

KONDENSAT PODEZODORYZACYJNY JAKO SUBSTRAT TŁUSZCZOWY W BIOSYNTEZIE ZWIĄZKÓW POWIERZCHNIOWO CZYNNYCH Z WYKORZYSTANIEM DROŻDŻY *CANDIDA BOMBICOLA*

Małgorzata Gumienna, Maria Czarnecka, Zbigniew Czarnecki

Streszczenie: Badano możliwości wykorzystania drożdży *Candida bombicola* ATCC 22214 do biosyntezy związków powierzchniowo czynnych na podłożu zawierającym kondensat podezodoryzacyjny jako źródło węgla hydrofobowego, glukozę jako źródło węgla hydrofilowego oraz ekstrakt drożdżowy jako źródło azotu. Najlepszą wydajność biosurfaktantów ($118 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$) uzyskano stosując podłoże, w którym na 1g kondensatu przypadają 3 g glukozy oraz 0,05 g ekstraktu drożdżowego. Otrzymane biosurfaktanty okazały się mieszaniną związków chemicznych należących do glikolipidów. Za pomocą HPLC-MS ustalono, że były to soforolipidy, a największy udział w tej mieszaninie miały frakcje laktonowe SL-1 i SL-7.

Słowa kluczowe: aktywność powierzchniowa, biosurfaktanty, soforolipidy, substrat tłuszczowy

WSTĘP

Na świecie znane są związki powierzchniowo czynne syntetyzowane metodami chemicznymi i od dawna wykorzystywane w wielu gałęziach przemysłu, m.in. w przemyśle spożywczym, kosmetycznym, farmaceutycznym, naftowym, papierniczym, tekstylnym a także w rolnictwie. Jednak w dążeniach do zmniejszenia udziału syntetycznych surfaktantów w wielu gałęziach naszego przemysłu a także na potrzeby ochrony środowiska, zwraca się uwagę na możliwości ich zastąpienia odpowiednikami otrzymywanymi w procesie biosyntezy mikrobiologicznej. Głównymi producentami biosurfaktantów są bakterie i drożdże [Bednarski i Adamczak 1999, Desai i Banat 1997, Kosaric 1993].

Biosurfaktanty pochodzenia mikrobiologicznego są biodegradowalne, działają w szerokim zakresie pH, temperatury oraz zasolenia środowiska. Związki te należą głównie do glikolipidów, lipoprotein, fosfolipidów, kwasów tłuszczowych, neutralnych lipidów oraz związków polimerowych. Mikrobiologiczne biosurfaktanty mogą być wydzie-

lane na zewnątrz komórek lub pozostawać z nimi związane. Synteza tych związków jest możliwa głównie podczas wzrostu mikroorganizmów na podłożu z różnymi nie mieszającymi się wzajemnie substratami węglowymi, np. cukrami, tłuszczami roślinnymi, tłuszczami zwierzęcymi i ich estrami, kwasami tłuszczowymi a także alkoholami [Casas i in. 1997, Rau i in. 1996, Adamczak i Bednarski 2000 a, b, Gumienna i in. 2002]. Poprzez obniżane napięcia powierzchniowego i międzyfazowego biosurfaktanty ułatwiają wykorzystanie tych substratów poprzez wytworzenie emulsji. Swą aktywność powierzchniową oraz związane z nią specyficzne właściwości zawdzięczają charakterystycznej budowie cząsteczki. Obecne w niej zarówno grupy hydrofilowe, jak i hydrofobowe odpowiadają między innymi za zdolności emulsyfikacyjne i deemulsyfikacyjne. Również zwilżanie, pienienie i zapobieganie korozji to właściwości, dzięki którym biosurfaktanty znajdują szerokie zastosowanie [Kosaric 1993].

Drożdże *Candida bombicola* ATCC 22214, według Asmera i in. [1988] oraz Hu i Ju [2001 a], syntetyzują z substratów węglowych mieszaninę soforolipidów. Soforolipidy składają się z soforozy połączonej wiązaniem β -glikozydowym z hydroksykwasem o ilości atomów od C16 do C18 w cząsteczce. Głównymi frakcjami występującymi w powstałej mieszaninie soforolipidów są zarówno formy tworzące pierścień laktonowy, jak i formy kwaśne z wolną grupą karboksylową.

Na strukturę chemiczną powstających związków ma wpływ źródło węgla oraz warunki prowadzenia hodowli. Do ważnych czynników decydujących o wydajności syntezy glikolipidów należy zaliczyć także proporcję zawartości źródła węgla do zawartości źródła azotu [Otto i in. 1999, Bednarski i Adamczak 1999].

Celem badań opisanych w niniejszej pracy była ocena możliwości biosyntezy związków powierzchniowo czynnych przez drożdże *Candida Bombicola* ATCC 22214 na podłożu zawierającym kondensat podezodoryzacyjny – produkt odpadowy przemyślu tłuszczowego.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Material biologiczny

Do syntezy biosurfaktantów wykorzystano drożdże *Candida bombicola* ATCC 22214, otrzymane z American Type Culture Collection w 2001 roku.

Podłoża hodowlane

W badaniach stosowano siedem podłoży (A, B, C, D, E, F i G) zawierających kondensat podezodoryzacyjny (ogólna zawartość substancji tłuszczowych 99,7% w/w) jako hydrofobowe źródło węgla, glukozę jako hydrofilowe źródło węgla oraz ekstrakt drożdżowy jako źródło azotu. Początkowe ilości tych składników w każdym podłożu charakteryzują dane zamieszczone w tabeli 1.

Wyjściową wartość pH podłoży ustalono na poziomie 5,8, dodając 0,1 M roztwór HCL. Podłoża wyjaławiano przez 20 min w temperaturze 121°C.

Tabela 1. Skład podłoża hodowlanych
Table 1. Culture medium composition

Składniki podłoża Medium components	Skład podłoża, g·dm ⁻³ Culture concentration, g·dm ⁻³						
	A	B	C	D	E*	F*	G*
Glukoza Glucose	100	100	200	200	100	100	100
Kondensat podezodoryzacyjny Postdeodorization distillate	100	100	100	100	100	100	100
Ekstrakt drożdżowy Yeast extract	5	5	5	10	5	5	2,5
Regulacja wartości pH The pH adjustment	nie	tak	tak	tak	nie	tak	tak

*W czasie hodowli zwiększano dodatek glukozy do podłoża o 25 g·dm⁻³/dobę począwszy od 3 doby.
pH – w hodowli B, C, D, F i G utrzymywano na poziomie 3,5, dodając 5 M NaOH.

*Glucose was added to the medium at 25 g·dm⁻³/days during all total incubate to start for 3 days.
pH – was adjusted to 3.5 with 5 M NaOH during cultivation B, C, D, F and G.

Przebieg hodowli

Czas eksperymentów nie przekraczał 14 dób, a temperatura utrzymywana była na poziomie 30°C. Doświadczenie prowadzono w kolbach wstrząsanych o pojemności 300 cm³, w których początkowo było po 100 cm³ podłoża. Podłoże szczepiono inokulum o objętości 10 cm³ zawierającym w 1 cm³ od 1,9 x 10⁸ do 1,1 x 10⁹ komórek drożdży *Candida bombicola*. W hodowlach E, F i G, począwszy od trzeciej doby (wcześniej wprowadzona glukoza została przez drożdże przyswojona), wprowadzano jednorazowo w każdej następnej dobie hodowli dodatkowo po 2,5 g glukozy. W trakcie eksperymentów B, C, D, F i G pH utrzymywano na stałym poziomie równym 3,5, za pomocą 5M NaOH. Warunki prowadzenia hodowli okresowej dobrano na podstawie badań własnych [Gumienna i in. 2002].

Metody analityczne

W czasie hodowli co dwie doby badano przyrost biomasy [Zhou i Kosaric 1995], zawartość cukrów redukujących [Miller 1959], wartość pH oraz poziom biosurfaktantów [Gumienna i in. 2001].

Wstępnie oczyszczone biosurfaktanty [Gumienna i in. 2001] z hodowli F analizowano za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej kolumnowej, sprzężonej ze spektrometrem masowym (HPLC-MS). Biosurfaktanty rozdzielano używając HPLC firmy Waters (Model 2690) z kolumną Nova Pak C₁₈ RP (150 x 3,9 mm id., Waters). Objętość próby nastrzykiwanej wynosiła 10 µl, a szybkość jej przepływu 0,5 cm³·min⁻¹. Czas pomiaru wynosił 40 min. Stosowano cztery rozpuszczalniki: metanol, acetonitryl, wodę i kwas mrówkowy o stałym stężeniu 5%. Gradient stężeń zastosowanych w analizie rozpuszczalników podano w tabeli 2.

Tabela 2. Zmiany stężeń rozpuszczalników w czasie analizy HPLC-MS
 Table 2. The changes of the solutions concentration in the time of HPLC-MS analysis

Czas, min Time, min	Metanol, % Methanol, %	Acetonitryl, % Acetonitrile, %	Woda, % Water, %	Kwas mrówkowy, % Formic Acid, %
0,00	0,0	0,0	95,0	5,0
10,00	25,0	25,0	45,0	5,0
20,00	47,5	47,5	0,0	5,0
30,00	50,0	50,0	0,0	0,0
40,00	50,0	50,0	0,0	0,0

Identyfikację jakościową biosurfaktanów wykonano na spektrometrze masowym (Waters 996 PDA) sprzężonym z HPLC. Jako metodę jonizacji zastosowano elektro-rozpylenie („electrospray” – ESI). Warunki przebiegu analizy dobrano na podstawie badań Byłki i in. [2002].

Pomiary napięcia powierzchniowego wykonano tensjometrem Sigma 70 produkcji firmy KSV Ltd. (Finlandia), stosując platynowy okrąg jako układ pomiarowy [Brakemeier i in. 1998]. Wodne roztwory biosurfaktantów z hodowli F przygotowano w pięciu stężeniach, od 0,0005% do 0,1%. Nie przygotowano wyższych stężeń roztworów ze względu na ich słabą rozpuszczalność w wodzie.

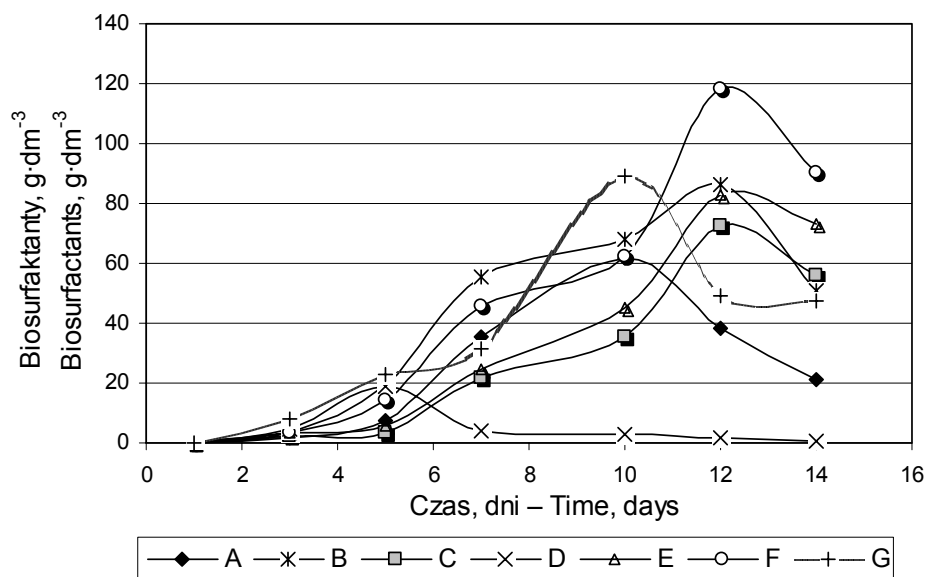
WYNIKI I DISKUSJA

Proces biosyntezy związków powierzchniowo czynnych

Dzięki zastosowanym w pracy podłożom oraz dobranym warunkom hodowli uzyskano $118 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ biosurfaktantów. Wynik ten wskazuje, iż kondensat, który stanowił 10% (w/v) podłoża, był dobrze wykorzystany przez drożdże do biosyntezy związków powierzchniowo czynnych, jednak pod warunkiem dodatku jeszcze jednego hydrofilowego substratu węglowego. Tym substratem była glukoza. Stosowano ją w dwóch stężeniach, 10 i 20% (w/v), w celu wykazania jej wpływu na proces biosyntezy.

W pierwszych dwóch eksperymentach (A i B) dodatek glukozy wynosił 10% (w/v) a ekstraktu drożdżowego 0,5% (w/v), przy czym w hodowli B utrzymywano pH podłoża na poziomie 3,5 (tab. 1). Ilość związków powierzchniowo czynnych wytworzonych w tych hodowlach wynosiła odpowiednio: $61 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ po 10 dobie i $86 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ po 12 dobie (rys. 1).

W kolejnej hodowli (hodowla C) podwojono stężenie glukozy, a pH utrzymywano na poziomie 3,5. Okazało się, że zwiększenie dodatku glukozy nie przyczyniło się do uzyskania większej wydajności związków powierzchniowo czynnych. Po 12 dobie otrzymano w tej hodowli $72 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ biosurfaktantów. Wykazano natomiast konieczność utrzymywania stałej wartości pH podłoży hodowlanych. Wprowadzono regulację wartości pH na poziomie 3,5, sugerując się pracami Davili i in. [1992], Rau i in. [1996], McCaffrey'a i Coopera [1995], którzy donoszą, iż optymalna wartość pH do biosyntezy związków powierzchniowo czynnych mieści się w przedziale od 2,5 do 3,5. Ponadto, wstępne badania przeprowadzone na podłożach z dodatkiem kwasu oleinowego jako drugiego substratu węglowego wskazują także na konieczność regulacji wartości pH na poziomie 3,5 [Gumienna i in. 2002].

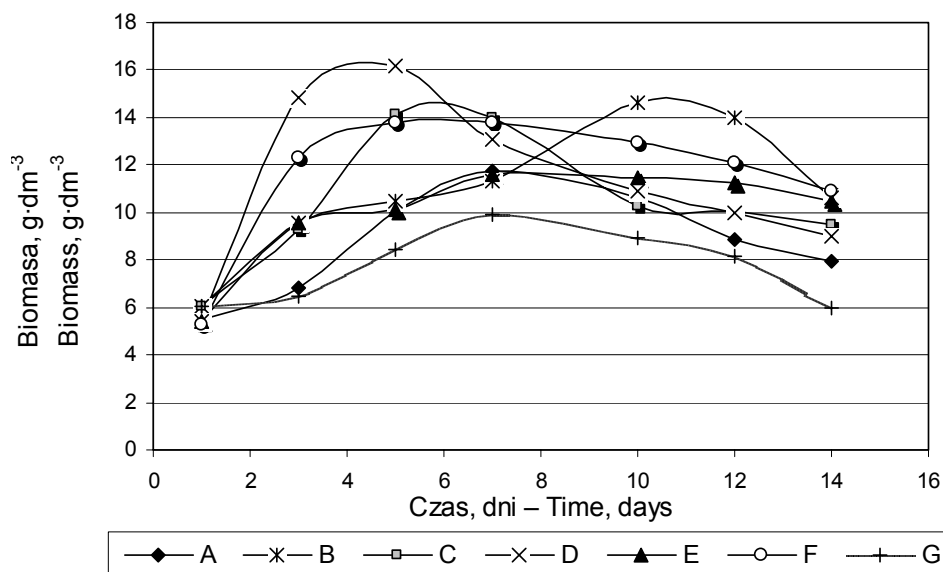


Rys. 1. Wpływ składu podłoża na syntezę związków powierzchniowo czynnych w czasie hodowli. Znaczenie symboli A, B, C, D, E, F, G objaśniono w tabeli 1

Fig. 1. Influence of medium composition on the surface active yield compounds during cultivation. A, B, C, D, E, F, G as shown in Table 1

Poszukując warunków zapewniających wzrost wydajności biosyntezy biosurfaktantów przeprowadzono następną hodowlę (hodowla D), w której zwiększono ilość ekstraktu drożdżowego z 0,5 do 1% (w/v), natomiast stężenie glukozy pozostawiono na tym samym poziomie jak w hodowli C. W wypadku tej hodowli maksymalną wydajność biosurfaktantów (19,2 g·dm⁻³) odnotowano po 5 dobie. Zwiększenie więc ilości ekstraktu drożdżowego do 1% wpłynęło niekorzystnie na syntezę, powodując stopniowe obniżenie się zawartości związków powierzchniowo czynnych w podłożu po 5 dobie. Większa zawartość w podłożu ekstraktu (1%) miała wpływ jedynie na przyrost biomasy (16,2 g·dm⁻³ po 5 dobie hodowli) (rys. 1 i 2).

W realizacji kolejnych prób wykorzystano wyniki badań Kleknera i in. [1991], którzy stwierdzili, iż najkorzystniejsze warunki dla biosyntezy biosurfaktantów uzyskuje się wtedy, kiedy w podłożu stosunek wagowy substratu hydrofilowego do hydrofobowego wynosi 3:1. Biorąc to pod uwagę, przeprowadzono hodowle E, F i G, w których ilość substratu hydrofobowego (kondensat podezodoryzacyjny) była stała i wynosiła 100 g·dm⁻³, a początkową ilość glukozy (substrat hydrofilowy), wynoszącą 100 g·dm⁻³, powiększano o 25 g·dm⁻³/dobę w każdej następnej dobie, od 3 doby począwszy (wcześniej wprowadzona glukoza została przez drożdże przyswojona). W ten sposób stosunek wagowy glukozy do kondensatu wynosił 3:1 (tab. 1, rys. 1 i 3). Tak dozowana glukoza pozwoliła na otrzymanie maksymalnej ilości biosurfaktantów (118 g·dm⁻³) w hodowli F po 12 dni hodowli. Wydajność ta była około 70% większa od wydajności uzyskanej w hodowlach nie modyfikowanych (A, B, C) (rys. 1). Różnica między wykonanymi



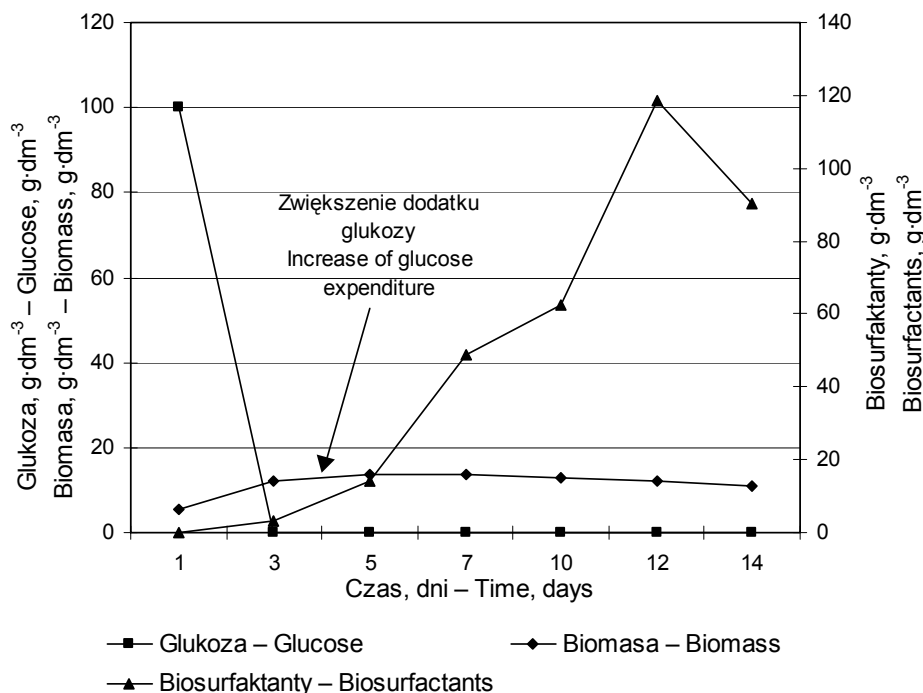
Rys. 2. Wpływ dodatku azotu i glukozy do podłoża na przyrost biomasy w czasie hodowli. Znaczenie symboli A, B, C, D, E, F, G objaśniono w tabeli 1
 Fig. 2. Effect of the nitrogen and glucose concentration on biomass yield during cultivation. A, B, C, D, E, F, G as shown in Table 1

eksperymentami E, F i G polegała na tym, że w hodowli E nie regulowano pH. Ponadto w podłożu hodowlanym G zmniejszono dodatek ekstraktu drożdżowego do 0,25% (w/v). Obniżenie zawartości ekstraktu drożdżowego do takiego poziomu nie sprzyjało wzrostowi wydajności biosyntezy biosurfaktantów. Otrzymane ilości tych związków były o około 50% mniejsze niż w hodowli F, mimo zwiększenia stężenia glukozy w obu podłożach, E i G. Ponadto, we wszystkich podłożach stwierdzono całkowite wykorzystanie glukozy przez drożdże *C. bombicola* już po 3 dobie hodowli (rys. 2). Zauważono także, iż wydajność biosurfaktantów po 10 lub 12 dobie danej hodowli znacznie spadała (rys. 1, 3). Prawdopodobnie drożdże, po wykorzystaniu przyswajalnych lipidów dostarczonych z kondensatem, używały biosurfaktanty jako źródło węgla i energii. Podobne spostrzeżenia poczynili Adamczak i Bednarski [2000 a, b], wykorzystując tłuszcz drobiowy jako substrat tłuszczowy w hodowli z *Candida antarctica*.

Podsumowując uzyskane wyniki można stwierdzić, że najkorzystniejsze warunki hodowli do biosyntezy związków powierzchniowo czynnych z użyciem drożdży *Candida bombicola* uzyskuje się wtedy, kiedy w podłożu stosunek wagowy glukozy do kondensatu wynosi 3:1. Glukoza, jako łatwo dostępne źródło energii, miała wpływ na dynamikę wytwarzania biosurfaktantów poprzez produkcję biomasy, a tym samym enzymów odpowiedzialnych za specyficzną syntezę *de novo* co sugerują w swych pracach Zhou i Kossaric [1995] oraz Garcia-Ocha i Casas [1999]. Ponadto, wśród przedstawionych wyników dotyczących doboru poziomu azotu w podłożu dla wzmożenia procesu biosyntezy biosurfaktantów najkorzystniejszy okazał się dodatek 5 g·dm⁻³ ekstraktu drożdżowego. Najmniej korzystny pod względem biosyntezy okazał się dodatek 10 g·dm⁻³

ekstraktu drożdżowego hamujący biosyntezę. Davis i in. [1999] sugerują, iż azot należy do ważnych czynników w procesie syntezy biosurfaktantów, ponieważ uaktywnienie enzymów odpowiedzialnych za biosyntezę następuje dopiero po całkowitym jego wyczerpaniu w podłożu. Dlatego też nadmiar tego pierwiastka, pochodzącego z ekstraktu drożdżowego, mógł powodować zmniejszenie produkcji związków powierzchniowo czynnych.

Zauważono, iż wzrost biosyntezy biosurfaktantów następował między 7 a 10 dniem hodowli, wtedy również obserwowano największą ilość biomasy w podłożach hodowlanych (rys. 1, 2 i 3).



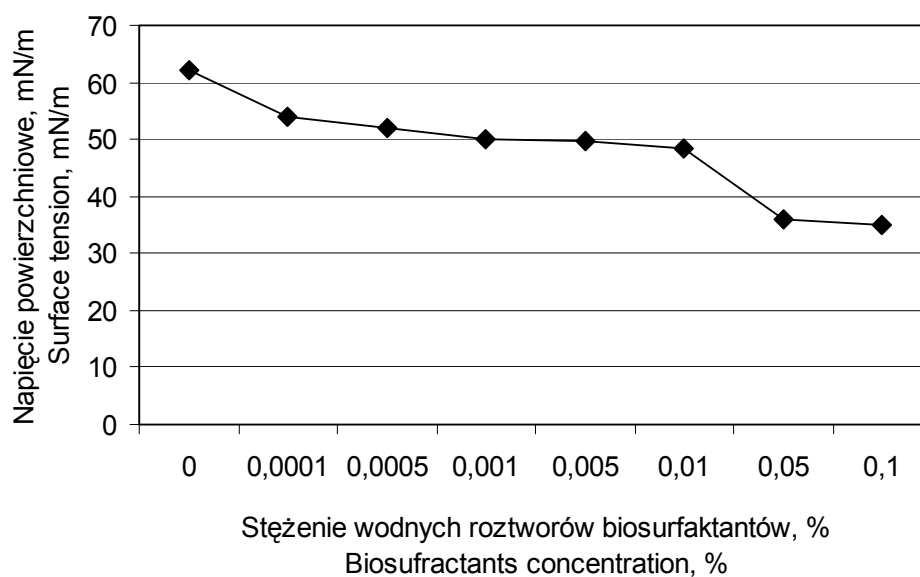
Rys. 3. Wpływ składu podłoża na ubytek glukozy, przyrost biomasy i biosurfaktantów w hodowli F
Fig. 3. Influence of medium composition on glucose cavity, biomass growth and biosurfactants yields in the cultivation F

Kondensat podezdoryzacyjny okazał się dobrym substratem hydrofobowym drożdży dla ich wzrostu i biosyntezy związków powierzchniowo czynnych, co potwierdzają także Rymowicz i in. [1998] w pracach nad wykorzystaniem surowców odpadowych w hodowli drożdży. Syntetyzowane przez *C. bombicola* biosurfaktanty są związkami zewnątrzkomórkowymi, wydzielanymi do podłoża hodowlanego.

Właściwości oraz struktura wyizolowanych związków

Otrzymane związki powierzchniowo czynne wykazywały zdolność do obniżenia napięciowego powierzchniowego wody z 62 mN/m do około 35 mN/m przy stężeniu

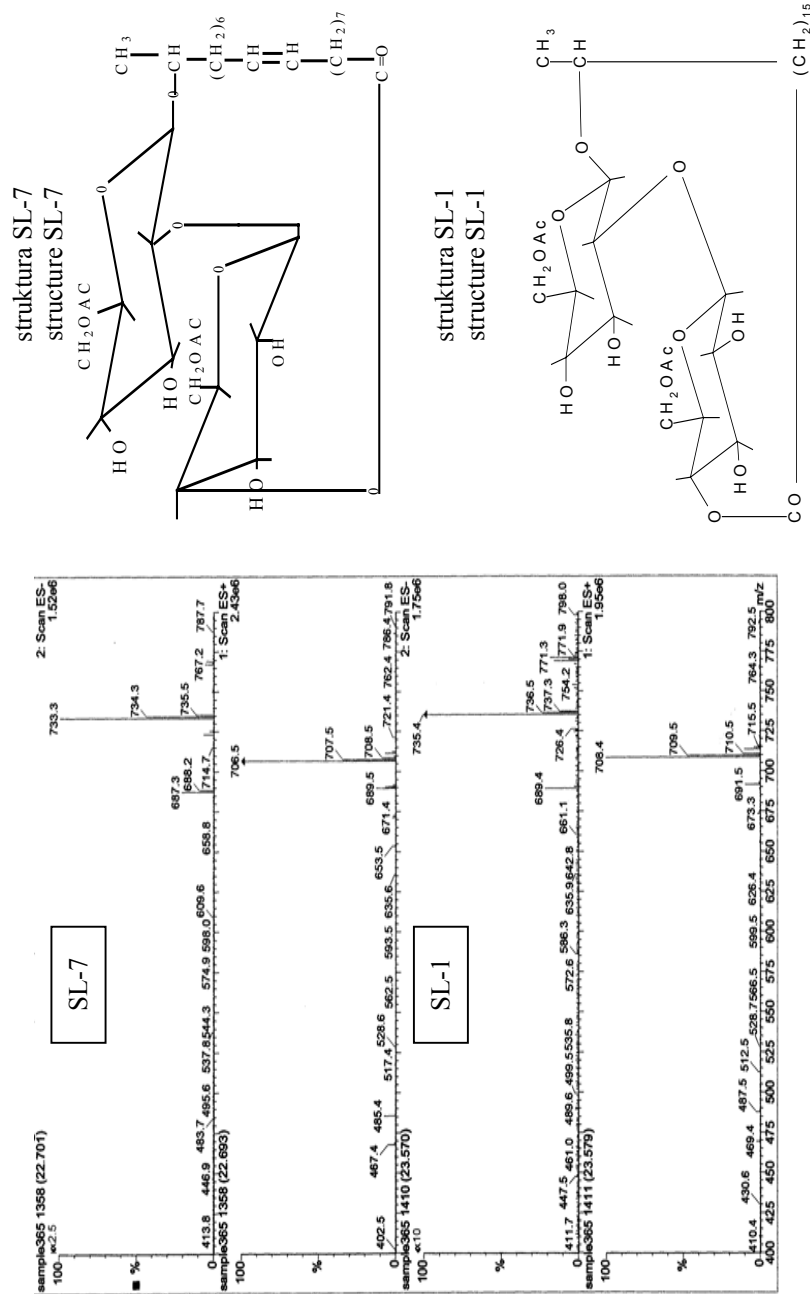
biosurfaktantów w roztworze wodnym równym 0,1% (rys. 4). Zdolność do obniżania napięcia powierzchniowego, jak podają Cooper i Paddock [1984] oraz Adamczak i Bednarski [2000 a], może wynikać z budowy biosurfaktantów, a w szczególności stosunku formy kwasowej do laktonu. Asmer i in. [1988] oraz Otto i in. [1999] a także Hu i Ju [2001 b] uważają, że związki powierzchniowo czynne wytwarzane przez *C. bombicola* należą do grupy soforolipidów, składających się z soforozy i kwasów tłuszczowych od 16 do 18 atomów węgla. Długość łańcucha kwasów tłuszczowych wchodzących w skład soforolipidu oraz wzajemny stosunek form kwaśnych i laktonowych zależy od substratu tłuszczowego użytego w podłożu hodowlanym oraz od warunków prowadzenia hodowli.



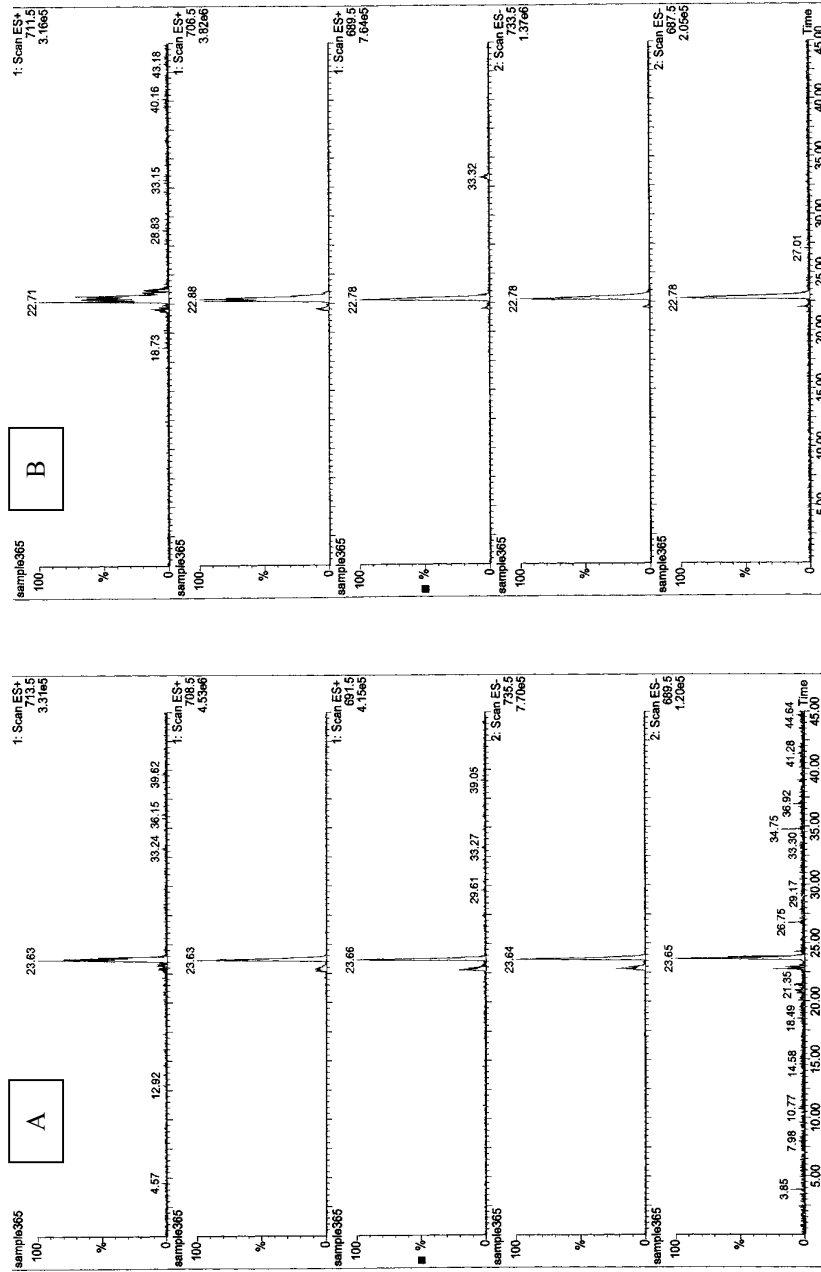
Rys. 4. Zmiany napięcia powierzchniowego wodnych roztworów biosurfaktantów wyizolowanych z hodowli F

Fig. 4. Reduction of surface tension by water solutions of biosurfactants from cultivation F

Powyższe stwierdzenia potwierdzają wstępne badania otrzymanych biosurfaktantów przeprowadzone za pomocą HPLC-MS. Analiza potwierdziła niejednorodność powstającej mieszaniny glikolipidów o największym udziale frakcji laktonowych SL-7 i SL-1 [Asmer i in. 1988, Cooper i Paddock 1984]. Jony molekularne, które pozwoliły na zidentyfikowanie frakcji SL-7 po 12 dobie hodowli F (maksymalna wydajność glikolipidów) to: $[M+H]^+$ m/z 689, $[M+NH_4]^+$ m/z 706, $[M+Na]^+$ m/z 711 oraz $[M-H]^-$ m/z 687 i $[M+HCOO]^-$ m/z 733 (rys. 5 i 6). Masa cząsteczkowa tego związku wynosi więc 688 amu (atomic mass unit). Natomiast druga identyfikowana forma, występująca obok SL-7, to także forma laktonowa SL-1. Odczytywana wielkość pików jonów molekularnych to: $[M+H]^+$ m/z 691, $[M+NH_4]^+$ m/z 708 $[M+Na]^+$ m/z 713 oraz $[M-H]^-$ m/z 689 i $[M+HCOO]^-$ m/z 735. Masa cząsteczkowa tej frakcji wynosiła więc 690 amu (rys. 5 i 6). Obie formy laktonowe obserwowano w każdej z analizowanych prób hodowli. Różnica między tymi dwoma strukturami polegała na występowaniu wiązania podwójnego w przyłączonym kwasie tłuszczowym – frakcja SL-7.



Rys. 5. Widmo masowe przedstawiające fragmentację sophorolipidów w hodowli F
 Fig. 5. Mass spectrum of crude sophorolipids in cultivation F



Rys. 6. Chromatogramy soforolipidu formy SL-1 (A) i SL-7 (B)

Fig. 6. HPLC chromatogram of the lactonic form SL-1 (A) and SL-7 (B)

WNIOSKI

1. Skład podłoża wpływał w znacznym stopniu na ilość syntetyzowanych biosurfaktantów. Najkorzystniejsze dla biosyntezy okazało się podłoże, w którym stosunek wagowy glukozy do kondensatu podezodoryzacyjnego i ekstraktu drożdżowego wynosił 3:1:0,05, przy czym 2/3 glukozy wprowadzano stopniowo, poczynając od 3 doby hodowli. Ponadto konieczne było utrzymywanie pH na poziomie 3,5.
2. Otrzymane biosurfaktanty obniżały napięcie powierzchniowe wody z 62 mN/m do 34 mN/m przy stężeniu 0,1%.
3. Uzyskane związki powierzchniowo czynne okazały się niejednorodną mieszaniną sofrolipidów, w której dominowały frakcje laktonowe, SL-1 i SL-7.

PIŚMIENNICTWO

- Asmer H.J., Lang S., Wagner F., Wray V., 1988. Microbial production, structure elucidation and biocomversion of sophorose lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 65 (9), 1460-1466.
- Adamczak M., Bednarski W., 2000 a. Wydajność biosyntezy związków powierzchniowo czynnych przez *Candida antarctica* w zależności od składu pożywki i warunków hodowli. *Biotechnologia*, 3 (50), 181-192.
- Adamczak M., Bednarski W., 2000 b. Influence of medium composition and aeration on the synthesis of biosurfactants produced by *Candida Antarctica*. *Biotechnol. Lett.*, 22, 313-316.
- Bednarski W., Adamczak M., 1999. Biotechnologiczne metody otrzymywania związków powierzchniowo aktywnych. Część II. Synteza związków powierzchniowo aktywnych przez mikroorganizmy. *Biotechnologia*, 4 (47), 24-43.
- Brakemeier A., Wullbrandt D., Lang S., 1998. *Candida bombicola*: Production of novel alkyl glycosides based glucose / 2 – dodecanol. *App. Microbiol. Biotechnol.*, 50, 161-166.
- Bylka W., Frański R., Stobiecki M., 2002. Differentiation between isomeric acacetin-6-C-(6"-O-malonyl)-glucoside and acacetin-8-C-(6"-O-malonyl)-glucoside by using low-energy CID mass spectra. *J. Mass Spectrometry.*, 37, 648-650.
- Casas J.A., Garcia de Lara S., Garcia-Ochoa F., 1997. Optimization of a synthetic medium for *Candida bombicola* growth using factorial design of experiments. *Enzyme Microb. Technol.*, 21, 221-229.
- Cooper D.G., Paddock D.A., 1984. Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *App. Environ. Microbiol.*, 47 (1), 173-176.
- Davila A.M., Marchal R., Vandecasteele J.P., 1992. Kinetics and balance of a fermentation free from product inhibition: sophorose lipid production by *Candida bombicola*. *App. Microbiol. Biotechnol.*, 38, 6-11.
- Davis D.A., Lynch H.L., Varley J., 1999. The production of surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis ATCC21332* is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. *Enzyme Microb. Technol.*, 25, 322-329.
- Desai J.D., Banat I., 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Mikrobiol. Mol. Biol. Rev.*, 61, 1, 47-64.
- Garcia-Ochoa F., Casas J.A., 1999. Unstructured kinetic model for sophorolipids production by *Candida bombicola*. *Enzyme Microb. Technol.*, 25 (7), 613-621.
- Gumienna M., Roszyk H., Czarnecka H., Czarnecki Z., 2001. Biosynteza biosurfaktantów przez szczep *Candida bombicola* z wykorzystaniem wybranego źródła węgla hydrofobowego. 32 Sesja Naukowa KTChŻ PAN, Warszawa 2001.
- Gumienna M., Lasik M., Roszyk H., Czarnecki Z., 2002. Kwas oleinowy źródłem węgla o właściwościach hydrofobowych w biosyntezie związków powierzchniowo czynnych przez szczep *Candida bombicola*. *Żyw. Nauka Technol. Jakość.*, 2 (31), 43-53.

- Hu Y., Ju L.K., 2001 a. Sophorolipid production from different lipid precursors observed with LC-MS. *Enzyme Microb. Technol.*, 29, 593-601.
- Hu Y., Ju L.K., 2001 b. Purification of lactonic sophorolipids by crystallization. *J. Biotechnol.*, 87, 263-272.
- Klekner V., Kosaric N., Zhou Q.H., 1991. Sophorose lipids produced from sucrose. *Biotechnol. Lett.*, 13 (5), 345-348.
- Kosaric N., 1993. *Biosurfactants: production, properties applications*. Marcel Dekker Inc., New York.
- McCaffrey W.C., Cooper D.G., 1995. Sophorolipids production by *Candida bombicola* using self – cycling fermentation. *J. Ferment. Bioengineering*, 79 (2), 146-151.
- Miller G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31 (3), 426-428.
- Otto R.T., Daniel H.J., Pekin G., 1999. Production of sophorolipids from whey II . Product composition, surface active properties, cytotoxicity and stability against hydrolases by enzymatic treatment. *App. Mikrobiol. Biotechnol.*, 52 (4), 495-501.
- Rau U., Manzke C., Wagner F., 1996. Influence of substrate supply on the production of sophorose lipids by *Candida bombicola* ATCC 22214. *Biotechnol. Lett.*, 18 (2), 149-154.
- Rymowicz W., Musiał J., Rodziwicz A., Robak M., 1998. Charakterystyka pól ciągłej produkcji drożdży na odpadowych surowcach tłuszczowych. 29 Sesja Naukowa KTCHŻ PAN, Olsztyn, 107-108.
- Zhou Q., Kosaric N., 1995. Utylization of canola oil and lactose to produce biosurfactant with *Candida bombicola*. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 72 (1), 67-71.

BIOSYNTHESIS OF SURFACE ACTIVE COMPOUNDS BY YEAST *CANDIDA BOMBICOLA* USING POSTDEODORIZATION CONDENSATE AS FATTY SOURCE

Abstract: The influence of medium composition on production of biosurfactants was studied in order to find the optimal cultivation conditions. In our experiments, biosurfactants yield increased with increasing glucose concentration. However, both carbon sources (glucose and postdeodorization distillate) were needed in high concentration in order to obtain a high production of biosurfactants.

Candida bombicola ATCC 22214 produced to 118 g/l biosurfactants using glucose and postdeodorization condensate (rapeseed origin) in culture. A high concentration of biosurfactants was obtained when the medium consisted of 1 g postdeodorization distillate, 3 g glucose and 0.05 g yeast extract (Fig. 1 and 3).

Composition of biosurfactants was characterized by HPLC-MS. *Candida bombicola* produced complex mixtures in the fermentation. The quantification of sophorolipids components was conducted with the HPLC-MS analyses and showed that mixtures of biosurfactants contain predominantly two diacetylated lactones SL-7 and SL-1 (Fig. 5 and 6 A, B).

Key words: surface active, biosurfactants, sophorolipids, fatty source

M. Gumienna, Zakład Fermentacji i Biosyntezy, Akademia Rolnicza w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 Poznań
e-mail: gumienna@owl.au.poznan.pl