOGAERT et al., 2007).

Quando são analisadas as propriedades das formas lactônicas e acídicas, observa-se diferenças biológicas e físico-químicas (VAN BOGAERT et al, 2007). Soforolipídios lactônicos diacetilados apresentam uma estrutura muito rígida, sendo mais hidrofóbicos, com melhor redução da tensão superficial e formando cristais (SOBERÓN-CHÁVEZ, 2010). Os SLP acídicos formam um óleo viscoso marrom, com melhor ação espumante e maior solubilidade em água (HIRATA et al., 2009b), sendo mais apropriados para uso nas indústrias de alimentos, cosméticos e biorremediação (MA et al., 2011).

A presença de grupos acetil afeta as propriedades, levando à diminuição da hidrofiliidade (SHAH et.al., 2005) e do CMC (OTTO et al., 1999). O CMC e a tensão superficial mínima têm relação inversa, com o aumento da cadeia ocorre a diminuição de até 50%, por adição de cada CH<sub>2</sub> (GLENNS; COOPER, 2006).

Os soforolipídios podem diminuir as tensões superficial e interfacial, porém não são bons agentes emulsificantes (COOPER; PADDOCK, 1984). Entretanto, Ma, Li e Song (2012) verificaram que SLP de cadeias de ácidos graxos longas (C>18) possuem capacidade de emulsificação melhor do que os de cadeias mais curtas.

Os soforolipídios apresentam alta eficiência como surfactantes em baixas concentrações e apresentam baixa citotoxicidade em suas concentrações efetivas (HIRATA et al., 2009a), o que os capacitam em diferentes aplicações. Estudos de Krivobok et al. (1994) demonstraram que esses apresentam baixa citotoxicidade para fibroblastos humanos, para queratinócitos humanos linhagem celular HPK II (OTTO et al., 1999) e para queratinócitos epidérmicos humanos normais (HIRATA et al, 2009a).

### 3.3 MICRORGANISMOS PRODUTORES

Os primeiros pesquisadores a descreverem uma nova classe de glicolipídios extracelulares foram Gorin, Spencer e Tulloch (1961) produzidos pela levedura osmofílica *Torulopsis magnoliae*, uma cepa isolada a partir das pétalas de serralha (*Sonchus oleraceus*). Esse glicolipídio se caracterizou como óleo mais leve que a água e composto por unidades de dissacarídeo 2-O- $\beta$ -D-glicopiranosil- $\beta$ -glicopiranosose (sefaroose), parcialmente acetilado, ligados através de uma ligação  $\beta$ -glicosídica aos ácidos 17-L-hidróxi-octadecanóico e 17-L-hidróxi-9-hidróxi-octadecenoico (GORIN; SPENCER, TULLOCH, 1961; TULLOCH; SPENCER; GORIN, 1962). No entanto, essa cepa atualmente é conhecida como *Candida apicola*.

Na mesma década duas novas cepas foram descobertas como produtoras de glicolipídios. Jones, em 1967, detectou na levedura *Torulopsis gropengiesseri*, um glicolipídio extracelular estruturalmente diferente do produzido por *T. magnoliae* (GORIN; SPENCER, TULLOCH, 1961), apresentando forma cristalina, na qual a sefaroose era parte integrante de um anel macrocíclico (JONES, 1967). Em 1968, Tulloch, Spencer e Deinema descreveram uma nova levedura produtora de soforolipídios *Candida bogoriensis* (atualmente conhecida como *Rhodotorula bogoriensis*) isolada de folhas do arbusto de *Randia malleifera*.

Spencer, Gorin e Tulloch (1970) identificaram a levedura *Torulopsis bombicola* como produtora de soforolipídios (atualmente conhecida como *Candida bombicola*) em amostras de néctar coletadas de flores silvestres de regiões do Canadá. Cooper e Paddock (1983), em seus estudos, com *Torulopsis petrophilum* demonstraram que essa cepa foi capaz de sintetizar glicolipídios semelhantes aos produzidos por *Torulopsis bombicola* e também uma proteína emulsificante.

Chen et al. (2006b) identificaram uma levedura isolada de águas residuais contaminadas com óleo, a *Wickerhamiella domercqiae* Y2A, como produtora de soforolipídios com a estrutura de 17-L-hidróxi-octadecanóico, 1,4''

lactônica, 6',6'' diacetilado, que são semelhantes ao principal SLP produzido por *C. bombicola* e *C. apicola*.

Em 2008 a cepa de levedura termotolerante, *Pichia anomala* PY1, foi isolada do alimento fermentado tailandês (Khao Mhak) e descrita como produtora de soforolipídios (THANIYAVARN et al., 2008). Neste mesmo ano Konish et al. (2008) descreveram a *Candida batistae* CBS 8550 como produtora de soforolipídios. Em 2010, Kurtzman et al. identificaram outras três espécies produtoras de soforolipídios que foram *Candida riodeocensis*, *Candida stellata* e *Candida* sp. NRRL Y-27208 e em 2012, Kurtzman relatou que essa cepa é uma nova espécie de *Candida kuoi*.

O solo contaminado com petróleo na Índia foi fonte de estudos dos pesquisadores Chandran e Das, que isolaram três espécies produtoras de soforolipídios, *Candida rugosa*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Candida tropicalis* (CHADRAN; DAS, 2011; CHADRAN; DAS 2012). Ainda na Índia, em plantas de tratamento de efluentes uma cepa de *Cryptococcus* sp. foi isolada como produtora de SLP (BASAK; DAS, 2014). A Tabela 2 lista diferentes tipos de microrganismos produtores de SLP.

Tabela 2 – Microrganismos produtores de soforolipídios

<b>Microrganismo</b>	<b>Referência</b>
<i>Candida apicola</i>	Spencer et al., 1961
<i>Torulopsis gropengiesseri</i>	Jones, 1967
<i>Rhodotorula bogoriensis</i>	Tulloch et al., 1968
<i>Candida bombicola</i>	Spencer et al., 1970
<i>Torulopsis petrophilum</i>	Cooper e Paddock, 1983
<i>Wickerhamiella domercqiae</i> Y2A	Chen et al., 2006a
<i>Pichia anomala</i> PY1	Thaniyavarn et al. 2008
<i>Candida batistae</i>	Konish et al. 2008
<i>Candida riodeocensis</i>	Kurtzman et. al, 2010
<i>Candida stellata</i>	Kurtzman et. al, 2010
<i>Candida kuoi</i> ( <i>Candida</i> sp. NRRL Y-27208)	Kurtzman et. al, 2010; Kurtzman, 2012
<i>Candida floricola</i> TM1502	Imura et al., 2010
<i>Candida rugosa</i>	Chandran e Das, 2011
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Chandran e Das, 2011
<i>Candida tropicalis</i>	Chandran e Das, 2012
<i>Cryptococcus</i> sp. VITGBN2	Basak e Das, 2014

**Fonte:** Elaborada pelo próprio autor

### 3.3.1 *Candida bombicola*

Classificação taxonômica completa da *Candida bombicola* (NCBI Taxonomy Browser, 2013):

Domínio:	Eukaryota
Reino:	Fungi
Sub-reino:	Dikarya
Filo:	Ascomycota
Sub filo:	Saccharomycotina
Classe:	Saccharomycetes
Sub classe:	Saccharomycetidae
Ordem:	Saccharomycetales
Família:	Saccharomycetaceae
Gênero:	<i>Starmerella</i>
Espécie:	<i>Candida bombicola</i> - Forma anamórfica <i>Starmerella bombicola</i> - Forma teleomórfica

A primeira cepa de *Candida bombicola* foi isolada e descrita por Spencer, Gorin e Tulloch em 1970 a partir do mel e néctar de *Bombus* sp. (abelha mamangaba), porém, na época esses autores a identificaram como do gênero *Candida*. No entanto, anos depois, Rosa e Lachanche (1998) encontraram diferenças filogenéticas a partir de estudos baseados nos domínios D1/D2 do gene LSU rRNA e propuseram a criação do gênero *Starmerella* para acomodar a forma teleomórfica (estágio sexual) de *Candida bombicola*.

As leveduras pertencentes ao gênero *Starmerella*, assim como a *Candida bombicola*, estão associadas a abelhas, seus habitats e substratos relacionados, dessa forma sugerindo a existência de uma interação mutualística entre eles (ROSA et al., 2003).

### 3.4 FATORES QUE ATUAM NA PRODUÇÃO DE SOFOROLIPÍDIOS

Os soforolipídios são metabólitos secundários e sua biossíntese ocorre principalmente na fase estacionária de forma dissociada ao crescimento celular (COOPER; PADDOCK, 1984; KIM; YUN; KIM, 2009). O tipo e a quantidade de soforolipídios produzidos são influenciados por fatores como microrganismo utilizado, composição do meio (fontes de carbono, fonte de nitrogênio e sais), condições ambientais (temperatura, agitação e pH) e tipo do processo fermentativo utilizado (TULLOCH; SPENCER; GORIN, 1962; DAVILA; MARCHAL; VANDECASTEELE, 1992).

As fontes de carbono para a síntese de soforolipídios desempenham dois papéis no processo fermentativo, que é gerar de energia e servir de substrato para a biossíntese. Os cultivos são realizados com uma fonte hidrofílica (carboidratos) e uma hidrofóbica (lipídios, hidrocarbonetos, óleos vegetais e gorduras animais) e os melhores resultados foram obtidos a partir de meios com as duas fontes de carbono combinadas (COOPER; PADDOCK, 1984; HOMMEL et al, 1994; RAU et al., 2001). A influência positiva das duas fontes ocorre porque cada uma é importante para a síntese de uma das partes (hidrofóbica e hidrofílica) da molécula do soforolipídio (BAJAJ; TILAY; AMAPURE, 2012).

Quando está disponível apenas uma das fontes de carbono a produção de soforolipídios é baixa (COOPER; PADDOCK, 1984). A *Candida bombicola* é capaz de sintetizar tanto a porção hidrofílica quanto a hidrofóbica a partir de uma fonte de carbono (ZHOU; KOSARIC, 1995).

Dentre os carboidratos empregados na produção de soforolipídios destacam-se a glicose, sacarose, frutose, manose, maltose, rafinose, lactose, galactose, xilose. A glicose é a principal fonte de carbono hidrofílica utilizada na produção de SLP e para os outros mono e dissacarídeos o nível de produção de SLP normalmente é menor (GÖBERT; LANG; WAGNER, 1984; ZHOU; KOSARIC, 1993; RISPOLI; BADIA; SHAH, 2010; BAJAJ; TILAY; ANNAPURE, 2012). A fonte de carbono hidrofílica utilizada não altera a estrutura

da porção hidrofílica (GÖBERT; LANG; WAGNER, 1984) e não influencia na composição final dos sofrorolipídios (KLEKNER; KOSARIC; ZHOU, 1991; RIBEIRO et al., 2013).

Zhou e Kosaric (1993) com *C. bombicola* utilizaram fontes hidrofílicas a glicose, sacarose, galactose e lactose como fonte hidrofóbica o óleo de oliva na produção de SLP. As produções foram 136,6 g L<sup>-1</sup>, 58,32 g L<sup>-1</sup>, 46,46 g L<sup>-1</sup> e 24,41 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. Quando o meio continha apenas lactose, não houve crescimento celular, porém no meio com lactose e óleo de oliva ocorreu a produção de SLP, demonstrando que a *C. bombicola* não é capaz de consumir lactose devido à ausência de um sistema transportador de lactose e/ou da enzima galactosidase.

Bajaj, Tilay e Annaupere (2012) avaliaram glicose, sacarose, maltose, lactose, frutose e xilose na produção de sofrorolipídios. As melhores produções foram 11,83 g L<sup>-1</sup> em glicose, 8,46 g L<sup>-1</sup> em sacarose, e para as outras fontes a produção não ultrapassou 6,0 g L<sup>-1</sup>.

As fontes hidrofóbicas influenciam fortemente na estrutura dos SLP quanto a cadeia de ácido graxo que será incorporado na molécula, bem como nas formas acídicas e lactônicas.

Felse et al. (2007) avaliaram como fontes de carbono hidrofóbicas os ácidos graxos: mirístico (C14), palmítico (C16), esteárico (C18), oleico (C18:1), linoleico (C18:2), linolênico (C18:3) e eicasonóico (C20). As maiores produções ocorreram com ácidos graxos C16 e C18 e as menores com os C14 e C20. Os autores observaram que o grau de insaturação afetou a produção de sofrorolipídios, pois ácidos graxos monoinsaturados (C18:1) resultaram em alta produção e os ácidos graxos com 2 (C18:2) ou 3 (C18:3) insaturações levaram a diminuição na produção.

Davila, Marchal e Vandecasteele (1994) produziram sofrorolipídios utilizando n-alcanos, óleo animal e óleo vegetal e seus respectivos ésteres como fontes hidrofóbicas. A melhor produção foi de 340 g L<sup>-1</sup> utilizando óleo de canola, que é um substrato rico em ácidos graxos C18:1. Dentre os substratos testados as maiores produções foram nos que continham maiores

concentrações de C16 e C18, que são incorporados diretamente na molécula de SLP. A maior parte dos substratos com C12 e C14 foi metabolizada e uma menor quantidade foi incorporada diretamente na molécula. No entanto, quando a cadeia de ácidos graxos possui mais de duas insaturações eles não são incorporados.

A presença de n-alcenos (hexadecano, heptadecano ou octadecano) na produção de SLP estimulam a produção em até 85% de SLP na forma lactônica desacetilada (STÜWER et al., 1987; DAVILA; MARCHAL; VANDECASTEELE, 1997; CAVALERO; COOPER 2003).

BRAKEMEIER et al. (1995) adicionaram álcoois secundários com cadeias de C12 a C16 como fontes de carbono e obtiveram soforolipídios com a porção hidrofóbica correspondente ao álcool utilizado como substrato. A adição de 2-dodecanol resultou em 88% de incorporação direta do substrato ao soforolipídios (BRAKEMEIER; WULLBRANDT; LANG, 1998).

Os soforolipídios são produzidos no final da fase exponencial e início da fase estacionária sob condições limitantes de nitrogênio (CASAS, LARA, GÁRCIA-OCHOA, 1997; RAU et al. 2001). A limitação de nitrogênio leva a um aumento da atividade das enzimas envolvidas na biossíntese de soforolipídios (ZHOU; KOSARIC, 1995; RAU et al., 2001; VEDARAMAN; VENKATESH, 2010).

Para a produção de soforolipídios os microrganismos metabolizam fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio. As fontes inorgânicas estudadas na produção de SLP foram  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (MCCAFFREY; COOPER, 1995),  $\text{NaNO}_3$  (RIBEIRO et al., 2013),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (RAU et al., 2001),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (KURTZMAN et al., 2010). Entretanto, essas fontes inorgânicas são desfavoráveis para a produção de SLP devido à falta de outros elementos essenciais como ácido pantotênico, tiamina, pirodoxina (ZHOU; KLEKNER; KOSARIC, 1992).

Entre as fontes de nitrogênio orgânicas estudadas encontram-se o extrato de levedura (CASAS; GARCÍA-OCHOA, 1999), extrato de malte, peptona bacteriológica, peptonas de soja (RISPOLI; BADIA; SHAH, 2010),

extrato de malte (SHAH; PRABHUNE, 2007) e milhocina (DAVILA et al. 1994). O extrato de levedura foi determinado como a melhor fonte de nitrogênio para a produção de soforolipídios e biomassa por Casas, Lara e García-Uchoa (1997), que uma é fonte de vitaminas, elementos traços como zinco, magnésio, ferro entre outros.

A concentração ótima de extrato de levedura não está definida, no entanto altas concentrações de extrato de levedura é favorável para o desenvolvimento da biomassa, mas diminui a produção de soforolipídios, devido ao esgotamento das fontes de energia pelo crescimento celular (CASAS; GARCÍA-OCHOA, 1999). Diferentes valores de concentração de extrato de levedura são apresentados na produção de SLP, como 1 g L<sup>-1</sup> (CASAS; GARCÍA-OCHOA, 1999), 2 g L<sup>-1</sup> (DAVERY; PAKSHIRJAN, 2010), 3 g L<sup>-1</sup> (ZHOU; KLEKNER; KOSARIC, 1992), 4 g L<sup>-1</sup> (ZHOU; KOSARIC, 1995; VEDARAMAN; VENKATESH, 2010) e 5 g L<sup>-1</sup> (COOPER; PADDOCK, 1984).

Bajaj, Tilay e Annapure (2012) avaliaram a influência de diferentes fontes nitrogênio orgânicas e inorgânicas na síntese de SLP por *C. bombicola* em meio contendo 10% de glicose e 10% de ácido oleico e a melhor combinação foi extrato de levedura a 1% e ureia a 0,1% com 23,2 g L<sup>-1</sup> de produção.

As fontes de nitrogênio, além da produção também influenciam no balanço de formas lactônicas/ácidas de soforolipídios sintetizadas. A fonte de nitrogênio inorgânica NaNO<sub>3</sub> estimula a produção de soforolipídios ácidos diacetilados, devido ao prolongamento da fase exponencial na presença desse sal (RIBEIRO et al., 2013). Concentrações de extrato de levedura a partir 5 g L<sup>-1</sup> estimulam a formação de SLP ácidos (CASAS; GARCÍA-OCHOA, 1999), nos estudos de Zhou e Kosaric (1995), 4 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura levaram à maiores produções de SLP lactônicos diacetilados.

A alteração do pH durante o crescimento de *Candida bombicola* e produção de soforolipídios é caracterizado por uma queda para valores entre 2,6 e 4,0. Esta diminuição do pH é promovida pelo consumo da fonte de

nitrogênio e geração de ácidos graxos (ALBRECHT; RAU; WAGNER, 1996; ASHBY; SOLAIMAN; FOGLIA, 2008; DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2009a).

O pH ótimo para a produção de soforolipídios foi descrito em 3,5 durante a fermentação e o pH inicial mantido entre 5,0 e 6,0 para promover o crescimento celular. Posteriormente, durante a fase estacionária o pH foi mantido 3,5 para estimular produção de soforolipídios (GÖBBERT; LANG; WAGNER, 1984; DAVILA; MARCHAL; VANDECASTEELE, 1997; DANIEL et al., 1999; HU; JU, 2001; MORYA et al., 2013). Quando o pH é controlado pode promover um aumento de até 27,6% na produção de soforolipídios (DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2010), porém, alguns trabalhos não controlaram o pH devido à queda natural para valores mais ácidos durante a fase estacionária (BAJAJ; TILAY; ANNAPURE, 2012).

A temperatura ótima para a produção de soforolipídios por *T. bombicola* foi determinada por Göbbert, Lang e Wagner (1984) sendo de 21°C, porém, os autores sugeriram que fossem utilizadas temperaturas mais elevadas, para facilitar a retirada de amostras e adição de óleos. Outros autores descrevem fermentações entre 25°C a 30°C, nessas temperaturas os teores de soforolipídios não se alteram. A temperatura de 30°C estimulou o crescimento celular e o consumo de substratos (CASAS; GARCIA-OCHOA, 1999; VEDARAMAN, VENKATESK, 2010).

O suprimento de oxigênio também é um fator importante no processo fermentativo, pois leveduras são sensíveis à limitação de oxigênio durante a fase exponencial de crescimento (GUILMANOV et al. 2002). Na fase estacionária, a oxigenação é essencial na produção de soforolipídios, pois a enzima envolvida na biossíntese, a citocromo P450 mono-oxigenase, necessita de oxigênio molecular para sua atividade (VAN BOGAERT; ZHANG; SOETAERT, 2011). Altas concentrações de substratos nos cultivos ocasionam taxas de transferências de oxigênio insuficiente e afetam tanto o crescimento celular quanto a produção de SLP (VEDARAMAN; VENKATESH, 2010). Guilmanov et al. (2002) investigaram o efeito da aeração em frascos de Erlenmeyer e verificaram que, geralmente, níveis mais altos de oxigenação

resultaram no aumento da produção. As condições ótimas de aeração foram entre 50-80mM O<sub>2</sub>/L h<sup>-1</sup>.

Além disso, as condições de aeração podem influenciar na proporção dos diferentes SLP, sendo que menores níveis de oxigenação durante o processo fermentativo contribuem para o aumento da porção lipídica saturada do SLP (GUILMANOV et al., 2002). Altos níveis de aeração, levam a ausência de formas desacetiladas, altas proporções de formas diacetiladas e aumento das formas lactônicas (RATSEP; SHAH, 2009).

O tipo de processo fermentativo influencia na produção de soforolipídios, podendo ser utilizados processos fermentativos em batelada, batelada alimentada e contínua. A produção em batelada em frascos agitados não é o mais produtivo, porém é ideal para estudos iniciais em pequena escala. (GUILMANOV et al. 2002; KIM; YUN; KIM, 2009) ou em larga escala em biorreatores (DANIEL et al. 1999, SHAH; JURJEVIC; BADIA, 2007).

As maiores produções de soforolipídios encontradas na literatura foram realizadas em biorreatores por batelada alimentada, sendo obtidos valores de 300 g L<sup>-1</sup> (RAU et al., 2001), 365 g L<sup>-1</sup> (KIM et al., 2009) e maiores que 400 g L<sup>-1</sup> (OTTO et al., 1999; PEKIN, VARDAR-SUKAN, KOSARIC, 2005).

### 3.5 RESÍDUOS INDUSTRIAIS

A substituição dos surfactantes químicos por moléculas de origem biológica só será viável se forem desenvolvidos processos mais econômicos de produção (FELSE et al., 2007). Geralmente, o custo das matérias-primas contribui em até 75% do preço dos bioprodutos, e para os soforolipídios competirem com um surfactante químico, que é mais viável, é importante o meio de fermentação mais competitivo e com alto rendimento para a produção. (DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2009a). Além disso, baseando na proteção ambiental e na economia de processos, os resíduos e subprodutos

utilizados como substratos nos cultivos devem ser renováveis e localmente disponíveis em grandes quantidades, para obtenção de uma produção sustentável (RAU et al., 2001).

A Tabela 3 compila pesquisas que utilizaram resíduos e/ou subprodutos, como fontes de carbono hidrofílica ou hidrofóbica para produção de soforolipídios por *Candida bombicola*.

Daverey e Pakshirajan (2009b) utilizaram melaço de cana de açúcar e diferentes óleos vegetais (óleo de oliva, girassol e soja) para produzir SLP. A melhor combinação foi do melaço de soja com óleo de soja atingindo a produção de 23,25 g L<sup>-1</sup> com 120h, que é valor próximo da produção do cultivo controle (glicose e óleo de soja) que atingiu 29,37 g L<sup>-1</sup>,

O resíduo escolhido nas pesquisas de Solaiman et al (2007) foi melaço de soja, atingindo uma produção de 75 g L<sup>-1</sup> no cultivo contendo o melaço de soja e ácido oleico como co-substratos.

Daniel et al. (1998) obtiveram um alto rendimento, de 280 g L<sup>-1</sup>, de soforolipídios usando meio contendo soro de queijo desproteínizado, extrato de levedura e óleo de canola em biorreator. No entanto, a lactose não foi consumida e não houve presença de atividade da  $\beta$  galactosidase no sobrenadante ou no extrato de células.

Deshpande e Daniels (1995) utilizaram gordura de porco como fonte de carbono hidrofóbica e millhocina como fonte de nitrogênio, que são substratos mais econômicos que os óleos vegetais e extrato de levedura, que normalmente são usados. A fermentação foi realizada em biorreator e eles obtiveram 120 g L<sup>-1</sup> de soforolipídios em 68h de cultivo.

Shah, Jurjevic e Badia (2007) investigaram a habilidade *C. bombicola* produzir o SLP a partir do resíduo de óleo de restaurante. A fermentação foi desenvolvida em batelada e obtiveram 34 g L<sup>-1</sup> do glicolipídio.

Daverey, Pakshirajan e Sumalatha (2010) utilizaram como meio de cultivo água residuária de indústria de laticínios. A produção máxima foi de

62 g L<sup>-1</sup> quando esse substrato foi suplementado com glicose, extrato de levedura e óleo de soja.

Tabela 3 – Resíduos e subprodutos para a produção de SLP e as melhores produções descritas por diferentes autores.

<b>Referência</b>	<b>Fonte hidrofílica</b>	<b>Fonte hidrofóbica</b>	<b>Produção de Soforolipídios (g L<sup>-1</sup>)</b>
Ashby et al., 2005	Glicerol	Resíduo da indústria de biodiesel	60,00
Ashby; Solaiman; Foglia, 2006	Glicerol	Óleo de soja + metanol	46,00
Daniel et al., 1999	Soro de leite desproteínizado	Óleo de canola	280,00
Daverey; Pakshirajan, 2009 <sup>a</sup>	Melaço de cana de açúcar	Óleo de soja	23,25
Daverey; Pakshirajan, 2009 <sup>b</sup>	Melaço de cana de açúcar	Óleo de soja	63,67
Daverey; Pakshirajan; Sangeetha, 2009	Água residuária indústria de laticínio sintética + Melaço de soja	Óleo de soja	38,76
Daverey; Pakshirajan; Sumalatha, 2010	Água residuária de indústria de laticínio	Óleo de soja	62,00
Davila; Marchal; Vandecasteele, 1994	Glicose	Óleo de peixe	51,00
Desphande; Daniels, 1995	Glicose	Gordura animal (porco)	120,00
Felse et al., 2007	Glicose	Sebo	≈ 120,00
Fleurackers, 2006	Glicose	Óleo de fritura	49,00
Shah; Jurjevic; Badia, 2007	Glicose	Óleo de fritura	34,00
Solaiman et al., 2004	Melaço de soja	Ácido oleico	75,00
Solaiman et al., 2007	Melaço de soja	Ácido oleico	75,00
Wadekar et al., 2012 <sup>b</sup>	Glicose	Óleo de fritura	4,26
Konish; Yoshida; Horiuchi, 2015	Hidrolisado de palha de milho	Óleo de oliva	49,29

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

### 3.6 APLICAÇÕES DOS SOFOROLIPÍDIOS

Os sofrorolipídios são particularmente atrativos para produção e uso comercial por serem sintetizados em altas concentrações por leveduras não patogênicas (VAN BOGART et al., 2007), produzidos a partir de recursos renováveis (CAVALERO; COOPER, 2003), resíduos industriais (DESHPANDE; DANIELS, 1995; ASHBY et al., 2005; SOLAIMAN et al., 2007), e de fácil

recuperação (KITAMOTO; ISODA; NAKAHARA, 2002). Além disso apresentam vantagens sobre os surfactantes químicos, como atoxicidade e biodegradabilidade (PULATE; BHAGWAT; PRABHYNE, 2012).

Na área de biorremediação, os biossurfactantes têm a capacidade de melhorar esse processo, aumentando a área de superfície e a biodisponibilidade dos contaminantes (RON; ROSENBERG, 2002; SINGH; VAN HAMME; WARD, 2007). Em solos contaminados com fenantreno, os soforolipídios foram capazes de remover 71% desse contaminante em 4 dias (SCHIPPERS et al., 2000).

Os soforolipídios demonstraram alta eficiência no processo de lavagem de solos contaminados com óleo bruto e como agentes potencializadores da biodegradação “in situ” (KANG et al., 2010). Os SLP podem ser aplicados na indústria de petróleo, sendo úteis na recuperação do óleo secundário, remoção das brocas e regeneração dos hidrocarbonetos em lamas e sedimentos (BAVIERE et al. 1994; MARCHAL et al. 1999; PESCE 2002 apud VAN BOGAERT et al., 2007) e na remoção de metais pesados de sedimentos (MULLIGAN; YONG; GIBBS, 2001; FELSE et al., 2007).

Os soforolipídios exibem efeitos terapêuticos como agentes antitumorais, antimicrobianos, antifúngicos e antivirais. A maioria destas atividades biológicas está relacionada com mecanismos que envolvem a alteração da permeabilidade de membranas celulares (KITAMOTO; ISODA; NAKAHARA, 2002; SHAH et al., 2007; ZARAGOZA et al. 2009). Os SLP apresentam atividade tóxica contra *Staphylococcus aureus*, *Candida parapsilosis* (KRIVOBOK et al., 1994), *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus mutans*, *Propionibacterium acne* (KIM et al., 2002).

Sun, Choi e Kim (2004) investigaram a atividade algicida dos soforolipídios sobre as algas nocivas *Alexandrium tamarense*, *Heterosigma akashiwo* e *Cochlodinium polykrikoides* e observaram uma inibição de até 90% do crescimento. Essa inibição induzindo a ecdise em *A. tamarense*, a lise celular rápida em *H. akashiwo* e a turgescência em *C. polykrikoides*, causando danos irreversíveis nas células das algas estudadas.

Devido à sua característica anfifílica, os SLP são capazes de formar micelas com características estruturais e propriedades físico-químicas únicas, permitindo a formação de nanoestruturas, com potencial para serem utilizadas como sistema de liberação controlada de fármacos (JOSHI-NAVARE; PRABHUNE, 2013). Essa classe de glicolipídios também pode ser utilizada como imunomoduladores, pois modulam a atividade anti-inflamatória através da diminuição da produção de óxido nítrico e citocinas, reduzindo a mortalidade de cobaias (HARDIN et al., 2007; BLUTH et al., 2006) sem afetar a microbiota do hospedeiro (SLEIMAN et al., 2009).

As propriedades emulsificantes dos soforolipídios possibilita que sejam utilizados na indústria de alimentos, melhorando a qualidade dos produtos derivados de farinha de trigo (AKIRA; AKIRA, 1987), na armazenagem de produtos em câmeras frigoríficas para prevenir a formação de partículas de gelo (MASARU et al., 2001 apud VAN BOGAERT et al., 2007) e como conservantes de frutas *in natura*, inibindo o crescimento de fungos que causam a podridão (YUAN; YANG; CHEN, 2012).

A ampla variedade de funções que os soforolipídios possuem, como agentes emulsionantes, espumantes, solubilizantes e de detergência, estabilidade térmica, de salinidade e pH, bem como não serem tóxicos e não causarem irritação na pele, os qualificam para serem utilizados em cosméticos (BROWN, 1991; KIM et al., 2002; LOURITH; KANLAYAVATTANAKUL, 2009).

Os SLP apresentam propriedades para aplicações dermatológicas, como ativadores de macrófagos, estimulantes do metabolismo de fibroblastos dérmicos e neossíntese de colágeno, efeitos inibitórios contra radicais livres, ativadores de elastase incluindo ativação de macrófagos e propriedades fibrinolíticas, atuam também como agente descamante e despigmentante, reduzem o excesso de gorduras subcutâneas através de síntese de leptina nos adipócitos e propriedades bactericidas (VAN BOGAERT et al., 2007; BHADORIYA; MADORIYA 2013). Dessa forma os SLP estão presentes em diversos produtos cosméticos e de cuidado pessoal como loções, sabonetes líquidos, produtos de cabelo, lápis labial, sombras, tratamento de

acne, desodorantes, pós-compactos, produtos antirrugas e anticaspa (LOURITH; KANLAYAVATTANAKUL, 2009; BHADORIYA; MADORIYA, 2013).

Devido às diferenças nas propriedades das formas lactônicas e acídicas de SLP, diversas aplicações são específicas para cada uma delas. A forma lactônica tem sido utilizada como aditivos em xampus, sabonetes e detergentes (ASHBY et. al., 2013), em cosméticos, possui maior atividade antimicrobiana, promove maior síntese de colágeno e estimula o metabolismo de fibroblastos (GLENNIS; COOPER, 2006), possui atividades biocidas (ITO; KINTA; INOUE, 1980), anticancerígenas em células esofágicas (SHAO et al., 2012) e pancreáticas (FU et al., 2008), espermicida, anti-HIV e citotóxica (SHAH et al., 2005). A forma acídica, possui efeito terapêutico em tratamentos de pele como agente hidratante (ASHBY et. al., 2013). A presença de grupos acetil levam à diminuição da hidrofobicidade melhorando a atividade antiviral e a comunicação celular (SHAH et.al., 2005).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 Microrganismos

O microrganismo utilizado na produção de soforolipídios foi a levedura *Candida bombicola* (ATCC 22214™), obtida da American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA (2013).

O consórcio bacteriano comercial (Enzilimp) utilizado no teste de biorremediação continha os microrganismos *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*.

#### 4.1.2 Substratos Industriais de Baixo Custo

O tecido adiposo de frango foi cedido pela indústria frigorífica Big Frango localizada em Rolândia – Paraná. O melaço de cana foi cedido pela Corol Cooperativa Agroindustrial localizada em Rolândia – Paraná. O óleo girassol comercial (Liza®) e o caldo de cana foram comprados em estabelecimento comercial.

#### 4.1.3 Meio de Preservação e Inóculo

O meio de preservação e inóculo de *Candida bombicola* continha: 100 g L<sup>-1</sup> de glicose, 10 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura e 1 g L<sup>-1</sup> de ureia.

#### 4.1.4 Solo

O solo utilizado nos testes de biorremediação foi coletado na região de Jaguapitã – Paraná, as características físicas e químicas foram analisadas pelo Laboratório de Solos da Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Agronomia – CCA. A determinação de carbono total do contaminantes e do solo foi feita por método Walkley-Black (ANDERSON; INGRAM, 1993).

### 4.2 MÉTODOS

#### 4.2.1 Caracterização da Gordura de Frango

A gordura foi extraída do tecido adiposo por trituração, seguida por derretimento e submetidas a duas filtrações e posteriormente centrifugada a

9.000 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente e armazenado a 4°C (FERRARI; KOLLER, 2012, modificado). Este material foi caracterizado quanto aos açúcares totais por método de Fenol-Sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) com leitura de absorvância medida em  $\lambda = 490$  nm e de padrão de glicose. As proteínas totais foram determinadas por método de Bradford (1976) com leitura absorvância em  $\lambda = 540$  nm e os valores curva de padrão de albumina. A umidade foi determinada por a 85°C. As cinzas foram obtidas pela incineração da gordura em mufla a 540°C. O teor de lipídios totais foi quantificado gravimetricamente a partir dos insolúveis orgânicos em éter. O índice de acidez determina a quantidade de ácidos graxos livres da amostra e foi quantificado mg hidróxido potássio (KOH) necessário para neutralizar os ácidos livres de 1 grama de amostra (MORETTO; FETT, 1998).

A análise dos ácidos graxos foi realizada em um cromatógrafo gasoso Agilent 7890A, equipado com software Chemstation, detector de ionização de chama e coluna capilar DB-225 (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m 50% (cianopropilfenil)-dimetilpolisiloxano, Agilent). Temperatura do Injetor de 250°C, vazão de 3 mL min<sup>-1</sup>. A razão de divisão da amostra (split) foi de 1:10. Temperatura do Detector de 270°C. Parâmetros de corrida: Rampa com temperatura inicial de 120°C por 0,5 min, depois aquecimento de 5°C min<sup>-1</sup> até 250°C por 2,5 minutos. O tempo de corrida foi de 25 minutos. Os resultados das amostras foram comparados com o padrão FAMEmix 18917-1 AMP Supelco®.

#### 4.2.2 Preparo do Melaço e Caldo de Cana

O melaço de cana foi diluído em água destilada (1:2) para diminuir a viscosidade e em seguida, as amostras foram centrifugadas a 9.000 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente para remoção de impurezas (DAVEREY; PAKSHIRAJA, 2009a). O caldo de cana foi centrifugado a 9.000 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente, para remoção de impurezas

A quantificação dos açúcares totais presentes nesses substratos foi realizada por método de Fenol-Sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). A

concentração dos açúcares nos meios de cultivo foi ajustada por diluição em água destilada.

#### 4.2.3 Preservação da *Candida bombicola*

Para a preservação, a cepa de *Candida bombicola* foi cultivada em frascos Erlenmeyers de 125 mL com 25 mL do meio 4.1.3 a 30°C, 150 rpm por 48 horas. Os cultivos foram interrompidos por centrifugação a 4°C, 9.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 5 mL de solução salina (NaCl 0,9%) e centrifugadas. As células foram ressuspensas em 500 µL de solução salina e preservadas em 500 µL de glicerol em eppendorf e mantidas a – 85°C.

#### 4.2.4 Inóculo

O inóculo foi preparado por cultivos em frascos Erlenmeyer de 125 mL com 25 mL do meio 4.1.3. O meio foi inoculado com 0,5 mL da solução de células preservados no glicerol e incubado por 24 h a 30°C, em shaker orbital a 150 rpm. Os inóculos foram padronizados em 0,5 g L<sup>-1</sup> de células, determinado em absorbância a 600 nm (D.O.<sub>600</sub>) correlacionando com a curva de biomassa em g L<sup>-1</sup>.

#### 4.2.5 Avaliação das Fontes de Hidrofílicas e Hidrofóbicas para a Produção de Soforolipídios

Os cultivos foram realizados nos meios contendo como fontes de carbono hidrofílica: melaço de cana de açúcar (MC), caldo de cana (CC), sacarose (SAC) ou glicose (GLI) e como fontes hidrofóbicas: gordura de frango

(GF) ou o óleo de girassol (OG). As diferentes combinações dos substratos estão presentes na Tabela 5, as concentrações utilizadas foram de 100 g L<sup>-1</sup> de cada uma das fontes de carbono, com 10 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura e 1 g L<sup>-1</sup> de ureia (BAJAJ; TILAY; ANNAPURE, 2012).

Os experimentos foram realizados em triplicata com frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL dos diferentes meios de fermentações e as condições foram padronizadas em 30°C, 150 rpm por 120 horas.

Tabela 4 – Ensaio com as diferentes combinações das fontes hidrofílicas e hidrofóbicas de carbono para produção de SLP por *Candida bombicola*.

<b>Ensaio</b>	<b>Composições</b>
E1	Óleo de girassol + Melaço de cana
E2	Óleo de girassol + Caldo de Cana
E3	Óleo de girassol + Sacarose
E4	Óleo de girassol + Glicose
E5	Gordura de frango + Melaço de cana
E6	Gordura de frango + Caldo de Cana
E7	Gordura de frango + Sacarose
E8	Gordura de frango + Glicose

#### 4.2.6 Otimização do Meio de Cultivo para Produção de SLP por *Candida bombicola* Aplicando Planejamento Box Behnken 3<sup>3</sup>

A partir da melhor combinação de substratos definidos no item 4.2.5 foi realizado um planejamento Box Behnken 3<sup>3</sup> com 12 combinações, 3 repetições dos pontos centrais, consistindo em 15 ensaios (Tabela 6). As variáveis e os níveis testados foram: fonte hidrofóbica (X<sub>1</sub>) de 25 a 125 g L<sup>-1</sup>; fonte hidrofílica (X<sub>2</sub>) de 10 a 100 g L<sup>-1</sup>, ureia (X<sub>3</sub>) de 0 a 4 g L<sup>-1</sup> e extrato de levedura fixado em 2,5 g L<sup>-1</sup>.

Os experimentos foram realizados em batelada com frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL dos diferentes meios de fermentação e as condições foram padronizadas em 30°C, 150 rpm por 120 horas.

Tabela 5 – Planejamento Box Behnken 3<sup>3</sup> com variáveis e sua resposta  $y_1$ = produção de soforolipídios por *Candida bombicola*.

Ensaio	Variáveis Codificadas			Variáveis Decodificadas		Resposta	
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	Fonte hidrofílica (g L <sup>-1</sup> )	Fonte hidrofóbica (g L <sup>-1</sup> )	Ureia (g L <sup>-1</sup> )	SLP ( $Y_1$ ) (g L <sup>-1</sup> )
1	-1	-1	0	25	10	2	
2	1	-1	0	125	10	2	
3	-1	1	0	25	100	2	
4	1	1	0	125	100	2	
5	-1	0	-1	25	55	0	
6	1	0	-1	125	55	0	
7	-1	0	1	25	55	4	
8	1	0	1	125	55	4	
9	0	-1	-1	75	10	0	
10	0	1	-1	75	100	0	
11	0	-1	1	75	10	4	
12	0	1	1	75	100	4	
13	0	0	0	75	55	2	
14	0	0	0	75	55	2	
15	0	0	0	75	55	2	

#### 4.2.7 Determinação de Biomassa

##### 4.2.7.1 Curva de biomassa

A curva de biomassa foi confeccionada a partir dos microrganismos crescidos no meio de cultivo no item 4.1.3 a 30°C, 150 rpm por 48 horas. Após o crescimento celular, o meio foi centrifugado e as células ressuspensas em salina 0,9 % (m/v). Uma alíquota de 1 mL foi submetida a uma série de diluições para a obtenção de leituras de 0,200 a 0,800 de absorbância em  $\lambda = 600$  nm. Paralelamente, 3 alíquotas de 1 mL foram distribuídas em recipientes de alumínio previamente tarados e levados à estufa (70°C), até

atingir peso constante. Em seguida, foi plotado o gráfico relacionando os valores da absorvância x peso seco ( $\text{g L}^{-1}$ ), para encontrar o fator de calibração.

#### 4.2.7.2 Quantificação de biomassa

Após extração por acetato de etila a fase aquosa foi centrifugada a 9000rpm, 15 min a 4°C. O sobrenadante foi reservado e as células ressuspensas em solução salina 0,9% (m/v) e absorvância medida à  $\lambda = 600 \text{ nm}$ . Os valores foram correlacionando à curva de biomassa em  $\text{g L}^{-1}$ .

#### 4.2.8 Quantificação de Soforolipídios

Para extração do sofrorolipídio, todo o conteúdo do meio de cultivo foi extraído três vezes com 25 mL de acetato de etila. Em funil de separação, a fase aquosa foi separada e reservada. A fase orgânica foi coletada e evaporada por rota evaporação. Em seguida, o conteúdo lipídico residual possivelmente presente foi removido através da lavagem com 25 mL hexano e o sofrorolipídios extraído com 25 mL de uma solução metanol:água (4:1) (PALME et al., 2010, modificado) e separados em funil. O teor total de sofrorolipídios foi determinado por análise gravimétrica da fase metanol:água a 105°C até peso constante.

#### 4.2.9 Quantificação de Açúcares Totais Residuais e Óleo Residual

Ao fim da fermentação, os açúcares totais e óleo residuais foram quantificados para determinar o consumo desses substratos pelo microrganismo. Os açúcares totais residuais foram quantificados pelo método de Fenol-Sulfúrico a partir do sobrenadante obtido da centrifugação da fase aquosa resultante da extração do acetato de etila (DUBOIS et al., 1956). O óleo residual

foi quantificado por gravimetria a partir do hexano utilizado para lavar o conteúdo resultante da rota evaporação.

#### 4.2.10 Caracterização dos Soforolipídios

Os sofrorolipídios produzidos na condição otimizada no item 4.2.6 foram caracterizados quanto a estrutura molecular e suas propriedades tensoativas.

##### 4.2.10.1 Espectroscopia de Infravermelho (IV) com Transformada de Fourier (FTIR):

A identificação e caracterização dos grupos funcionais dos sofrorolipídios foi feita por FTIR no espectrômetro IR Prestige 21 (Shimadzu) equipado com o software OriginPro 8.0. Após a purificação, 1 mg do SLP foram misturados com 100 mg de KBr e pressurizados a 7.500 Kg por 30 segundos para obtenção de pastilhas translúcidas. As leituras foram conduzidas em transmitância, sistema com resolução de  $2\text{ cm}^{-1}$ , faixa de  $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$  com 32 scans (CHANDRAN; DAS, 2011).

##### 4.2.10.2 Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN):

A análise estrutural dos sofrorolipídios foi realizada através de Espectrômetro de RMN Bruker Mod. Avance III operando a 400 MHz para  $^1\text{H}$  equipado com uma sonda multinuclear inversa (BBI) de 5 mm. As amostras purificadas de SLP foram analisadas utilizando os métodos  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e em espectros bidimensionais HSQC e HMBC. O sistema de solvente foi clorofórmio deuterado 0,05%v/vTMS e o espectro foi expresso por ppm a partir do padrão de referência interno.

#### 4.2.10.3 Determinação tensão superficial

A Tensão Superficial foi determinada com solução aquosa contendo soforolipídios purificados preparadas em diferentes concentrações (0 a 1 g L<sup>-1</sup>) (GLENNIS; COOPER, 2006; DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2009a), utilizando o tensiometro de Fisher (KRÜSS K6), baseado no Método do Anel de du Nouy, que utiliza um anel de platina (anel de Du Nouy), sendo a amostra colocada em um recipiente do aparelho, com o anel inicialmente submerso. A força adicional exercida sobre o anel no momento em que a lâmina do líquido se rompe fornece a medida da tensão superficial (DU NOUY, 1925). As condições de análise padronizada para todos os ensaios foram: volume médio da amostra de 25 mL e temperatura de 25°C. O equipamento foi calibrado sempre no início e término das análises, medindo-se a tensão superficial da água destilada.

#### 4.2.10.4 Determinação da concentração micelar crítica (CMC)

A determinação da CMC foi realizada através da medida da tensão superficial a partir de diluições sucessivas com água destilada da solução aquosa de soforolipídios purificados. Posteriormente foi construído um gráfico, plotando-se a tensão superficial contra a concentração de soforolipídios, onde a CMC corresponde ao ponto central de inflexão da curva. A tensão superficial foi determinada até que os valores obtidos aproximem-se da tensão superficial da água destilada (70-72 mN/m) (SHEPPARD; MULLIGAN, 1987).

#### 4.2.10.5 Índice de emulsificação

O Índice de Emulsificação foi determinado utilizando o método descrito por Cooper e Goldenberg (1987). Foram utilizados 5 mL de diferentes hidrocarbonetos (n-heptano, diesel, gasolina, querosene e tolueno) ou óleos (óleo de canola, soja e lubrificante) e 5 mL de solução de soforolipídios a 100mg

L<sup>-1</sup> (COOPER; PADDOCK, 1984; MA; LI; SONG, 2012). Posteriormente, as misturas foram homogeneizadas em vortex (rotação máxima) por 2 min. O índice de emulsificação (E<sub>24</sub>) foi determinado após 24 horas através da divisão da altura da camada de emulsificação pela altura total da mistura e multiplicada por 100. A estabilidade da emulsão foi verificada após 168 horas em temperatura ambiente.

$$IE(\%) = (HEM/HT)*100$$

IE (%) = Índice de Emulsificação

HEM = Altura da Camada de Emulsificação (cm)

HT = Altura total (cm)

#### 4.2.11 Aplicação do SLP na Biorremediação de Solos Contaminados com Óleo Lubrificante em Ensaios Laboratorial

A avaliação da capacidade de biorremediação do soforolípido em solos contaminados foi realizada da técnica de respirometria (ALEF; NANNIPIERI, 1995). O CO<sub>2</sub> produzido é proporcional aos carbonos consumidos pelos microrganismos, dessa forma a quantidade de CO<sub>2</sub> liberada é correspondente a porcentagem de substrato biodegradado.

Os experimentos de aplicação de SLP para biorremediação foram realizados em frascos de incubação contendo 100g de solo esterilizado por tindalização e 5% de óleo lubrificante (Lubrax SF 20W-40) como contaminante. Os microrganismos utilizados foram do consórcio bacteriano Enzilimp, que continha 0,3 x 10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup> de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*. As diferentes combinações de concentração de soforolípídios e do Enzilimp estão presentes na Tabela 7. A umidade o solo foi ajustado em 70% de sua capacidade de campo. Cada condição foi preparada em triplicada e incubadas a 30°C por 7 dias.

Tabela 6 – Ensaio para biorremediação de solos com o Enzilimp acrescidos de soforolipídios.

Ensaio	Enzilimp (g kg <sup>-1</sup> )	Soforolipídios (g kg <sup>-1</sup> )
C1	4	-
T1	4	1
T2	4	3
T3	4	5
C2	2	-
T4	2	1
T5	2	3
T6	2	5

O CO<sub>2</sub> produzido foi capturado por 20mL de solução de NaOH (0,25N), localizado em recipiente separado dentro dos frascos de incubação (Figura 5). A cada 24h foram retiradas alíquotas, na qual foram adicionados 1mL de solução de BaCl<sub>2</sub> 50% e 2 gotas de fenolftaleína. Posteriormente foi realizada a titulação com HCl (0,25N).

Figura 5 - Ensaio de respirometria



- 20 mL de NaOH 0,25N
- 100 g solo
- 70% umidade
- 5mL de óleo lubrificante
- SLP
- Consórcio Bacteriano

O cálculo para determinação do CO<sub>2</sub> produzido é feito pela fórmula:

$$n^{\circ} \text{ eq. de NaOH} = [(N_{\text{NaOH}} * V_{\text{NaOH}}) - (N_{\text{HCl}} * V_{\text{HCl}})_{\text{Amostra}}] - [(N_{\text{NaOH}} * V_{\text{NaOH}}) - (N_{\text{HCl}} * V_{\text{HCl}})_{\text{Branco}}]$$

$N_{\text{NaOH}}$  = Normalidade do NaOH

$V_{\text{NaOH}}$  = Volume gasto de NaOH

$N_{\text{HCl}}$  = Normalidade do HCl

$V_{\text{HCl}}$  = Volume gasto de HCl



#### 4.2.12 Análise Estatística

As respostas referentes a produção de sofrorolipídios ( $Y_1$ ) obtidas na avaliação de diferentes tipos de substratos foram submetidos ao Teste Tukey e os resultados do planejamento estatístico foram submetidas a análise de variância com índice de confiança de 0,05 e metodologia de superfície de resposta pelo programa STATISTICA 7.0 (STATISTICA Inc. Tulsa – USA, 2006).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho estão presentes em forma de artigo científico que será submetido para revista Applied Microbiology and Biotechnology.

5.1 Artigo – Sophorolipids production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and potential application in the bioremediation

## 1 5.1 ARTIGO

2

3 **Sophorolipids production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and potential**  
4 **application in the bioremediation**

5

6 Tamires Minucelli<sup>a</sup> • Renato Márcio Ribeiro-Viana<sup>a</sup> • Dionísio Borsato<sup>b</sup> • Galdino Andrade<sup>c</sup> • Marta  
7 Viviana Torres Cely<sup>c</sup> • Marcos Roberto de Oliveira<sup>d</sup> • Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi<sup>a\*</sup>

8

9 <sup>a</sup>Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso  
10 Garcia Cid, PR 445 Km 380, Campus Universitário Cx. Postal 10.011 CEP 86.057-970 Londrina, Paraná,  
11 Brasil.

12

13 <sup>b</sup>Departamento de Química, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 Km  
14 380 , Campus Universitário Cx. Postal 10.011 CEP 86.057-970 Londrina, Paraná, Brasil.

15

16 <sup>c</sup>Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445  
17 Km 380, Campus Universitário Cx. Postal 10.011 CEP 86.057-970 Londrina, Paraná, Brasil

18

19 <sup>d</sup>Universidade Tecnológica Federal do Paraná de CÂMPUS LONDRINA, Avenida dos Pioneiros, 3131,  
20 CEP 86036-370 Londrina, Paraná, Brasil

21

22

23 \*Corresponding author Tel.: +55 43 33715476

24 E-mail adress: macelligoi@uel.br

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

1   **ABSTRACT**

2

3   The sophorolipids are biosurfactants made of a sophorose linked by a hydroxyl group of a fatty acid. Its  
4   surface-active properties enable numerous large potential applications. The sophorolipids (SL) are  
5   synthesized by various strains of the genus *Candida* in the presence of hydrophilic and hydrophobic  
6   sources. In this work was evaluated the production of sophorolipids by *Candida bombicola* ATCC 2214  
7   using sugar cane molasses, sugar cane juice, sucrose or glucose as hydrophilic source and chicken fat or  
8   sunflower oil as hydrophobic source. The SL were characterized and applied in bioremediation of soils  
9   contaminated with lubricating oil. The higher production of SL was 41,63 g L<sup>-1</sup> in the optimized condition  
10   of 75 g L<sup>-1</sup> of chicken fat, 77,5 g L<sup>-1</sup> glucose, 2,5 g L<sup>-1</sup> yeast extract and without urea. Regarding the  
11   characterization, were produced sophorolipids on the diacetylated lactonic form and with surface tension  
12   properties of 35 mN/m, CMC 65 mg L<sup>-1</sup> and as emulsifying agents in lubricating oil, toluene and n-heptane.  
13   They showed potential application in bioremediation of oil-contaminated soils lubricant.

14

15

16   **KEYWORDS**

17           Biosurfactant • *Candida bombicola* • Chicken fat • Contaminated soil • Lubricating oil •  
18   Bioremediation.

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

## 1 INTRODUCTION

2

3 Regarding the market, in 2012, the surfactants generated approximately \$ 27 billion in the global  
4 market, with annual growth of 3,8% and it is estimated that in 2016 the market should reach US \$ 31.1  
5 billion (Acmite Market Intelligence, 2013). The majority of these surfactants is obtained from chemical  
6 processes, however, in recent years there is a great interest in the production of biosurfactants that are not  
7 harmful to the environment.

8 Among these biosurfactants, stands out the sophorolipids (SL), mainly produced by yeast *Candida*  
9 *bombicola*, which has high production and good industrial applicability (Ribeiro et al., 2013). The SL is  
10 compound of a sophorose molecule linked to fatty acid, in the acidic form it has the free carboxylic terminal  
11 group and in the lactonic form is entirely esterified at the 4" position and in some rare cases at the 6' or 6"  
12 positions. (Asmer et al. 1988; Davila et al 1993; Van Bogaert et al, 2007). The fatty acid can vary for the  
13 presence of insaturations, hydroxylation position (terminal or sub-terminal) and the string length, usually  
14 between 16 and 18 carbon atoms and on the sophorose may contain different degrees of acetylation (Koster  
15 et al., 1995; Rau et al., 2001; Nuñez et al, 2001).

16 The SL have several advantages over chemical surfactants, such as low toxicity, higher  
17 biodegradability, high selectivity and stability under extreme conditions of temperature, pH and salinity  
18 (Otto et al. 1999; Makkar et al. 2012). They have potential application in different areas such as agriculture  
19 (Schofield et al 2013.), bioremediation (Chandran and Das 2012) food industry (Saharan et al. 2011),  
20 cosmetics (Gharaei-Fathabad, 2010) and pharmaceuticals (Shah et al. 2005; Saharan et al. 2011).

21 The SL biosynthesis occurs, mainly, in the combined presence of hydrophilic and hydrophobic  
22 sources of carbon. Among the carbohydrates employed in the production of sophorolipids, glucose is the  
23 primary hydrophilic source of carbon utilized in the production of SL, for other mono- or disaccharides  
24 production is lower (Bajaj et al. 2012). Hydrophobic sources influence the production and final composition  
25 of SL (Oliveira et al. 2014), in studies of Felse et al. (2007) it was determined that the supplementation of  
26 saturated and monounsaturated C18 fatty acids increase the SL production, but the presence of more than  
27 one unsaturation, and unsaturations smaller than ( $\leq C16$ ) or larger ( $\geq C20$ ) lead to decreased production.

28 At the economic point of view, the biosurfactants are not yet competitive with those obtained by  
29 chemical processes (Makkar et al. 2011). For possible application, the development of less expensivemore  
30 economical production processes is necessary, for example, the use of industrial waste and its efficient and  
31 sustainable conversion into high added value products through fermentation processes (Felse et al. 2006).  
32 In the use of low cost substrates for sophorolipids production, the following are noteworthy: the animal fat  
33 (Deshpande and Daniels, 1995), waste cooking oil (Shah et al. 2007; Ganesh et al. 2015), fatty acid residue  
34 (Van Bogaert et al., 2007), dairy waste waters (Daverey et al. 2010) glycerol fatty acid raw tallow (Ashby  
35 et al. 2006), soy molasses (Solaiman et al., 2004), sugar cane molasses (Daverey and Pakshirajan, 2009)  
36 and hydrolyzed corn straw (Konish et al. 2015).

37 Brazil is the world's third largest producer of chicken meat, in 2013 were produced 12,30 million  
38 tons (UBABEF, 2012). Therefore, the fat removed from the abdominal cavity has been regarded as a  
39 byproduct. The main applications of fat are in the production of animal food, soap and biofuel. However,

1 due to their nutritional biochemical composition and to be cheaper than vegetable oils, this byproduct is  
2 useful for use in microbial fermentation processes to generate soforolipídios (Centenaro et al. 2008).

3 Considering the applications and the high cost of the sophorolipids, strategies such as low cost  
4 substrates for the formulation of the fermentation medium and the optimization of conditions to increase  
5 production should be employed. This paper has proposed the use of residual fat from the chicken industry  
6 for the production of sophorolipids by *Candida bombicola* and its application in soil bioremediation  
7 processes contaminated with lubricating oil.

## 10 MATERIALS AND METHODS

### 12 *Substrates*

13 The molasses was given by Corol Agroindustrial Cooperativa, Rolândia, Brazil. The sugarcane  
14 juice and sunflower oil (Liza®) acquired in a business establishment from Londrina. The chicken fat was  
15 given by the meatpacking industry Big Chicken, Rolândia, Brazil. The composition of fatty acids from  
16 chicken fat was determined by gas chromatography with a capillary column DB-225 (30 m x 0,25 mm x  
17 0,25 µm, Agilent), flame ionization detector and gas chromatograph Agilent 7890<sup>a</sup>. Injector Temperature  
18 250°C, flow rate of 3 mL min<sup>-1</sup>, the detector 270 C. T°C initial 120°C for 0.5 minutes, heating of 5°C min  
19 <sup>-1</sup> to 250°C for 2.5 minutes. Sample results were compared with the standard FAMEmix 18917-1 AMP  
20 Supelco®.

### 22 *Microorganism*

24 The microorganism used in the sophorolipids production was the yeast *Candida bombicola* ATCC  
25 22214 (American Type Culture Collection (Manassas, USA, 2013)). The cells were stored at -85°C. For  
26 the inoculum, was used 25 mL of medium containing 100 g L<sup>-1</sup> glucose, 10 g L<sup>-1</sup> yeast extract and 0,1 g L<sup>-1</sup>  
27 urea. It was inoculated with 0.5 mL of cells stocks and grown for 24h at 30 150rpm. The inocula were  
28 standardized at 0.5 g L<sup>-1</sup> cells, at 600 nm correlated with the biomass curve in g L<sup>-1</sup>.

### 30 *Effect of hydrophilic and hydrophobic sources*

32 To verify the effect of the sources, fermentations were made combining a hydrophilic source: sugar  
33 cane molasses (MC), sugarcane juice (CC), sucrose (SAC) or glucose (GLI) with a hydrophobic: chicken  
34 fat (GF) or sunflower oil (GL) at concentrations of 100 g L<sup>-1</sup>, plus 10 g L<sup>-1</sup> of yeast extract and 1 g L<sup>-1</sup> g of  
35 urea. These were put in a 125 ml Erlenmeyer flask containing 25 ml of each medium at 30°C, 150 rpm for  
36 120 hours, in triplicate. At the final of fermentation, the sophorolipids, residual sugar and oils were  
37 measured. The results of SL were analyzed using the Tukey Test (p> 0.05).

## 1 *Optimization of media components*

2

3 After the best combination of hydrophilic and hydrophobic sources was defined, it was carried out  
4 a Behnken Box 3<sup>3</sup> design, with 12 combinations, 3 central points (Table 1). The tested variables and levels  
5 have been: hydrophobic source (X<sub>1</sub>) from 25 to 125 g L<sup>-1</sup>; hydrophilic source (X<sub>2</sub>) from 10 to 100 g L<sup>-1</sup> and  
6 urea (X<sub>3</sub>) from 0 to 4 g L<sup>-1</sup> and yeast extract fixed in 2.5 g L<sup>-1</sup>. Experiments were done in 125 ml Erlenmeyer  
7 flasks containing 25 ml of different fermentation mediums at 30°C, 150 rpm for 120 hours. The results  
8 were analyzed by response surface methodology and analysis of variance (ANOVA) by STATISTICA 7.0  
9 (STATISTICA Inc. Tulsa - USA).

10

## 11 *Determination of soforolipídios, residual sugars and oils*

12

13 After the fermentation, the SL were extracted three times with ethyl acetate, forming two phases.  
14 The organic phase was collected and evaporated, the SL extracted with methanol: water solution (4: 1 v/v)  
15 and the residual lipid content was removed with hexane and both were quantified by gravimetry. The  
16 aqueous phase was centrifuged and the residual sugars in the supernatant were quantified by Phenol-  
17 Sulfuric Acid Method (Dubois et al. 1956).

18

## 19 *Spectroscopic carachterization of SL*

20

### 21 NMR analysis

22

23 <sup>1</sup>H, and <sup>13</sup>C spectra were recorded on Bruker Avance III 400 MHz spectrometer using inverse  
24 probe (BBi – 5 mm). Chemical shifts (δ) for <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C spectra are expressed in ppm relative to  
25 tetramethylsilane. Two-dimensional heteronuclear <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C chemical shift correlation spectra (HSQC and  
26 HMBC) were recorded in CDCl<sub>3</sub> using standard pulse sequence.

27

### 28 Fourier transform infrared spectroscopy analysis– FT-IR

29

30 Infrared spectra were recorded on Shimadzu FT-IR PRESTIGE-21 spectrometer using KBr n the  
31 range 4000-400 cm<sup>-1</sup>. 32 scans were taken for each sample with a resolution of 2 cm<sup>-1</sup> in the transmission  
32 mode (Chandran e Das, 2011).

33

## 34 *Determining surface tension and critical micelle concentration (CMC)*

35

36 The surface tension was determined in the aqueous solution containing various concentrations of  
37 SL (0 to 1 g L<sup>-1</sup>), using Fisher tensiometer (Krüss K6) and based on the du Nouy ring method (1925). The  
38 surface tension was measured until the values obtained approached the surface tension of distilled water  
39 (70-72 nM/m) (Sheppard and Mulligan, 1987). The CMC was determined by relating the concentration of  
40 SL with the corresponding surface tension.

## 1 *Emulsification Index*

2

3 The emulsification index was determined by mixing 5 ml of SL solution of 100 mg L<sup>-1</sup> in 5 ml of  
4 different hydrocarbons (n-heptane, diesel, gasoline, kerosene and toluene) and oils (rapeseed oil, soybean  
5 and lubricant oil) (Ma et al. 2012) and homogenized for 2 min. The emulsification index (E24) was  
6 determined after 24 hours by the division of the height of the emulsification layer by the total height of the  
7 mixture and multiplied by 100. The stability of the emulsion was observed after 168 hours at room  
8 temperature.

9

## 10 *Bioremediation assays*

11

12 The application of sophorolipids produced by *Candida bombicola* in soil bioremediation was  
13 evaluated in laboratory assays. Sandy soil was collected from 0-50 cm of depth in Jaguapitã, Parana State,  
14 Brazil. Before bioremediations assays soil was sterilized by tyndallization method and their moisture  
15 adjusted at 70% of field capacity. Soil contamination was made with a commercial lubricant oil (Lubrax  
16 SF 20W-40) reaching a final proportion of 5%. Samples (100 g) of oil-contaminated soil were conditioned  
17 in hermetic glass pots for incubation at different treatments with sophorolipids (SPL) and commercial  
18 consortium of microorganisms (Enzilimp). Consortium Enzilimp contain 1,6 x 10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup> of them  
19 *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*.

20 Bioremediation assay was composed by eight treatments in triplicate. C1: Enzilimp 4 g Kg<sup>-1</sup> soil  
21 without SLP; T1: Enzilimp 4 g Kg<sup>-1</sup> soil plus SPL 1 g Kg<sup>-1</sup> soil; T2: Enzilimp 4 g Kg<sup>-1</sup> soil plus SPL 3 g  
22 Kg<sup>-1</sup> soil; T3: Enzilimp 4 g Kg<sup>-1</sup> soil plus SPL 5 g Kg<sup>-1</sup> soil; C2: Enzilimp 2 g Kg<sup>-1</sup> soil without SLP; T4:  
23 Enzilimp 2 g Kg<sup>-1</sup> soil plus SPL 1 g Kg<sup>-1</sup> soil; T5: Enzilimp 2 g Kg<sup>-1</sup> soil plus SPL 3 g Kg<sup>-1</sup> soil; T6:  
24 Enzilimp 2 g Kg<sup>-1</sup> soil plus SPL 5 g Kg<sup>-1</sup> soil. The glass pots containing different treatments were incubated  
25 at 30 °C in the dark and the microbial activity was evaluated by the determination of basal soil respiration.  
26 The basal soil respiration was estimated periodically each 24 hours by the quantification of CO<sub>2</sub> produced  
27 by microbial activity; this was captured in NaOH (0.5 M) traps and measured by titration with HCl (0.5 M)  
28 according to Alef (1995).

29

## 30 **RESULTS**

31

### 32 *Evaluation of hydrophilic and hydrophobic sources for the production of SL*

33

34 The SL obtained by *C. bombicola* in the combination of hydrophilic and hydrophobic sources had  
35 the higher yields of 16.83 g L<sup>-1</sup> in glucose and chicken fat and 13.57 g L<sup>-1</sup> glucose and sunflower oil,  
36 followed by tests with sucrose, with 11.81 g L<sup>-1</sup> in chicken fat and 6.67 g L<sup>-1</sup> in sunflower oil. The lowest  
37 yields were in the molasses and sugarcane juice with chicken fat (9.78 and 8.76 g L<sup>-1</sup>) and sunflower oil  
38 (1.72 and 1.87 g L<sup>-1</sup>).

1 Chicken fat acids used had the composition of 0.65% of myristic acid (C14: 0), 23.9% palmitic  
2 acid (C16: 0), 6.69% stearic acid (C18: 0), 38.46% oleic acid (C18: 1) 28.21% linoleic acid (C18: 2) and  
3 2.06% of linolenic acid (C18: 3).

#### 4 5 *Optimization of culture medium for the production of SL*

6  
7 Table 1 presents the SL produced according to the tests set at Box Behnken 3<sup>3</sup> design and best  
8 yields were SL 41.63 g L<sup>-1</sup> (75 g L<sup>-1</sup> of fat, 100 g L<sup>-1</sup> of glucose and without urea) 31.13 g L<sup>-1</sup> (25 g L<sup>-1</sup> of  
9 fat, 55 g L<sup>-1</sup> of glucose and without urea), 30.31 g L<sup>-1</sup> (75 g L<sup>-1</sup> of fat, 55 g L<sup>-1</sup> of glucose and 2 g L<sup>-1</sup> of  
10 urea) and 29.73 g g L<sup>-1</sup> (125 g L<sup>-1</sup> fat, 55 g L<sup>-1</sup> glucose without urea).

11 Glucose had a significant effect (p = 0.003) in the production of SL, this can be verified by  
12 comparing the assays 10 and 9 with 100 g L<sup>-1</sup> of glucose 75 g L<sup>-1</sup> of fat and without urea and 10 g L<sup>-1</sup>  
13 glucose, 75 g L<sup>-1</sup> of fat and without urea, respectively, and production was reduced by 83% when the  
14 concentration of 100 g L<sup>-1</sup> glucose was reduced to 10 g L<sup>-1</sup>.

15 By the ANOVA analysis it was determined that the significant variables were glucose (p = 0.003)  
16 with positive influence and urea (p = 0.004) with a negative influence on the production of SL, the chicken  
17 fat had no significant effect in the synthesis of biosurfactant (p = 0.056). There was a positive effect on the  
18 interaction between glucose and urea (p = 0.02) and the model indicated that 94% of the response variability  
19 can be explained by the model used in this study.

20 The optimization of the conditions expected in SL production by *C. bombicola* was 75 g L<sup>-1</sup> of  
21 chicken fat, 77,5 g L<sup>-1</sup> of glucose and absence of urea, reaching a production of 39, 81 g L<sup>-1</sup> and the  
22 experimental data reached 41,63 g g L<sup>-1</sup> in the test 10, which corresponds to 75 g L<sup>-1</sup> of fat, 100 g g L<sup>-1</sup>  
23 glucose and without urea. Thus, the model was validated by five repetitions at the optimized condition and  
24 the average yield was of 37, 94 g L<sup>-1</sup>, showing no significant difference (p < 0.076), demonstrating that the  
25 predicted production and one obtained were confirmed.

26 The response surface (Fig. 1) describes the results of SL relating glucose and urea and fixing the  
27 chicken fat at level 0 (75 g L<sup>-1</sup>). The best production was with 75 g L<sup>-1</sup> fat, 77,5 g L<sup>-1</sup> glucose and no added  
28 urea.

29 The mathematical model below, showing the independent variables in coded form was developed  
30 from the regression analysis and the experimental results set for mathematical prediction of points, without  
31 the necessity an experimental phase. The terms with asterisks are significant at the 5% level.

$$32$$

$$33 \quad Y = 30,31^* + 2,2192 x_1 + 9,2552^* x_2 - 8,4985^* x_3 - 5,0375^* x_1 \cdot x_2 - 10,2535^* x_2 \cdot x_2$$

$$34 \quad \quad \quad - 3,7280^* x_3 \cdot x_2 + 0,171 x_1 \cdot x_2 + 0,1635 x_1 \cdot x_3 - 5,2385^* x_2 \cdot x_3$$

$$35$$

## 1 *Sophorolipid characterization*

2

### 3 *FT-IR*

4 The SL obtained in the optimized condition was fully identified and characterized by IR and NMR  
5 spectroscopy. FT-IR spectrum (figure 2) showed a broad band at  $3419\text{ cm}^{-1}$  corresponding to the hydroxyls  
6 of the structure. Typical bands of aliphatic hydrogens were observed at  $2929\text{ (v}_s\text{CH}_2)$  and  $2857\text{ (v}_{as}\text{CH}_2)$   
7  $\text{cm}^{-1}$ . At  $1640\text{ cm}^{-1}$  is observed a small band of unsaturated carbon (C=C). One of most important bands of  
8 the spectrum appears at  $1744\text{ cm}^{-1}$  and corresponds to carbonyl group (C=O) of the esters and lactone  
9 present in the molecule. Furthermore, the band corresponding to the C-O stretching of C(=O)-OH group  
10 from lactone appears at  $1169\text{ cm}^{-1}$ . Besides that, another important feature in this spectrum is the lack of a  
11 very broad band around  $3300\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$  and a band at  $1445\text{ cm}^{-1}$ , which correspond to the O-H and C-O-  
12 H stretching of carboxylic acid, respectively. Thus, these data obtained from IR spectroscopy strongly  
13 indicates that the sophorolipid produced is on the lactonic and not in the acid form. Other bands, at  $1240$   
14 and  $1040\text{ cm}^{-1}$  are attributed to the C-O<sub>esters</sub> and C-O bonds found in the carbohydrate structure.

15

### 16 *NMR*

17 The structure of SL was confirmed by the combined analyses of monodimensional ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ )  
18 and bidimensional (HSQC and HMBC) NMR experiments.  $^1\text{H}$  NMR spectrum (Fig. 3) showed signals  
19 corresponding to the most important structural features, as olefinic protons at 5.18 ppm, anomeric protons  
20 at 4.38 and 4.30 ppm, others carbohydrates protons between 3.0 and 4.0 ppm and at high field, from 2.5 to  
21 0.5 ppm, all the aliphatic protons. Of these, it could be identified the methylene of lactone at 2.20 ppm and  
22 the methyl group of the acetylated hydroxyl, at 1.91 ppm. From 0.50 to 1.50 are located the signals of  
23 aliphatic protons of fatty acid chain.

24  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum showed signals typical of carbonyl groups around 173 ppm, corresponding to  
25 the acetyl and lactone C=O group, two signals of olefinic carbons, at 129.9 and 129.7 ppm and two signals  
26 of anomeric carbons, at 104.1 and 102.3 ppm. Between 85 and 60 ppm, there were signals of the others  
27 carbohydrates carbons and between 40 and 15 ppm, there were signals of aliphatic and methyl of acetyl  
28 group.

29 The combined analyses of mononuclear ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ ) and heteronuclear (HSQC and HMBC)  
30 experiments permitted the fully identification of this sophorolipid in the lactonic form containing two acetyl  
31 groups at primary hydroxyl (OH-6) of both glucoses units. From the  $^{13}\text{C}$  spectrum (Fig. x), the two C-6 of  
32 carbohydrates could be identified (63.6 and 62.1 ppm) and used to find their corresponding hydrogens (4.15  
33 and 3.98 ppm) in the HSQC spectrum (Fig. x). By the analysis of HMBC spectrum (fig. X), it could be  
34 identified two cross peaks between H-6 and two signals of carbonyl of acetyl groups, thus demonstrating  
35 that both molecules of glucose were acetylated at the primary hydroxyl. Similarly, by analysis of the same  
36 spectrum, a cross peak at 4.80 ppm x 173.2 ppm clearly indicates a carbonyl coupled three bonds away to  
37 the H-4 of a glucose unit, therefore demonstrating that the molecule is cyclic and in the lactonic form.

38 The results of the FTIR and NMR confirmed that the sophorolip obtained from chicken fat by *C.*  
39 *bomboicola* was diacetylated lactone form, when the substrate lipid is rich in stearic and oleic acids, favored  
40 this conformation obtaining SL (Davila et al . 1994)

## 1 *Surface tension and CMC*

2

3 The critical micelle concentration is the lowest concentration where occurs the formation of  
4 micelles of a surfactant, and the lowest ones indicate that lower surfactant concentrations are necessary to  
5 saturate the two-phase interface to begin to form the micelles (Daverey and Pakshirajan 2010). The  
6 diacetylated lactonic sophorolipid produced from chicken fat reduced the surface tension of water from 70  
7 mN/m to 35 mN/m and CMC had 65 mg L<sup>-1</sup> (Fig. 7).

8

## 9 *Emulsification index*

10

11 The greatest emulsification index of SL was produced in the lubricant oil with E24=85% and  
12 decreases 21% of the emulsion formed after 168 hours. The hydrocarbons n-heptane and toluene showed  
13 results of E24=63 e 58%, respectively and were more stable, maintaining approximately 90% of the  
14 emulsion after 168 hours. The kerosene had the lowest emulsification index and was also unstable, reducing  
15 in 44% the formed emulsion after 168 hours. The SL *C. bombicola* showed no ability of forming such  
16 emulsion of diesel, gasoline, canola oil and soybean oil.

17

## 18 *Bioremediation assays*

19

20 The Fig 8, shown the results of cumulative CO<sub>2</sub> production in the 7 days of bioremediation assays.  
21 The addition of sophorolipids in low concentration (1 g Kg<sup>-1</sup> soil) enhanced significantly the CO<sub>2</sub>  
22 production, in contrast other concentrations of sophorolipids (3 or 5 g Kg<sup>-1</sup> soil) presented lower quantities  
23 of CO<sub>2</sub> production. Results showed that, in the treatments T1 and T4 the greatest liberation of CO<sub>2</sub> occurred  
24 in the first 4 days of incubation, indicating that, the addition of sophorolipids had a fast and short effect on  
25 the availability of easy degradation substrates from the waste of oil, promoting the biologic activity of  
26 inoculated microorganisms. In more highest concentration of sophorolipids this effect of solubilization of  
27 oil compounds was more slow and the CO<sub>2</sub> liberation occurs after 3 days of incubation (Fig. 9 A,B).

28

## 29 **DISCUSSION**

30

31 The fermentation medium composition can influence the structure and amount of sophorolipids  
32 produced by *C. bombicola*. Among the substrates used, the best combination was glucose and chicken fat,  
33 reaching 16.83 g L<sup>-1</sup> of SL. Glucose was the most promising hydrophilic source for producing, coinciding  
34 with the results Bajaj et al. (2012). The *C. bombicola* is capable of using sucrose as a substrate for  
35 production of SL, but in smaller quantities than glucose. In this study, there was a 30% reduction of SL  
36 production when glucose was replaced by sucrose, also Klekner et al. (1991) obtained lower values in the  
37 presence of this disaccharide.

38

39 The sugarcane molasses and sugarcane juice are complex mixtures having low concentrations of  
40 glucose, approximately 4% molasses (Chen and Chou, 1993) and 0.4% in the broth (Oliveira., 2007), which  
may have resulted in the less efficient production of the SL. At low glucose concentrations, part of the fatty

1 acids available are targeted for cell maintenance and not for synthesis of biosurfactant (Van Bogaert et al.  
2 2007).

3 Fatty acids with C16 and C18 chains are important in the production of SL, because substrates  
4 with this length of carbon chain can be directly incorporated into the hydroxy acid portion of glycolipid  
5 (Davila et al 1994; Felse et al 2007.). The chicken fat, used in this study, showed high composition of oleic  
6 acid (38.46%) and palmitic acid (23.9%), obtaining higher production when compared to vegetable oil.  
7 Therefore, this residue can be considered a feasible option for the production of SL.

8 By examining the concentrations of medium components, the best yield was 41,63 g L<sup>-1</sup> of SL in  
9 medium with 75 g L<sup>-1</sup> of chicken fat, 100 g L<sup>-1</sup> of glucose, 2.5 g L<sup>-1</sup> yeast extract and without adding urea.  
10 Similar results were obtained in studies using other animal fats, Davila et al. (1994) got 51.0 g L<sup>-1</sup> in medium  
11 containing fish oil. Desphande and Daniels (1995) used pork fat in the initial test where were obtained 93.2  
12 g L<sup>-1</sup>.

13 Generally the nitrogen sources used in the SL production are urea and yeast extract (Bajaj et al.  
14 2012), but in the presence of low-cost substrates it is not always required the presence of these sources,  
15 because alternative substrates already have in their composition the necessary nutrients. Davila and  
16 Pakshirajan (2009a) applied sugar cane molasses to produce SL, and obtained high yields in the medium  
17 with molasses and soybean oil, amounting 23,25 g L<sup>-1</sup>, as compared to the medium containing these two  
18 substrates more yeast extract and urea values decreased to 12,67 g L<sup>-1</sup>. The optimized condition in this study  
19 required only the supplementation of yeast extract as a nitrogen source.

20 The variations in the SL structure influence the surface-active properties, according to Ma et al.  
21 (2012) lactonic SL have lower CMC, being more hydrophobic and less soluble in water molecules, while  
22 the acidic presents CMC at higher concentrations. The diacetylated lactonic SL produced in this work by  
23 *C. bombicola* in chicken fat and glucose possess ability to decrease the surface tension of 35 mN/m and the  
24 CMC 65 mg L<sup>-1</sup>. These results are similar to the lactonic SL produced by Daverey and Pakshirajan (2009b)  
25 in sugarcane molasses and soybean oil with surface tension 34,15 mN/m and the CMC 59,54 mg L<sup>-1</sup>. Basak  
26 and Das (2014) produced acidic SL by *Cryptococcus sp* VITGBN2 and fixed the tension on 33 mN/m and  
27 the CMC 280 mg L<sup>-1</sup>.

28 The emulsification capacity of biosurfactants is also a crucial factor for use in various industrial  
29 areas (Banat et al. 2000). The emulsification activity is determined not only by the tension between the  
30 surfaces, it also depends on the solvent used due to interaction between the hydrophobic part of the  
31 surfactant and the substrates. The glycolipids of this study are good emulsifying agents in various  
32 hydrocarbons such as toluene and n-heptane, and the lubricating oil.

33 The results of bioremediation assays showed that sopholipids produced by *Candida bombicola*  
34 have a high potential for application in soil bioremediation. This was also observed in other works. Kang  
35 et al. (2009) evaluated the viability of shophorolipids bioremediation of oil-contaminated soils. These work  
36 showed that sophorolipids addition was effective promoting 80% of biodegradation of crude oil. Ayed et  
37 al. (2015) also observed early effects of biosurfactant addition in biodegradation of oil. They observed that  
38 the biodegradation percentage was only 5% after incubation for the first three days and thereafter increased  
39 linearly until reaching a maximum value (about 53%) after 15 days of incubation. According Pacwa-  
40 Płociniczak et al. (2011) biosurfactants activities depend the concentration of these compounds until the

1 critical micelle concentration (CMC). At concentrations above the CMC, biosurfactant molecules associate  
 2 to form micelles, bilayers and vesicles. These effects can enhanced the hydrocarbon biodegradation by  
 3 mobilization, solubilization or emulsification. In this way, the bioremediation can be stimulated by increase  
 4 of bioavailability substrates for microorganisms or increase the hydrophobicity of surfaces in hydrophobic  
 5 compounds allowing a best contact and association with bacterial cells. Sophorolipids produced by  
 6 *Candida bombicola* showed a CMC of 65 mg L<sup>-1</sup> that is lower and, suggest a high capacity of emulsification  
 7 in low concentrations. In addition, this was a good synergic effect with the inoculation of consortium of  
 8 *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*, showed increased of microbial activity inclusive in the  
 9 treatments with reduced amount of inoculum.

## 11 ACKNOWLEDGEMENTS

13 The authors acknowledge the financial support provided by CAPES - Brazil.

## 15 REFERENCE

- 16 1. Acmite Market Intelligence (2013) Global Surfactant MarkeT Report. v.I.
- 17 2. Alef k, Nannipieri P (1995) Methods in applied soil microbiology and biochemistry. Academic Press,  
 18 London
- 19 3. Ashby RD, Solaiman DKY, Foglia TA (2006) The use of fatty acid esters to enhance free acid  
 20 sophorolipid synthesis. Biotechnol Lett
- 21 4. Asmer HJ, Lang S, Wagner F, Wray V (1988) Microbial production, structure elucidation and  
 22 bioconversion of sophorose lipids.
- 23 5. Ayed HB, Jemil N, Maalej H, Bayouhd A, Nasri NHM (2015) Enhancement of solubilization and  
 24 biodegradation of diesel oil by biosurfactant from *Bacillus amyloliquefaciens* An6. Int Biodeter  
 25 Biodegr
- 26 6. Bajaj V, Tilay A, Annapure U (2012) Enhanced production of bioactive sophorolipids by *Starmerella*  
 27 *bombicola* NRRL Y-17069 by design of experiment approach with successive purification and  
 28 characterization.
- 29 7. Banat IM, Makkar RS, Cameotra SS (2000) Potential commercial applications of microbial  
 30 surfactants. Appl Microbiol Biotechnol doi:10.1007/s002530051648
- 31 8. Centenaro GS, Furlan VJM, Soares LAS (2008) Gordura de frango: alternativa tecnológicas e  
 32 nutricionais. Semina: Ciências Agrárias doi:10.5433/1679-0359.2008v29n3p619
- 33 9. Chandran P, Das N (2011) Characterization of sophorolipid biosurfactant produced by yeast species  
 34 grown on diesel oil. I.J.S.N.
- 35 10. Chandran P, Das N (2012) Role of sophorolipid biosurfactant in degradation of diesel oil by *Candida*  
 36 *tropicalis*. Biorem J doi: 10.1080/10889868.2011.628351
- 37 11. Daverey A, Pakshirajan K (2009a) Production of sophorolipids by the yeast *Candida bombicola*  
 38 using simple and low cost fermentative media. Food Res Int doi:10.1016/j.foodres.2009.01.014

- 1 12. Daverey A, Pakshirajan K (2009b) Production, characterization, and properties of sophorolipids from  
2 the yeast *Candida bombicola* using a low-cost fermentative medium. Appl Biochem Biotechnol  
3 doi:10.1007/s12010-008-8449-z
- 4 13. Daverey A, Pakshirajan K (2010) Sophorolipids from *Candida bombicola* using mixed hydrophilic  
5 substrates: production, purification and characterization. Colloids Surf., B doi:  
6 10.1016/j.colsurfb.2010.04.002
- 7 14. Davila AM, Marchal R, Monin N, Vandecasteele JP (1993) Identification and determination of  
8 individual sophorolipids in fermentation products by gradient elution high-performance liquid  
9 chromatography with evaporative light-scattering detection. J Chromatogr doi:10.1016/0021-  
10 9673(93)83295-4
- 11 15. Deshpande M, Daniels L (1995) Evaluation of sophorolipid biosurfactant production by *Candida*  
12 *bombicola* using animal fat. Bioresour Technol doi:10.1016/0960-8524(95)00116-6
- 13 16. Du Nouy PL (1925) An Interfacial Tensiometer for Universal Use. J Gen Physiol. 7:625-  
14 631doi:10.1085
- 15 17. Dubois M, Gilles KA, Rebers JK, Smith F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars  
16 and related substances. Anal. Chem doi:10.1021/ac60111a017
- 17 18. Felse AP, Shah V, Chain J, Rao KJ, Gross RA (2007) Sophorolipid biosynthesis by *Candida*  
18 *bombicola* from industrial fatty acid residues. Enzyme Microb Technol  
19 doi:10.1016/j.enzmictec.2006.04.013
- 20 19. Ganesh L. Maddikeri, Parag R. Gogate, Aniruddha B. Pandit (2015). Improved synthesis of  
21 sophorolipids from waste cooking oil using fed batch approach in the presence of ultrasound. Che.  
22 Eng J doi:10.1016/j.cej.2014.11.010
- 23 20. Gharaei-Fathabad E (2010) Biosurfactants in pharmaceutical industry: A mini-review. Am J Drug  
24 Discov Develop doi:10.3923/ajdd.2011.58.69
- 25 21. Kang, SW, Kim YB, Shin JD, Kim EK (2010) Enhanced biodegradation of hydrocarbons in soil by  
26 microbial biosurfactant, sophorolipid. Appl Biochem Biotechnol doi:10.1007/s12010-009-8580-5
- 27 22. Klekner V, Kosaric N, Zhou QH (1991) Sophorose lipids produced from sucrose. Biotechnol Lett  
28 doi: 10.1007/BF01027680
- 29 23. Konishi M, Yoshida Y, Horiuchi J (2015) Efficient production of sophorolipids by *Starmerella*  
30 *bombicola* using a corncob hydrolysate medium. J Biosci Bioeng doi:10.1016/j.jbiosc.2014.08.007
- 31 24. Koster CG, Heerma W, Pepermans HAM, Groenewegwn A, Peters H, Haverkamp J (1995) Tandem  
32 mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy studies of *Candida bombicola*  
33 sophorolipid and product formed on hydrolysis by cutinase. Anal Biochem  
34 doi:10.1006/abio.1995.1448
- 35 25. Ma XJ, Li, H, Song X (2012) Surface and biological activity of sophorolipid molecules produced by  
36 *Wickerhamiella domercqiae* var. sophorolipid CGMCC 1576. J Colloid Interface Sci  
37 doi:10.1016/j.jcis.2012.03.007
- 38 26. Makkar RS, Cameotra SS, Banat IM (2011) Advances in utilization of renewable substrates for  
39 biosurfactant production. AMB Express doi:10.1186/2191-0855-1-5

- 1 27. Mariano AP, Kataoka APAG, Angelis DF, Bonota DM (2007) Laboratory study study on the  
2 bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. Braz J Microbiol  
3 doi:10.1590/S1517-83822007000200030
- 4 28. Morais EB, Tauk-Tornisiero SM (2009) Biodegradation of oil refinery residues using mixed-culture  
5 of microorganisms isolated from a landfarming. Braz Arch Biol Technol doi:10.1590/S1516-  
6 89132009000600029
- 7 29. Nuñez A, Ashby R, Foglia TA, Solaiman, DKY (2001) Analysis and characterization of  
8 sophorolipids by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization.  
9 Chromatographia doi:10.1007/BF02493019
- 10 30. Oliveira ACG, Spoto MHF, Canniatti-Brazaca SG, Sousa CP; Gallo CR (2007) Efeitos do  
11 processamento térmico e da radiação gama na conservação de caldo de cana puro e adicionado de  
12 suco de frutas. Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas doi:10.1590/S0101-20612007000400029
- 13 31. Oliveira, M.R.; Neto, D.C.; Baldo, C.; Magri, A.; Celligoi, M.A.P.C. (2014) Biosynthesis and  
14 production of sophorolipids. Internacioal Journal of Scientific & Techonology Research doi:  
15 32. Otto RT, Daniel HJ, Pekin G, Muller-Decker K, Fürstenberger G, Reuss G, Syldatk C. (1999)  
16 Production of sophorolipids from whey. II. Product composition, surface active properties,  
17 cytotoxicity and stability against hydrolases by enzymatic treatment. Appl Microbiol Biotechnol  
18 33. Pacwa-Płociniczak M, Płaza GA, Piotrowska-Seget Z, Cameotra SS (2011) Environmental  
19 applications of biosurfactants: recent advances. Int J Mol Sci doi:10.3390/ijms12010633
- 20 34. Palme O, Comanescu G, Stoineva I, Radel S, Benes E, Develter D, Wray V, Lang, S (2010)  
21 Sophorolipids from *Candida bombicola*: Cell separation by ultrasonic particle manipulation. Eur J  
22 Lipid Sci Technol doi:10.1002/ejlt.200900163
- 23 35. Rau U, Hammem S, Heckmann R, Wray V, Lang S (2001) Sophorolipids: a source for novel  
24 compounds. Ind Crop Prod doi: 10.1016/S0926-6690(00)00055-8
- 25 36. Ribeiro IA, Bronz MR, Castro MF, Ribeiro, MHL (2013) Sophorolipids: improvement of the  
26 selective production by *Starmerella bombicola* through the design of nutritional requirements. Appl  
27 Microbiol Biotechnol doi:10.1007/s00253-012-4437-x
- 28 37. Shah V, Docel FG, Seyoum T, Eaton KM, Zalenskayai I, Hagver R, Azim A, Gross R (2005)  
29 Sophorolipids, Microbial Glycolipids with Anti-Human Immunodeficiency Virus and Sperm-  
30 Immobilizing Activities. Antimicrob Agents Chemother doi:10.1128/AAC.49.10.4093-4100.2005
- 31 38. Shah V, Jurjevic M, Badia D (2007) Utilization of restaurant waste oil as a precursor for sophorolipid  
32 production. Biotechnol Prog doi:10.1021/bp0602909
- 33 39. Solaiman DKY, Ashby RD, Nuñez A, Foglia TA (2004) Production of sophorolipids by *Candida*  
34 *bombicola* grown on soy molasses as substrate. Biotechnol Lett  
35 doi:10.1023/B:BILE.0000036605.80577.30
- 36 40. Saharan BS, Sahu RK, Sharma D (2011) A review on biosurfactants: fermentation, current  
37 developments and perspectives. Genet Eng Biotechnol J
- 38 41. Schofield MH, Thavasi TR, Gross RA (2013) Modified sophorolipids for the inhibition of plant  
39 pathogens united states. Publishing Patent Application Publication USA.  
40 <http://patentscope.wipo.int/search/en/WO2013052615> Accessed 15 June 2014

- 1 42. Sheppard JD, Mulligan CN (1987) Applied Microbiology Biotechnology The production of surfactin  
2 by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. Appl Microbiol Biotechnol doi:10.1007/BF00251931
- 3 43. Van Bogaert INA, Saerens K, De Muynck C, Develter D, Soetart W, Vandamme EJ (2007)  
4 Microbial production and application of sophorolipids. Appl Microbiol Biotechnol  
5 doi:10.1007/s00253-007-0988-7
- 6 44. UBABEF União Brasileira de Avicultura (2011) Publishing Relatório Anual UBABEF 2010/2011  
7 <http://www.ubabef.com.br/files/publicacoes/8ca705e70f0cb110ae3aed67d29c8842.pdf> Accessed 03  
8 January 2015  
9

1 **Tables**

2

3 **Table 1** Box Behnken  $3^3$  Design to investigate the effects of chicken fat, glucose and urea production  
 4 sophorolipids by *Candida bombicola* at 30, 150 rpm for 120 hours.

Assay	$x_1$	$x_2$	$x_3$	Consumption glucose (g L <sup>-1</sup> )	Consumption chicken fat (g L <sup>-1</sup> )	Biomass (g L <sup>-1</sup> )	SL production (g L <sup>-1</sup> )	Eficiência Cons/SL (%)
1	-1	-1	0	8,63	6,19	3,74	3,57	24,94
2	1	-1	0	6,85	24,51	4,94	13,18	43,40
3	-1	1	0	36,97	20,34	7,61	16,52	29,80
4	1	1	0	42,82	21,59	7,55	26,81	43,02
5	-1	0	-1	33,62	39,52	7,51	31,13	44,00
6	1	0	-1	36,60	32,63	7,17	29,73	44,37
7	-1	0	1	33,15	9,27	4,51	13,03	31,75
8	1	0	1	32,13	21,29	5,92	12,29	23,77
9	0	-1	-1	5,83	19,98	6,07	7,24	29,00
10	0	1	-1	48,69	33,16	7,75	41,63	52,56
11	0	-1	1	6,38	9,47	1,07	1,68	10,95
12	0	1	1	31,08	9,77	5,82	14,76	37,34
13	0	0	0	39,91	17,37	7,19	29,81	50,29
14	0	0	0	44,53	21,97	7,21	29,06	45,16
15	0	0	0	42,48	23,17	8,05	32,06	50,47

Níveis

	-1	0	1
<b>Chicken fat</b> <b>(X<sub>1</sub>)</b>	25	75	125
<b>Glucose (X<sub>2</sub>)</b>	10	55	100
<b>Urea (X<sub>3</sub>)</b>	0	2	4

5

6

## 1 **Figure Captions**

2

3 **Fig. 1** Response surface of sophorolipids by *Candida bombicola* relating glucose factors ( $x_2$ ) and urea ( $x_3$ )  
4 and fixed fat ( $x_1$ ) in the optimum range (75 g L<sup>-1</sup>)

5

6 **Fig. 2** FT-IR spectrum of SL produced by *Candida bombicola* fat chicken and glucose

7

8 **Fig. 3** <sup>1</sup>H NMR spectrum of soforolipid produced by *Candida bombicola* in fat chicken and glucose

9

10 **Fig. 4** <sup>13</sup>C NMR spectrum of soforolipid produced by *Candida bombicola* in fat chicken and glucose

11

12 **Fig. 5** HSQC spectrum of soforolipid produced by *Candida bombicola* in fat chicken and glucose

13

14 **Fig. 6** HMBC spectrum of soforolipid produced by *Candida bombicola* in fat chicken and glucose

15

16 **Fig. 7** Relationship between the surface tension and the concentration of sophorolipids

17

18 **Fig. 8** Cumulative production of CO<sub>2</sub> during the biodegradation assay. C1: Enzilimp 4 g Kg<sup>-1</sup> soil without  
19 SLP; T1: Enzilimp 4 g Kg<sup>-1</sup> soil plus SPL 1 g Kg<sup>-1</sup> soil; T2: Enzilimp 4 g Kg<sup>-1</sup> soil plus SPL 3 g Kg<sup>-1</sup> soil;  
20 T3: Enzilimp 4 g Kg<sup>-1</sup> soil plus SPL 5 g Kg<sup>-1</sup> soil; C2: Enzilimp 2 g Kg<sup>-1</sup> soil without SLP; T4: Enzilimp 2  
21 g Kg<sup>-1</sup> soil plus SPL 1 g Kg<sup>-1</sup> soil; T5: Enzilimp 2 g Kg<sup>-1</sup> soil plus SPL 3 g Kg<sup>-1</sup> soil; T6: Enzilimp 2 g Kg<sup>-1</sup>  
22 soil plus SPL 5 g Kg<sup>-1</sup> soil. MSD: Minimal significant difference according Tukey test (p<0,05)

23

24 **Fig. 9** Daily CO<sub>2</sub> production during bioremediation assays. C1: Enzilimp 4 g Kg<sup>-1</sup> soil without SLP; T1:  
25 Enzilimp 4 g Kg<sup>-1</sup> soil plus SPL 1 g Kg<sup>-1</sup> soil; T2: Enzilimp 4 g Kg<sup>-1</sup> soil plus SPL 3 g Kg<sup>-1</sup> soil; T3:  
26 Enzilimp 4 g Kg<sup>-1</sup> soil plus SPL 5 g Kg<sup>-1</sup> soil; C2: Enzilimp 2 g Kg<sup>-1</sup> soil without SLP; T4: Enzilimp 2 g  
27 Kg<sup>-1</sup> soil plus SPL 1 g Kg<sup>-1</sup> soil; T5: Enzilimp 2 g Kg<sup>-1</sup> soil plus SPL 3 g Kg<sup>-1</sup> soil; T6: Enzilimp 2 g Kg<sup>-1</sup>  
28 soil plus SPL 5 g Kg<sup>-1</sup> soil.

29

## Figures

Fig 1

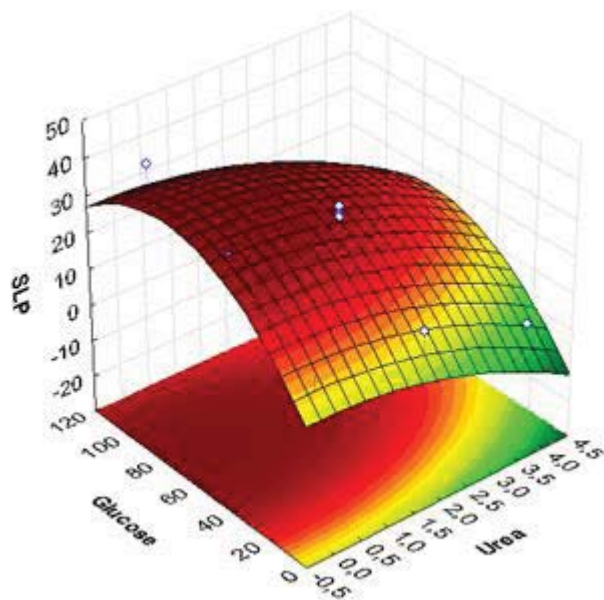


Fig 2

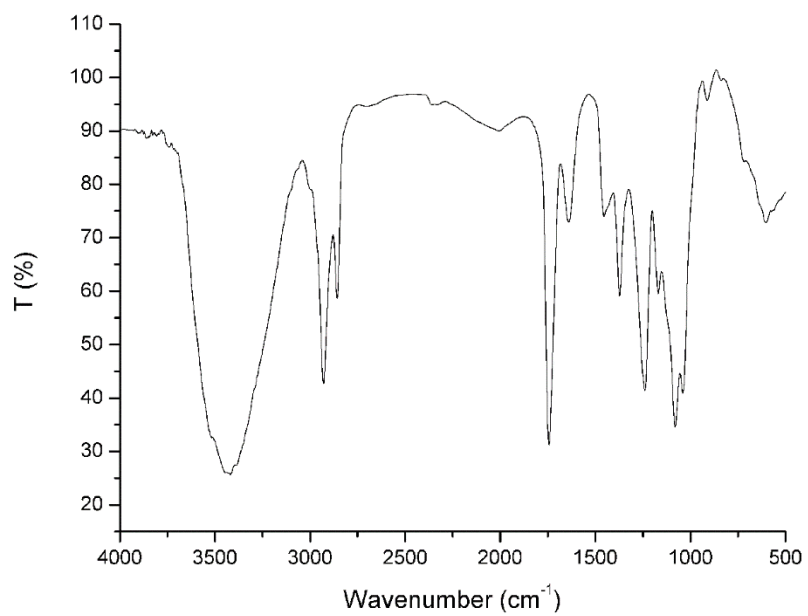


Fig 3

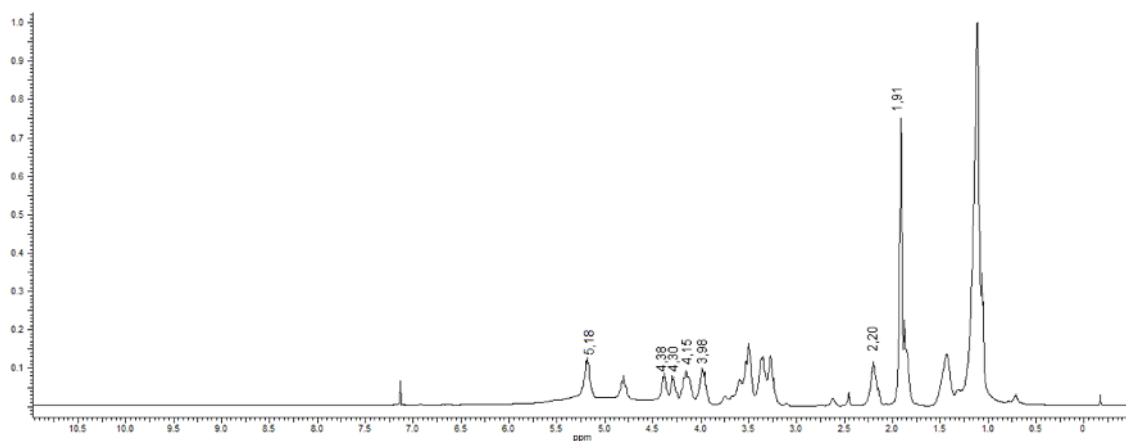


Fig 4

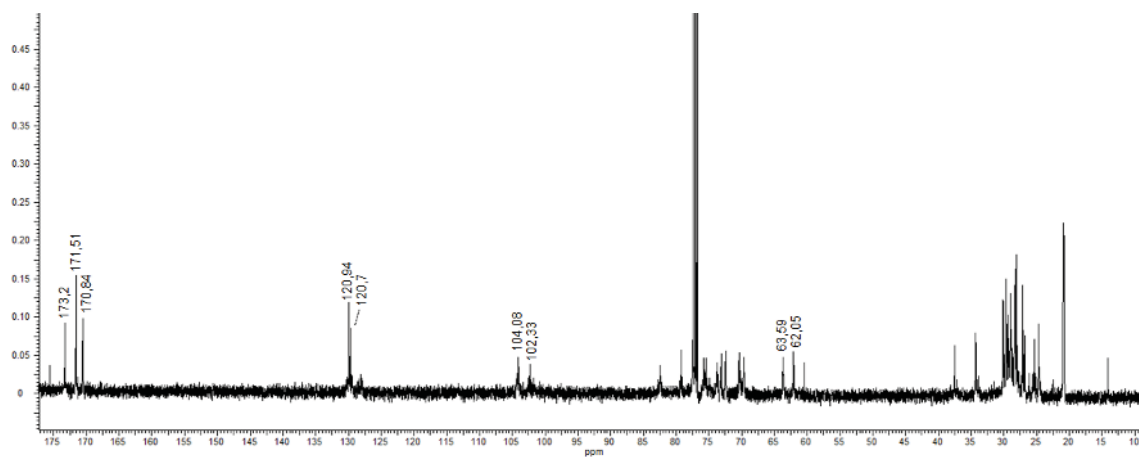


Fig 5

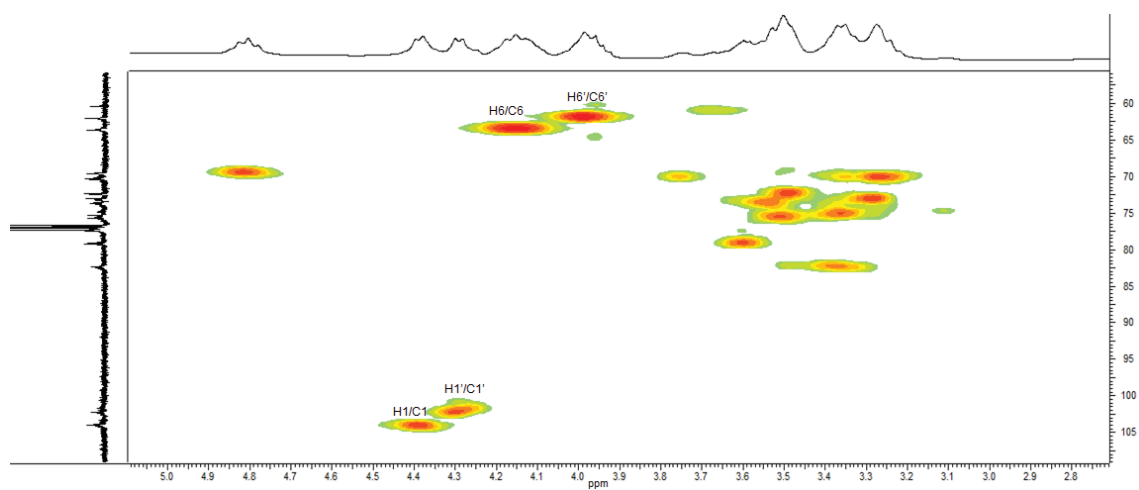


Fig. 6

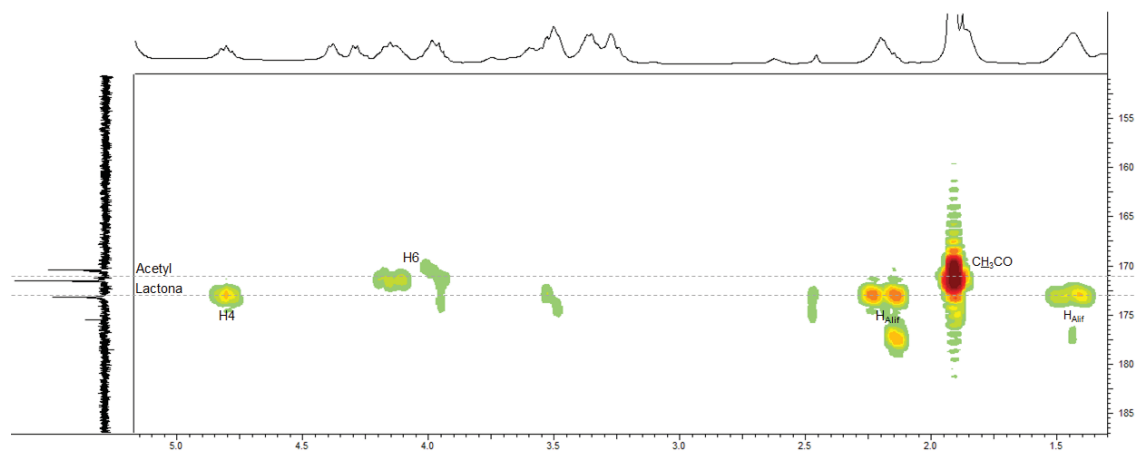


Fig. 7

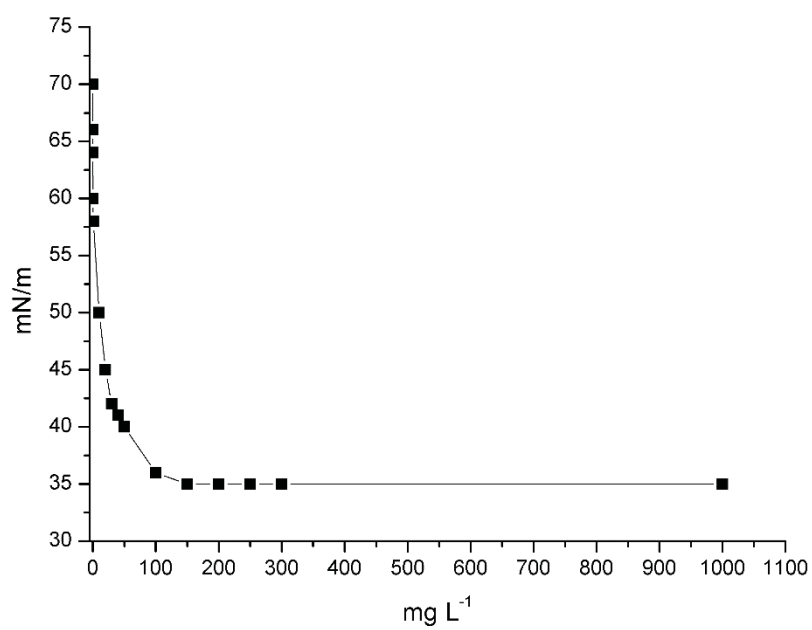


Fig 8

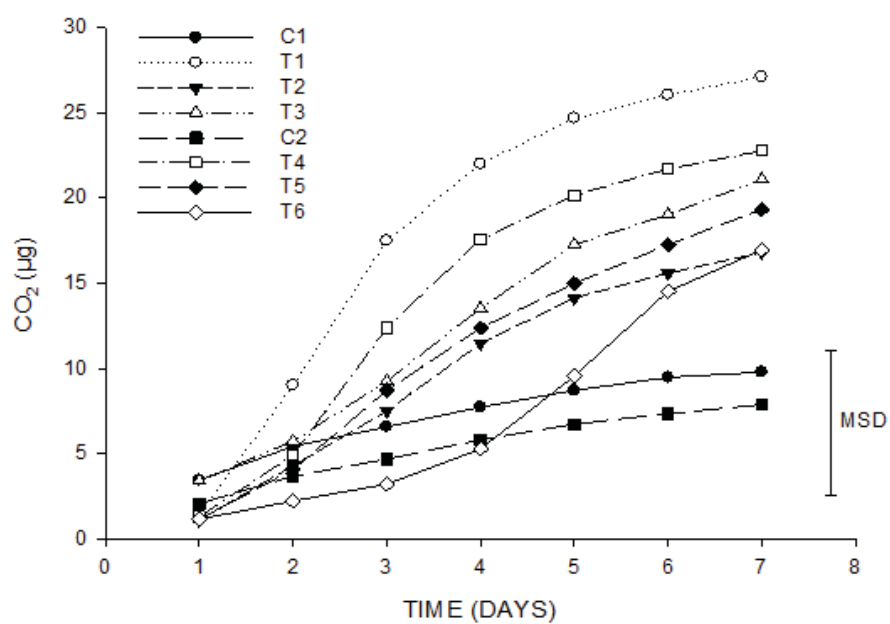
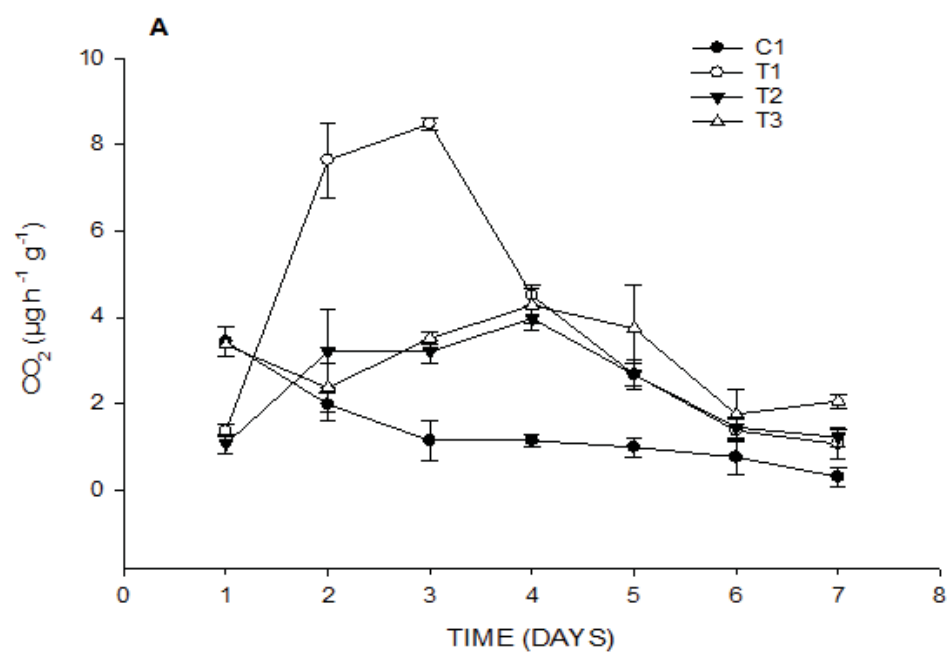
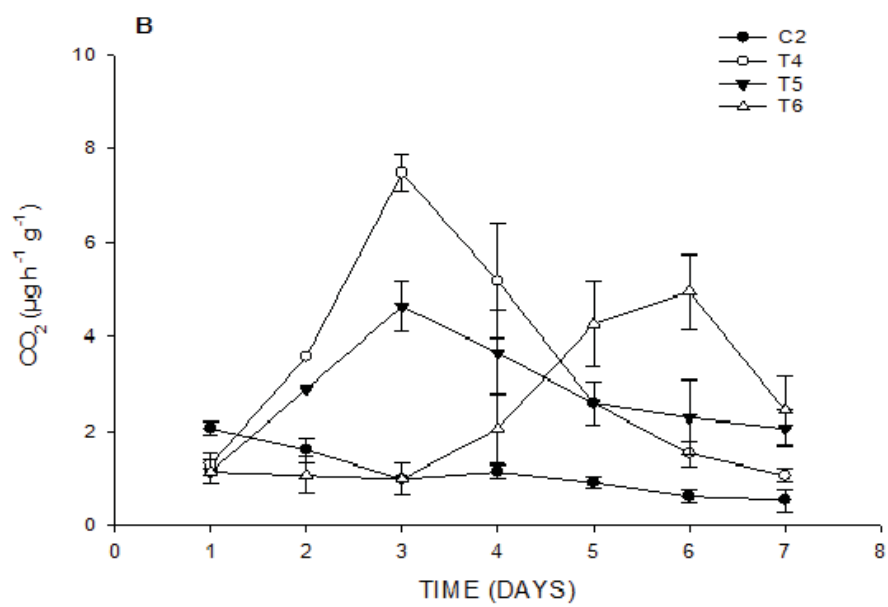


Fig 9





## 6 CONCLUSÕES

- Dentre os substratos testados, a melhor combinação para a produção de soforolipídios pela *Candida bombicola* ATCC 22214 foi a gordura de frango com glicose, atingindo 16,83 g L<sup>-1</sup>;
- Na condição otimizada do meio de cultivo, a maior produção foi de 41,63 g L<sup>-1</sup> de SLP em 75 g L<sup>-1</sup> de gordura de frango, 100 g L<sup>-1</sup> glicose e 2,5 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, sem necessidade da ureia fonte de nitrogênio;
- Os soforolipídios produzidos na condição otimizada apresentaram a forma lactônica diacetilada, características tensoativas com capacidade de diminuir a tensão superficial da água em 35 mN/m e com CMC de 65 mg L<sup>-1</sup> e são agentes emulsificantes em diferentes hidrocarbonetos.
- Os soforolipídios produzidos por *C. bombicola* teve potencial de aplicação na biorremediação de solos contaminados com óleo lubrificante.
- O consórcio bacteriano quando acrescido de soforolipídios aumentou a eficiência da biodegradabilidade, quando comparado aos ensaios apenas com os microrganismos comerciais.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ALBRECHT, A.; RAU, U.; WAGNER, F. Initial steps of sophoroselipid biosynthesis by *Candida bombicola* ATCC 22214 grown on glucose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 67–73, 1996.
- ALEF, K.; NANNIPIERI, P. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. London: Academic Press, p.214 – 219, 1995.
- ANDERSON, J.M; INGRAM, J.S.I. **Tropical soil biology and fertility a handbook of methods**. 2ed. Wallingford: CAS, p. 221, 1993.
- AKIRA, S.; AKIRA, Y. **Method of Modifying Quality of Wheat Flour Product**. JapanKao Corp, 1986.
- ASHBY, R. D.; MACLOON, A. J.; SOLAIMAN, D. K. Y.; YEE, W. C.; REED, M. A Process Model for Approximating the Production Costs of the Fermentative Synthesis of Sophorolipids. **Journal of Surfactants and Detergents**, 2013.
- ASHBY, R. D.; NUÑEZ, A.; SOLAIMAN, D. K. Y.; FOGLIA, T. A. Sophorolipid biosynthesis from a biodiesel co-product stream. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 82, n. 9, p. 625–630, 2005.
- ASHBY, R. D.; SOLAIMAN, D. K. Y.; FOGLIA, T. A. Property control of sophorolipids: influence of fatty acid substrate and blending. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 6, p. 1093–1100, 2008.
- ASHBY, R. D.; SOLAIMAN, D. K. Y.; FOGLIA, T. A. The use of fatty acid esters to enhance free acid sophorolipid synthesis. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 4, p. 253–260, 2006.
- ASMER, H. J.; LANG, S.; WAGNER, F.; WRAY, V. Microbial production, structure elucidation and bioconversion of sophorose lipids. **Journal of Academic Industrial Research**, v. 65, n. 9, p. 1460–1466, 1988.
- BAJAJ, V.; TILAY, A.; ANNAPURE, U. Enhanced production of bioactive sophorolipids by *Starmerella bombicola* NRRL Y-17069 by design of experiment approach with successive purification and characterization. **Journal of Oleo Science**, v. 61, n. 7, p. 377–386, 2012.
- BASAK, G.; DAS, N. Characterization of sophorolipid biosurfactant produced by *Cryptococcus* sp. VITGBN2 and its applications on Zn(II) removal from electroplating wastewater. **Journal of Environmental Biology**. v. 35, p. 1087-1094, 2014
- BHADORIYA, S. S.; MADORIYA, N. Biosurfactants: A New Pharmaceutical Additive for Solubility Enhancement and Pharmaceutical Development. **Biochemistry & Pharmacology**, v. 2, n. 2, 2013.
- BLUTH, M. H.; KANDIL, E.; MULLER, C. M.; SHAH, V.; LIN, Y.-Y.; ZHANG, H.; DRESNER, L.; LEMPERT, L.; NOWAKOWSKI, M.; GROSS, V.; SCHULZE, R.; ZENILMAN, M. E . Sophorolipids block lethal effects of septic shock in rats in a cecal ligation and puncture model of experimental sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 34, n. 1, p. E188, 2006.
- BRADFORD, M.M., Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248–254, 1976.

- BRAKEMEIER, A.; LANG, S.; WULLBRANDT, D.; MERSHEL, L.; BENNINGHOVEN, A.; BUSCHMANN, F. Novel Sophorose lipids from microbial conversio of 2-Alkcanols. **Biotechnology Letters**, v. 11, n. 11, p. 1183–1188, 1995.
- BRAKEMEIER, A.; WULLBRANDT, D.; LANG, S. *Candida bombicola*: production of novel alkyl glycosides based on glucose/2-dodecanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, n. 2, p. 161–166, 1998.
- BROWN, M. J. Biosurfactants for cosmetic applications. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 13, n. 2, p. 61–64, 1991.
- CASAS, J. A.; LARA, S.G.; GÁRCIA-OCHOA, F. Optimization of a synthetic medium for *Candida bombicola* growth using factorial design of experiments. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, n. 3, p. 221–229, 1997.
- CASAS, J. A.; GARCÍA-OCHOA, F. Sophorolipid production by *Candida bombicola*: medium composition and culture methods. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 88, n. 5, p. 488–494, 1999.
- CAVALERO, D. A.; COOPER, D. G. The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC 22214. **Journal of Biotechnology**, v. 103, n. 1, p. 31–41, 2003.
- CHANDRAN, P.; DAS, N. Characterization of sophorolipid biosurfactant produced by yeast species grown on diesel oil. **International Journal of Science and Nature**, v. 2, n. 1, p. 63–71, 2011.
- CHANDRAN, P.; DAS, N. Role of Sophorolipid biosurfactant in degradation of diesel oil by *Candida tropicalis*. **Bioremediation Journal**, v. 16, n. 1, p. 19–30, 2012
- CHEN, M.; DONG, C.; PENFOLD, J.; THOMAS, R.K.; SMYTHNT.J.P.; PERFUMO, A.; MARCHANT, R.; BANAT, I.M.; STEVENSON, P.; PERRY, A.; TUCKER, I.; CAMPBELL, R.A. Adsorption of sophorolipid biosurfactants on their own and mixed with sodium dodecyl benzene sulfonate, at the air/water interface. **Langmuir**, v. 27, n. 14, p. 8854–8866, 2011.
- CHEN, J.; SONG, X.; ZHANG, H.; QU, Y. Production, structure elucidation and anticancer properties of sophorolipid from *Wickerhamiella domercqiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 3, p. 501–506, 2006a.
- CHEN, J.; SONG, X.; ZHANG, H.; QU, Y.; MIAO, J.Y. Sophorolipid produced from the new yeast strain *Wickerhamiella domercqiae* induces apoptosis in H7402 human liver cancer cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 72, n.1, 52 – 59, 2006b
- CIESIELSKA, K.; VAN BOGAERT, I. N.; CHEVINEAU, S.; LI, B.; GROENEBOER, S. SOETAERT, W.; VAN DE PEER, Y.; DEVREESE, B. Exoproteome analysis of *Starmerella bombicola* results in the discovery of an esterase required for lactonization of sophorolipids. **Journal of Proteomics**. v. 98, p. 159 – 174, 2014
- COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two bacillus species. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 224–229, 1987.
- COOPER, D. G.; PADDOCK, D. A. Production of a Biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 173–176, 1984.
- COOPER, D. G.; PADDOCK, D. A. *Torulopsis petrophilum* and surface activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, n. 6, p. 1426–1429, 1983.

- DANIEL, H. J.; OTTO, R.Y.; BINDER, M.; REUSS, M.; SYLDATK, C. Production of sophorolipids from whey: development of a two-stage process with *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 and *Candida bombicola* ATCC 22214 using deproteinized whey concentrates as substrates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 40–45, 1999.
- DANIEL, H. J.; OTTO, R.Y.; REUSS, M.; SYLDATK, C. Sophorolipid production with high yields on whey concentrate and rapeseed oil without consumption of lactose. **Biotechnology Letters**, v. 20, n. 8, p. 805–807, 1998.
- DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Kinetics of growth and enhanced sophorolipids production by *Candida bombicola* using a low-cost fermentative medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 7, p. 2090–2101, 2010.
- DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Production of sophorolipids by the yeast *Candida bombicola* using simple and low cost fermentative media. **Food Res Int**, v.42, p. 499 – 504, 2009.
- DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Production, characterization, and properties of sophorolipids from the yeast *Candida bombicola* using a low-cost fermentative medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 158, n. 3, p. 663–674, 2009a.
- DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K.; SANGEETHA, P. Sophorolipids production by *Candida bombicola* using synthetic dairy wastewater. **International Journal of Environmental Science and Engineering**, v. 1, n. 4, p. 173–175, 2009.
- DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K.; SUMALATHA, S. Sophorolipids production by *Candida bombicola* using dairy industry wastewater. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 13, n. 3, p. 481–488, 2010.
- DAVILA, A. M.; MARCHAL, R.; MONIN, N.; VANDECASTEELE, J.P. Identification and determination of individual sophorolipids in fermentation products by gradient elution high-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection. **Journal of Chromatography**, v. 648, n. 1, p. 139–149, 1993.
- DAVILA, A. M.; MARCHAL, R.; VANDECASTEELE, J. P. Kinetics and Balance of a Fermentation Free from Product Inhibition - Sophorose Lipid Production by *Candida bombicola*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 6–11, 1992.
- DAVILA, A. M.; MARCHAL, R.; VANDECASTEELE, J. P. Sophorose lipid fermentation with differentiated substrate supply for growth and production phases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 47, p. 496–501, 1997.
- DAVILA, A.-M.; MARCHAL, R.; VANDECASTEELE, J.-P. Sophorose lipid production from lipidic precursors: Predictive evaluation of industrial substrates. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 249–257, jul. 1994.
- DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 1, p. 47–64, 1997.
- DESHPANDE, M.; DANIELS, L. Evaluation of sophorolipid biosurfactant production by *Candida bombicola* using animal fat. **Bioresource Technology**, v. 54, n. 1995, p. 143–150, 1995.
- DU NOUY, P. L. an Interfacial tensiometer for universal use. **The Journal of General Physiology**, v. 7, n. 5, p. 625–631, 1925.
- DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

ESDERS, T. W.; LIGHT, R. J. Glucosyl- and acetyltransferases in the biosynthesis of glycolipids from *Candida bogoriensis*. **The Journal of Biological Chemistry**, n. 247, p. 1375-1386, 1972.

FAKRUDDIN, M.D. Biosurfactant: production and application. **Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology**, v. 03, n. 04, 2012.

FELSE, A. P. SHAH, V.; CHAIN, J.; RAO, K.J.; GROSS, R.A. Sophorolipid biosynthesis by *Candida bombicola* from industrial fatty acid residues. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 2, p. 316–323, 2007.

FERRARI, R.A.; KOLLER, F.R. **Fracionamento da gordura de frango**. UEPG – Ciências exatas e da terra, Ciências agrárias e engenharias. v.7, n.1, p. 43 – 51, 2001.

FLEURACKERS, S. J. J. On the use of waste frying oil in the synthesis of sophorolipids. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 108, n. 1, p. 5–12, 2006.

FU, S. L.; Wallner, S. R.; Bowne, W. B.; Hagler, M. D.; Zenilman, M. E.; Gross, R. Sophorolipids and their derivatives are lethal against human pancreatic cancer cells. **The Journal of Surgical Research**, v. 148, n. 1, p. 77–82, 2008.

GLENNIS, R. N.; COOPER, D. G. Effect of substrate on sophorolipid properties. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 83, n. 2, p. 137–145, 2006.

GÖBBERT, U.; LANG, S.; WAGNER, F. Sophorose lipid formation by resting cells of *Torulopsis bombicola*. **Biotechnology Letters**, v. 6, n. 4, p. 225–230, 1984.

GORIN, P. A. J.; SPENCER, J. F. T.; TULLOCH, A. P. Hydroxy fatty acid glycosides of sophorose from *Torulopsis magnoliae*. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 39, n. 6199, p. 846–855, 1961.

GUILMANOV, V.; BALLISTRERI, A.; IMPALLOMENI, G.; GROSS, R.A. Oxygen transfer rate and sophorose lipid production by *Candida bombicola*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 77, n. 5, p. 489–494, 2002.

HARDIN, R.; PIERRE, J.; SCHULZE, R.; MULLER, C. M.; FU, S. L.; WALLNER, S. R.; STANEK, A.; SHAH, V.; GROSS, R. A.; WEEDON, J.; NOWAKOWSKI, M.; ZENILMAN, M. E.; BLUTH, M. H. Sophorolipids improve sepsis survival: effects of dosing and derivatives. **The Journal of Surgical Research**, v. 142, n. 2, p. 314–319, 2007.

HIRATA, Y.; RYU, M.; IGARASHI, K.; NAGATSUKA, A.; STEIMAN, R.; KANAYA, S.; SUGIUR, M. Natural synergism of acid and lactone type mixed sophorolipids in interfacial activities and cytotoxicities. **Journal of Oleo Science**, v. 58, n. 11, p. 565–572, 2009a

HIRATA, Y.; RYU, M.; ODA, Y.; IGARASHI, K.; NAGATSUKA, A.; FURUTA, T.; SAGIURA, M. Novel characteristics of sophorolipids, yeast glycolipid biosurfactants, as biodegradable low-foaming surfactants. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 108, n. 2, p. 142–146, 2009b.

HOMMEL, R. K.; WEBER, L.; WEISS, A.; HIMMELREICH, U.; RILKE, O.; KLEBER, H.-P. Production of sophorose lipid by *Candida (Torulopsis) apicola* grown on glucose. **Journal of Biotechnology**, v. 33, n. 2, p. 147–155, 1994.

HU, Y.; JU, L.-K. Sophorolipid production from different lipid precursors observed with LC-MS. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, n. 10, p. 593–601, 2001.

ITO, S.; KINTA, M.; INOUE, S. Growth of yeasts on n-alkanes: inhibition by a lactonic sophorolipid produced by *Torulopsis bombicola*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 44, n. 9, p. 2221–2223, 1980.

JONES, D. F. Novel macrocyclic glycolipids from *Torulopsis gropengiesseri*. **Journal of the Chemical Society**, v. 39, p. 479–484, 1967.

JOSHI-NAVARE, K.; PRABHUNE, A. A Biosurfactant-sophorolipid acts in synergy with antibiotics to enhance their efficiency. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–8, 2013.

KANG, S.-W.; KIM Y.-B.; SHIN, J. D.; KIM E.-K. Enhanced biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial biosurfactant, sophorolipid. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 3, p. 780–90, mar. 2010

KIM, K.; DALSOO, Y.; LEE, B.; SHIN, D.; KIM, E.K. Characteristics of sophorolipid as an antimicrobial agent. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, n. 2, p. 235–241, 2002.

KIM, Y.-B.; YUN, H. S.; KIM, E.-K. Enhanced sophorolipid production by feeding-rate-controlled fed-batch culture. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 23, p. 6028–6032, 2009.

KITAMOTO, D.; ISODA, H.; NAKAHARA, T. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants from energy-saving materials to gene delivery carriers. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, n. 3, p. 187–201, 2002.

KLEKNER, V.; KOSARIC, N.; ZHOU, Q. H. Sophorose lipids produced from sucrose. **Biotechnology Letters**, v. 13, n. 5, p. 345–348, 1991.

KONISHI, M.; FUKUOKA, T.; MORITA, T.; IMURA, T.; KIMOTO, D. Production of new types of sophorolipids by *Candida batistae*. **Journal of Oleo Science**, v. 57, n. 6, p. 359–369, 2008.

KONISHI, M.; YOSHIDA, Y.; HORIUCHI, J. Efficient production of sophorolipids by *Starmerella bombicola* using a corn cob hydrolysate medium. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 119, n.3, p. 317 – 322, 2015.

KOSTER, C. G.; HEERMA, W.; PEPERMANS, H.A.M.; GROENEWEGWN, A.; PETERS, H.; HAVERKAMPS, J. Tandem mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy studies of *Candida bombicola* sophorolipid and product formed on hydrolysis by cutinase. **Analytical Biochemistry**, v. 230, p. 135–148, 1995.

KRIVOBOK, S.; GUIRAUD, P.; SEIGLE-MURANDI, F.; STEIMAN, R. Production and toxicity assessment of sophorosides from *Torulopsis bombicola*. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 42, p. 1247–1250, 1994.

KURTZMAN, C. P. *Candida kuoi* sp. nov., an anamorphic species of the *Starmerella* yeast clade that synthesizes sophorolipids. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. Pt 9, p. 2307–2311, 2012.

KURTZMAN, C. P.; PRICE, N.P.J.; RAY, K.J.; KUO, T.-M. Production of sophorolipid biosurfactants by multiple species of the *Starmerella (Candida) bombicola* yeast clade. **FEMS Microbiology Letters**, v. 311, n. 2, p. 140–146, 2010.

LI, H.; MA, X.-J.; WANG, S.; SONG, X. Production of sophorolipids with eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid from *Wickerhamiella domercqiae* var. sophorolipid using fish oil as a hydrophobic carbon source. **Biotechnology Letters**, v. 35, n. 6, p. 901–908, 2013.

LOURITH, N.; KANLAYAVATTANAKUL, M. Natural surfactants used in cosmetics: glycolipids. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 31, n. 4, p. 255–261, 2009.

MA, X.-J.; LI, H.; SHAO, L.-J.; SHEN, J.; SONG, X. Effects of nitrogen sources on production and composition of sophorolipids by *Wickerhamiella domercqiae* var. sophorolipid CGMCC 1576. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 6, p. 1623–1632, 2011.

MA, X.-J.; LI, H.; SONG, X. Surface and biological activity of sophorolipid molecules produced by *Wickerhamiella domercqiae* var. sophorolipid CGMCC 1576. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 376, n. 1, p. 165–172, 2012.

MCCAFFREY, W. C.; COOPER, D. G. Sophorolipids production by *Candida bombicola* using self-cycling fermentation. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 79, n. 2, p. 146–151, 1995.

MORETTO, E.; FEET, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais**. Varela editora e livraria, 1998.

MORYA, V. K.; PARK, J.-H.; KIM T. J.; JEON, S.; KIM, E.-K. Production and characterization of low molecular weight sophorolipid under fed-batch culture. **Bioresource Technology**, v. 143C, p. 282–288, 2013.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, n. 2, p. 183–198, 2005.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Heavy metal removal from sediments by biosurfactants. **Journal of Hazardous Materials**, v. 85, n. 1-2, p. 111–125, 2001.

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

NUÑEZ, A.; ASHBY, R.; FOLGIA, T.A. SOLAIMAN, D.K.Y. Analysis and characterization of sophorolipids by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization. **Chromatographia**, v. 53, p. 673–677, 2001.

NUÑEZ, A.; ASHBY, R.; FOLGIA, T.A. SOLAIMAN, D.K.Y. LC/MS analysis and lipase modification of the sophorolipids produced by *Rhodotorula bogoriensis*. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 13, p. 1087–93, jul. 2004.

OLIVEIRA, M.R.; NETO, D.C.; BALDO, C.; MAGRI, A.; CELLIGOI, M.A.P.C. Biosynthesis and production of sophorolipids. **Internacioal Journal of Scientific & Techonology Research**. v.3, n.11, p. 133 – 146, 2014.

OTTO, R. T.; DANIEL, H.-J.; PEKIN, G.; MULLER-DECKER, K.; FÜRSTENBERGER, G.; REUSS, G.; SYLDATK, C. Production of sophorolipids from whey. II. Product composition, surface active properties, cytotoxicity and stability against hydrolases by enzymatic treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, p. 495–501, 1999.

PALME, O.; COMANESCU, G.; STOINEVA, I.; RADEL, S.; BENES, E.; DEVELTER, D.; WRAY, V.; LANG, S. Sophorolipids from *Candida bombicola*: Cell separation by ultrasonic particle manipulation. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, n. 6, p. 663–673, 2010.

PEKIN, G.; VARDAR-SUKAN, F.; KOSARIC, N. Production of sophorolipids from *Candida bombicola* ATCC 22214 Using Turkish Corn Oil and Honey. **Engineering in Life Sciences**, v. 5, n. 4, p. 357–362, 2005.

PRICE, N. P. J.; RAY, K.J.; VERMILLION, K.E.; DUNLAP, C.A.; KURTZMAN, C.P. Structural characterization of novel sophorolipid biosurfactants from a newly identified species of *Candida* yeast. **Carbohydrate Research**, v. 348, p. 33–41, 2012.

PULATE, V.D.; BHAGWAT, S.; PRABHUNE, A. A. Microbial oxidation of medium chain fatty alcohol in the synthesis of ophorolipids by *Candida bombicola* and its physicochemical characterization. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 16, n. 2, p. 173–181, 2012.

RATSEP, P.; SHAH, V. Identification and quantification of sophorolipid analogs using ultra-fast liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Microbiological Methods**, v. 78, n. 3, p. 354–356, 2009.

RAU, U.; HAMMEM, S.; HECKMANN, R.; WRAY, V.; LANG, S. Sophorolipids: a source for novel compounds. **Industrial Crops and Products**, v. 13, n. 2, p. 85–92, 2001.

RIBEIRO, I. A.; BRONZ, M.R.; CASTRO, M.F.; RIBEIRO, M.H.L. Sophorolipids: improvement of the selective production by *Starmerella bombicola* through the design of nutritional requirements. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 5, p. 1875–1887, 2013.

RISPOLI, F. J.; BADIA, D.; SHAH, V. Optimization of the fermentation media for sophorolipid production from *Candida bombicola* ATCC 22214 using a simplex centroid design. **Biotechnology Progress**, v. 26, n. 4, p. 938–44, 2010.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 3, p. 249–252, 2002.

RON, E. Z. E. Z.; ROSENBERG, E. Minireview Natural roles of biosurfactants. **Environmental Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 229–236, 2001.

ROSA, C. A.; LACHANCE, M. The yeast genus *Starmerella* gen. nov. and *Starmerella bombicola* sp. nov., the teleomorph of *Candida bombicola* (Spencer, Gorin & Tullock) Meyer & Yarrow. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 1413–1417, 1998

ROSA, C.; LACHANCE, M.; SILVA, J.O.C.; TEIXEIRA, A.C.P.; MARINI, M.; ANTONINI, Y.; MARTINS, R.P. Yeast communities associated with stingless bees. **FEMS Yeast Research**, v. 4, n. 3, p. 271–275, 2003.

ROSENBERG, E.; RON, E. Z. Biosurfactants. In: ROSENBERG, E. et al. (Eds.). **The Prokaryotes – Applied Bacteriology and Biotechnology**. 4. ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 570. 2013.

SCHIPPERS, C. GEßNER, K.; MÜLLER, T.; SCHEPER, T. Microbial degradation of phenanthrene by addition of a sophorolipid mixture. **Journal of Biotechnology**, v. 83, n. 3, p. 189–198, 2000.

SHAH, V.; DOCEL, F.G.; SEYOUM, T.; EATON, K.M.; ZALENSKAYAI, I.; HAGVER, R.; AZIM, A.; GROSS, R. Sophorolipids, Microbial Glycolipids with Anti-Human Immunodeficiency Virus and Sperm-Immobilizing Activities. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 10, p. 4093–4100, 2005.

SHAH, V.; JURJEVIC, M.; BADIA, D. Utilization of restaurant waste oil as a precursor for sophorolipid production. **Biotechnology progress**, v. 23, n. 2, p. 512–515, 2007.

SHAH, S.; PRABHUNE, A. A. Purification by silica gel chromatography using dialysis tubing and characterization of sophorolipids produced from *Candida bombicola* grown on glucose and arachidonic acid. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 2, p. 267–272, 2007.

SHAO, L.-J.; SONG, X.; LI, H.; QU, Y. Bioactivities of sophorolipid with different structures against human esophageal cancer cells. **The Journal of surgical research**, v. 173, n. 2, p. 286–91, abr. 2012.

SHEPPARD, J. D.; MULLIGAN, C. N.; Applied Microbiology Biotechnology The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 27, p. 110 – 116. 1987.

SINGH, A.; VAN HAMME, J. D.; WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 1, p. 99–121, 2007.

SLEIMAN, J. N.; KOHLHOFF, S. A.; ROBLIN, P. M.; WALLNER, S.; GROSS, R.; HAMMERSCHLAG, M. R.; ZENILMAN, M. E.; BLUTH, M. H. Sophorolipids as antibacterial agents. **Annals of Clinical and Laboratory Science**. v. 36, n. 1, p. 60 – 63, 2009.

SMYTH, T. J. P.; PERFUMO, A.; MARCHANT, R.; BANAT, I.M. **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 3706–3721, 2010

SOBERÓN-CHÁVEZ, G. **Biosurfactants: from genes to applications**. Münster, Germany: Springer, p. 220, 2010.

SOLAIMAN, D. Applications of microbial biosurfactants. **Inform Biotechnology**, v. 16, n. July, p. 408–410, 2005.

SOLAIMAN, D. K. Y.; ASHBY, R.D.; NUÑEZ, A.; FOGLIA, T.A. Production of sophorolipids by *Candida bombicola* grown on soy molasses as substrate. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 15, p. 1241–1245, 2004.

SOLAIMAN, D. K. Y.; ASHBY, R.D.; ZERKOWKI, J. A.; FOGLIA, T. A. Simplified soy molasses-based medium for reduced-cost production of sophorolipids by *Candida bombicola*. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 9, p. 1341–1347, 2007.

SOLAIMAN, D. K. Y.; LIU, Y.; MOREAU, R.A.; ZERKOWKI, J. A.; Cloning, characterization, and heterologous expression of a novel glucosyltransferase gene from sophorolipid-producing *Candida bombicola*. **Gene**, v. 540, n.1, p. 46-53, 2014

SPENCER, J. F.; GORIN, P. A. J.; TULLOCH, A. P. *Torulopsis bombicola* sp.n. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 36, n. 1, p. 129–133, 1970

STÜWER, O.; HOMMEL, R.; HAFERBURG, D.; KLEBER, H.-P. Production of crystalline surface-active glycolipids by a strain of *Torulopsis apicola*. **Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 259–269, 1987.

SUN, X.-X.; CHOI, J.-K.; KIM, E.-K. A preliminary study on the mechanism of harmful algal bloom mitigation by use of sophorolipid treatment. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 304, n. 1, p. 35–49, 2004.

THANIYAVARN, J.; CHIANGUTHAT, T.; SANGVANICH, P.; ROONGSAWANG, N.; WASHIO, K.; MORIKAWA, M.; THANIYAVARN, S. Production of Sophorolipid Biosurfactant by *Pichia anomala*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 72, n. 8, p. 2061–2068, 2008.

TULLOCH, A. P.; SPENCER, J. F. T.; DEINEMA, M. H. A new hydroxy fatty acid sophoroside from *Candida bogoriensis*. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 46, n. 3, p. 345–348, 1968.

TULLOCH, A. P.; SPENCER, J. F. T.; GORIN, P. A. J. Fermentation of long chain compounds by *Torulopsis magnoliae* III. Preparation of dicarboxylic acids from hydroxy fatty acid sophorosides. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 40, n. 7, p. 1326–1338, 1962.

VAN BOGAERT, I. N. A.; DEVELTER, D.; SOETAERT, W.; VANDAMME, E.J. Importance of the cytochrome P450 monooxygenase CYP52 family for the sophorolipid-producing yeast *Candida bombicola*. **FEMS Yeast Research**, v. 9, n. 1, p. 87–94, 2009.

VAN BOGAERT, I. N.; HOVOET, K.; ROELANTS, S.L.K.W.; LI, B.; LIN, Y.C. VAN de PEER, YVES. A. et al. The biosynthetic gene cluster for sophorolipids: a biotechnological interesting biosurfactant produced by *Starmerella bombicola*. **Molecular Microbiology**, v. 88, n. 3, p. 501–509, 2013.

VAN BOGAERT, I. N. A.; SAERENS, K.; DE MUYNCK, C.; DEVELTER, D.; SOETAERT, W.; VANDAMME, E.J. Microbial production and application of sophorolipids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 1, p. 23–34, 2007.

VAN BOGAERT, I. N. A.; ZHANG, J.; SOETAERT, W. Microbial synthesis of sophorolipids. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 4, p. 821–833, 2011.

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Physiological aspects. Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnology advances**, v. 24, n. 6, p. 604–620, 2006.

VEDARAMAN, N.; VENKATESH, N. The effect of medium composition on the production of sophorolipids and the tensiometric properties by *Starmerella bombicola* MTCC 1910. **Polish Journal of Chemical Technology**, v. 12, n. 2, p. 9–13, 2010.

YUAN, B.; YANG, S.; CHEN, J. Antimicrobial activity of sophorolipids on pathogenic fungi isolated from fruits. **Chinese Journal of Applied Environmental Biology**, v. 17, n. 3, p. 330–333, 1 fev. 2012.

ZARAGOZA, A.; ARANDA, F. J.; ESPUNY, M. J.; TERUEL, J.A.; MARQUÉS, A.; MANRESA, A.; ORTIZ, A. Mechanism of membrane permeabilization by a bacterial trehalose lipid biosurfactant produced by *Rhodococcus* sp. **Langmuir**, v. 25, n. 14, p. 7892–8, 21 jul. 2009.

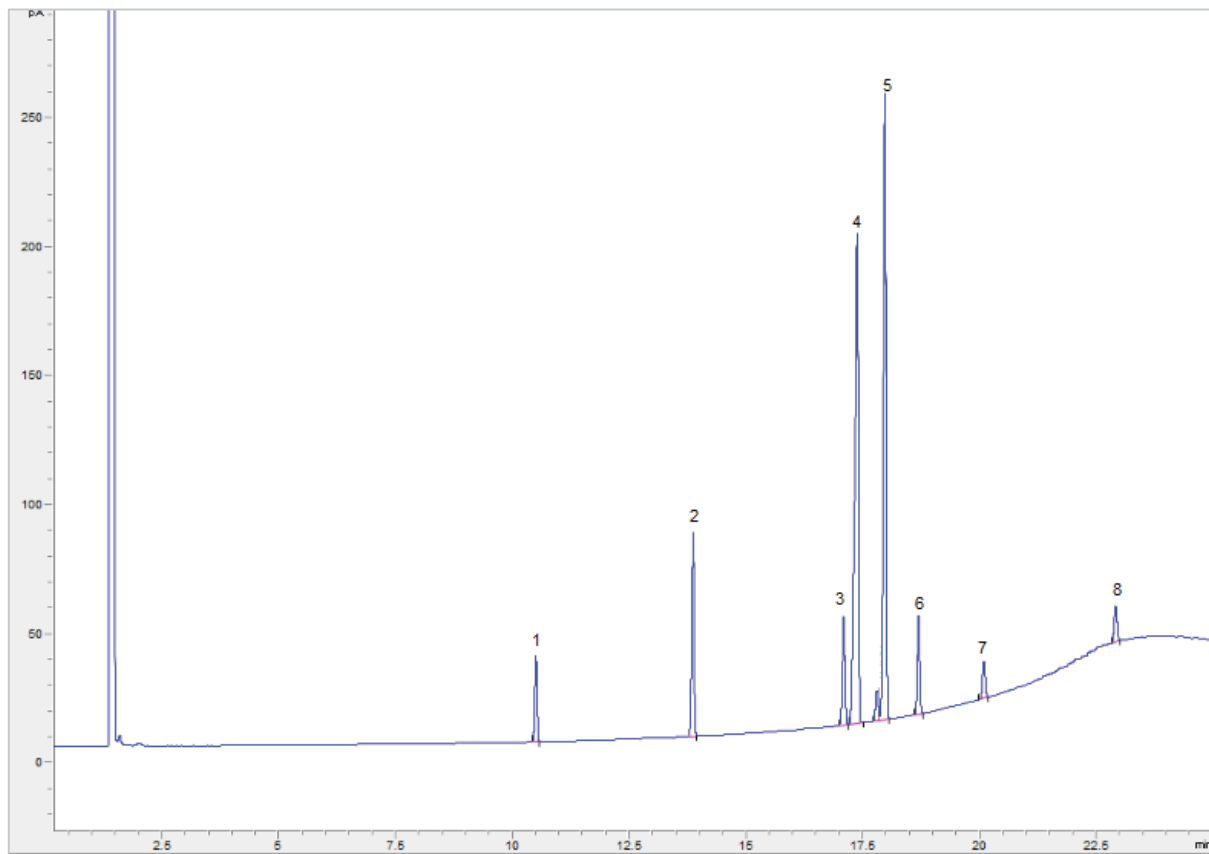
ZHOU, Q. H.; KLEKNER, V.; KOSARIC, N. Production of sophorose lipids by *Torulopsis bombicola* from safflower oil and glucose. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 69, n. 1, p. 89–91, 1992.

ZHOU, Q. H.; KOSARIC, N. Effect of Lactose and Olive Oil on Intra and Extracellular Lipids of *Torulopsis bombicola*. **Biotechnology Letters**, v. 15, n. 5, p. 477–482, 1993.

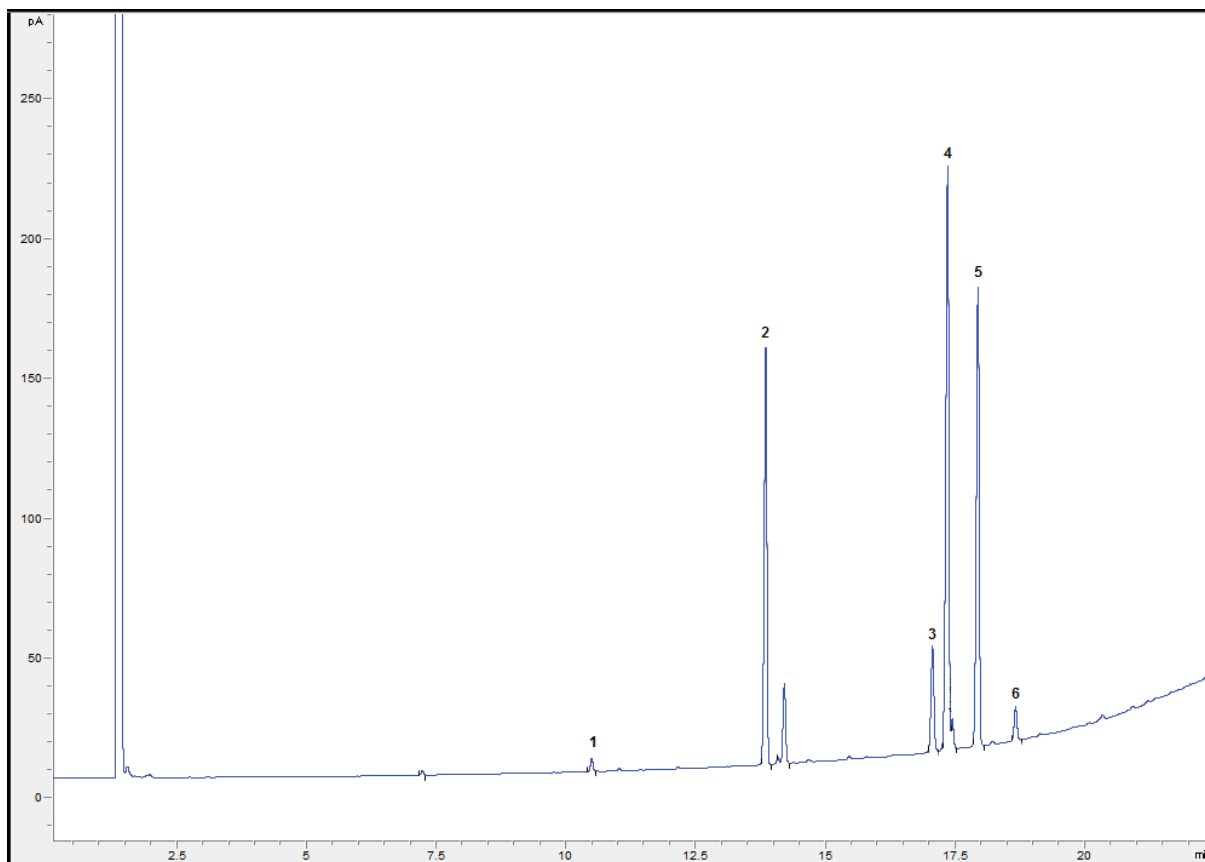
ZHOU, Q. H.; KOSARIC, N. Utilization of canola oil and lactose to produce biosurfactant with *Candida bombicola*. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 72, n. 1, p. 67–71, 1995.

# ANEXOS

**ANEXO A** – Perfil cromatográfico do padrão FAMEmix Supleco®. 1 - ácido mistérico (C14:0), 2 - ácido palmítico (C16:0), 3 - ácido esteárico (C18:0), 4 - ácido oleico (C18:1), 5 - ácido linoleico (C18:2), 6 - ácido linolênico (C18:3), 7 - ácido araquidônico (C20:0) E 8 – ácido beenico (C22:0).



**ANEXO B** – Perfil cromatográfico da gordura de frango. 1 - ácido mirístico (C14:0), 2 - ácido palmítico (C16:0), 3 - ácido esteárico (C18:0), 4 - ácido oleico (C18:1), 5 - ácido linoleico (C18:2) e 6 - ácido linolênico (C18:3).



## ANEXO C

### Normas para a submissão do artigo para o periódico *Applied Microbiology and Biotechnology*



### **Applied Microbiology and Biotechnology**

Editor-in-Chief: Alexander Steinbüchel

ISSN: 0175-7598 (print version)

ISSN: 1432-0614 (electronic version)

Impact factor: 3.68

*Applied Microbiology and Biotechnology* addresses a range of topics, presenting full-length papers and mini-reviews of new and emerging products, processes and technologies. Coverage includes prokaryotic or eukaryotic cells, relevant enzymes and proteins; applied genetics and molecular biotechnology; genomics and proteomics; applied microbial and cell physiology; environmental biotechnology; process and products and more.

### **Instructions for Authors**

#### *Manuscript Submission*

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

#### *Permissions*

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright

owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

### *Online Submission*

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

### **Title Page**

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of corresponding author

### **Abstract**

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

### **Keywords**

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

### **Text Formatting**

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- [LaTeX macro package \(zip, 182 kB\)](#)

### **Headings**

Please use no more than three levels of displayed headings.

## Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

## Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

## Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

**Preferred length of Original Papers is 6-8 printed pages. The indicated length includes figures, tables and references: one printed page corresponds to approximately 6,500 characters (9,000 characters in the sections "Materials and methods" and "References").**

Please arrange your manuscript for Original Papers as follows:

- *Abstract*

Each paper must be preceded by an abstract presenting the most important results and conclusions in no more than 250 words.

- *Footnotes*

Essential footnotes to the text should be numbered consecutively and placed at the bottom of the page to which they refer.

Footnotes on the title page are not given reference symbols. Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

- *Introduction*

The Introduction should state the purpose of the investigation and give a short review of the pertinent literature (max. one printed page).

- *Materials and methods*

The Materials and methods section should follow the Introduction and should provide enough information to permit repetition of the experimental work.

The microorganisms used in the study and in particular new isolates must be deposited in a publicly accessible culture collection belonging to the WDCM (e.g. DSM, ATCC, NCIMB; see the below Link for a complete list of the WDCM culture collections which are all suitable). The authors must refer to the collection and

the strain number in the text to ensure that the strains are available to other scientists. If nucleic acid or amino acid sequences are presented (this includes also optimized sequences of known genes), a GenBank/EMBL accession number for primary nucleotide and/or amino acid sequence data must be included in a separate paragraph at the end of the Materials and methods section. Huge sequencing datasets or raw data must also be deposited, e.g. as a NCBI BioProject (via the Link below).

For studies in proteomics, the minimum information about a proteomics experiment (MIAPE) of the HUPO proteomics standard initiative (see the Link below) and publication guidelines for the analysis and documentation of peptide and protein identifications by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology (at the below Link) must be followed up. One biological replicate will not be acceptable.

For X-ray crystallographic analyses of proteins (enzymes), the authors should obtain each PDB ID to one structure of protein from PDB (The Worldwide Protein Data Bank (wwPDB)) and add it to the manuscript just like as nucleotide accession numbers.

For commercial sources of used materials, the name of the company, town and country should be indicated.

- *Results*

The Results section should describe the outcome of the study. Data should be presented as concisely as possible, if appropriate in the form of tables or figures, although very large tables should be avoided.

- *Discussion*

The Discussion should be an interpretation of the results and their significance with reference to publications of other laboratories.

## Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al.1995; Kelso and Smith 1998; Medvec 1993).

## *Reference list*

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

*Journal article*

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

*Article by DOI*

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med.* doi:10.1007/s001090000086

*Book*

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics.* Blackwell, London

*Book chapter*

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

*Online document*

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

*Dissertation*

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure.* Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

- [ISSN Website](#)

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

- [EndNote Style](#)

Please note:

- All author names should be provided in the references of AMB-manuscripts!
- Please do not use an EndNote Style abbreviating long author lists with "et al."!
- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

#### *Electronic Figure Submission*

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

#### *Line Art*

- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

#### *Halftone Art*

- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.
- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

#### *Color Art*

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

### *Figure Lettering*

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

### *Figure Numbering*

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

### *Figure Captions*

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

### *Figure Placement and Size*

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

### *Permissions*

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and

that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

### *Accessibility*

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1