

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**INFLUÊNCIA DO ÓLEO DE ALGODÃO, GLICOSE E EXTRATO DE LEVEDURA
NA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR UMA NOVA LINHAGEM DE**
Candida glabrata

JULIANA MOURA DE LUNA

RECIFE

2006

**INFLUÊNCIA DO ÓLEO DE ALGODÃO, GLICOSE E EXTRATO DE
LEVEDURA NA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR UMA NOVA
LINHAGEM DE *Candida glabrata***

JULIANA MOURA DE LUNA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área: Microbiologia Aplicada

ORIENTADORA: Profa. Dra. GALBA MARIA DE CAMPOS TAKAKI

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. LEONIE ASFORA SARUBBO

RECIFE

2006

Luna, Juliana Moura de

Influência do óleo de algodão, glicose e extrato de levedura na produção de biossurfactante por uma nova linhagem de *Candida glabrata* / Juliana Moura de Luna. – Recife : O Autor, 2006.

v, 65 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas, 2006.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Ciências biológicas – Microbiologia aplicada. 2. *Candida glabrata* isolada de mangue – Determinação da cinética de crescimento. 3. Óleo de algodão, glicose e extrato de levedura – Produção de biossurfactante. 4. Biossurfactante – Isolamento, caracterização físico-química e biológica – Avaliação do potencial biotecnológico. I. Título.

**579.6
579.55**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

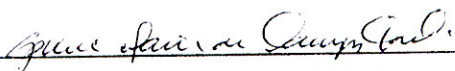
**UFPE
BC2006-107**

**INFLUENCIA DO ÓLEO DE ALGODÃO, GLICOSE E EXTRATO DE
LEVEDURA NA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR UMA NOVA
LINHAGEM DE *Candida glabrata***

Juliana Moura de Luna

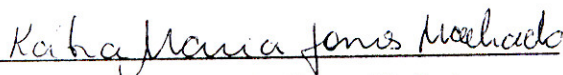
Comissão Examinadora

ORIENTADORA:

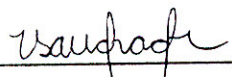


**Profª. Drª. Galba Maria de Campos Takaki -
Universidade Católica de Pernambuco, Recife - PE**

EXAMINADORES:

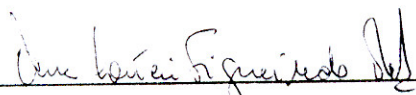


**Profª. Drª. Kátia Maria Gomes Machado -
Universidade Católica de Santos, Santos - SP**



**Profª. Drª. Vânia de Souza Andrade -
Universidade Federal de Alagoas, Maceió - AL**

SUPLENTES:



**Profª. Drª. Ana Lúcia de Figueiredo Porto -
Universidade Federal de Pernambuco, Recife - PE**



**Profª. Drª. Rosa Valéria da Silva Amorim -
Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa - PB**

Às pessoas mais importantes da minha vida

Meus Pais

Mauricio de Souza Luna

Maria Vaneide Moura de Luna (*in memoriam*)

Minha Irmã

Mariana Moura de Luna, pelo incentivo, apoio, participação e amor dedicados ao longo desta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, por te me permitido concluir esta etapa inicial em minha carreira profissional;

À Prof^a. Dr^a. Galba Maria de Campos Takaki, pela orientação, atenção e principalmente, por todos os conhecimentos científicos transmitidos no decorrer deste curso;

À Prof^a. Dr^a. Leonie Asfora Sarubbo, pela aprendizagem, amizade, atenção e incentivo durante todos esses anos de convívio;

Aos amigos do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB) pelos momentos de confraternizações e apoio nas horas de trabalho, em especial a Carolina Gusmão, Charles Bronzo, Raquel Rufino pela amizade e ajuda na realização deste trabalho;

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas pelos conhecimentos transmitidos durante o curso;

As coordenadoras do Mestrado prof^a. Dr^a. Suely Lins Galdino e prof^a. Dr^a Maria Tereza Correia, pelas atenções;

Aos funcionários do NPCIAMB, Severino Humberto de Almeida, Salatiel Joaquim de Santana e Sônia Maria de Souza, pela atenção e apoio durante o decorrer do trabalho;

A Marcelo Mulatinho, pelo incentivo e compreensão durante esta caminhada;

Aos prof. José Edson Gomes de Souza e prof^ª. Dr^a Clarissa Daisy Costa Albuquerque, por toda amizade e incentivo;

A Vanessa Ximenes, Thayse Alves e Marcos Antônio de Moraes pela amizade e ajuda;

A Secretária do CCB, Adenilda Eugênia de Lima, por toda atenção;

A toda minha turma de mestrado, companheiros e amigos;

Ao Magnífico Reitor da Universidade Católica de Pernambuco, Pe. Theodoro Paulo Severino Peters S. J., pelo acesso aos laboratórios de NPCIAMB para realização deste trabalho;

Aos órgãos de fomento à pesquisa CNPq, FINEP e FACEPE pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	página
LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Biossurfactantes.....	3
2.1.1 Classificação e natureza química.....	3
2.1.2 Propriedades.....	6
2.1.3 Microrganismos produtores.....	7
2.1.4 Vantagens no uso de biossurfactantes.....	9
2.1.5 Aplicações.....	10
3. OBJETIVOS.....	13
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	14
5. ARTIGO.....	23
Biossurfcatante produzido por uma nova linhagem de <i>Candida glabrata</i> utilizando óleo de algodão, glicose e extrato de levedura como substratos: isolamento, caracterização e aplicação.....	24
Resumo.....	25
Introdução.....	26
Materiais e métodos.....	28
Resultados e discussão.....	32
Agradecimentos.....	38

Referências.....	38
6. CONCLUSÕES GERAIS.....	53
ANEXOS.....	54

LISTA DE FIGURAS

página

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1 - Estruturas químicas de biossurfactantes (CAMEOTRA & MAKKAR, 1998)..... 5

Figura 2 – Surfactantes são caracterizados por uma estrutura anfipática. As propriedades hidrofóbicas e hidrofílicas dependem da carga do grupo polar (aniônico, catiônico, neutro ou anfotérico). (a) monômero surfactante, denotado por um círculo representando a cabeça hidrofílica ligada à cadeia de hidrocarboneto; (b) micela circular; (c) micela cilíndrica; (d) camada micelar; e (e) representação de uma vesícula (MAKKAR & CAMEOTRA, 2002)..... 6

Artigo - Biossurfactante produzido por uma nova linhagem de *Candida glabrata* utilizando óleo de algodão, glicose e extrato de levedura como substratos: isolamento, caracterização e aplicação

Figura 1. Curvas de crescimento de *Candida glabrata*, pH e atividade de emulsificação em n-hexadecano. (A) Crescimento em 5% do óleo de algodão e 0,2% do extrato de levedura; (B) Crescimento em 10% do óleo de algodão e 0,2% do extrato de levedura; (C) Crescimento em 5% de óleo de algodão, 10% de glicose e 0,2% de extrato de levedura..... 47

Figura 2. Curvas de crescimento de *Candida glabrata*, pH e atividade de emulsificação em n-hexadecano. (A) Crescimento em 10% de óleo de algodão, 10% de glicose e 0,4% de extrato de levedura; (B) Crescimento em 5% de óleo de algodão e 0,4% de extrato de levedura; (C) Crescimento em 10% de óleo de algodão e 0,4% de extrato de levedura..... 48

<i>Figura 3.</i> Curvas de crescimento de <i>Candida glabrata</i> , pH e atividade de emulsificação em n-hexadecano. (A) Crescimento em 5% de óleo de algodão, 10% de glicose e 0,4% de extrato de levedura; (B) Crescimento em 10% de óleo de algodão, 10% de glicose e 0,4% de extrato de levedura; (C) Crescimento em 7, 5% de óleo de algodão, 5% de glicose e 0,3% de extrato de levedura.....	49
<i>Figura 4.</i> Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis utilizadas sobre o índice de emulsificação do surfactante produzido por <i>Candida glabrata</i> com 96 h usando n- hexadecano.....	50
<i>Figura 5.</i> Estabilidade do biossurfactante determinada através da tensão superficial do líquido metabólico livre de células de <i>Candida glabrata</i> cultivada em meio mineral contendo 7,5 % de óleo de algodão, 5 % de glicose e 0,3% de extrato de levedura: (A) diferentes pH; (B) diferentes concentrações de NaCl e (C) diferentes temperaturas.....	51
<i>Figura 6.</i> Determinação da concentração micelar crítica (CMC) do biossurfactante isolado de <i>Candida glabrata</i> cultivada em meio mineral contendo 5 % de óleo de algodão, 7,5 % de glicose e 0,3% de extrato de levedura na redução da tensão superficial.....	52

REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1 - Principais classes de biossurfactantes e microrganismos produtores (DESAI & BANAT, 1997).....	4
Tabela 2 – Principais aplicações comerciais dos biossurfactantes (BANAT, 2000).....	12
 Artigo - Biossurfcantante produzido por uma nova linhagem de <i>Candida glabrata</i> utilizando óleo de algodão, glicose e extrato de levedura como substratos: isolamento, caracterização e aplicação	
<i>Tabela 1.</i> Valores das variáveis independentes do planejamento fatorial nos níveis -1, +1 e no ponto central. Variável resposta: atividade de emulsificação após 96 horas de cultivo.....	45
<i>Tabela 2.</i> Remoção de óleo de motor presente em areia pelo biossurfactante isolado de <i>Candida glabrata</i> UCP 1002.....	46

RESUMO

A produção de agentes surfactantes de origem microbiana tem sido intensamente investigada nos últimos anos, considerando seu potencial biotecnológico e aplicações nos mais diversos setores industriais. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo produzir agentes surfactantes a partir de nova linhagem de *Candida glabrata* (UCP 1002), isolada de sedimento de mangue, utilizando óleo de algodão, glicose e extrato de levedura como substratos, onde foram avaliadas as cinéticas de crescimento e de produção do biossurfactante e estudadas as propriedades do biopolímero obtido, seu isolamento, caracterização preliminar e aplicação na remoção de óleos. Inicialmente, foi realizado um planejamento fatorial, onde a melhor condição de cultivo para a emulsificação do n-hexadecano foi obtida no ponto central do planejamento experimental (meio mineral contendo 7,5 % de óleo de algodão, 5,0 % de glicose e 0,3% de extrato de levedura). O líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante produzido nesta condição, após 144 horas de cultivo a 150 rpm, revelou a capacidade do surfactante em reduzir a tensão superficial da água de 70 mN/m para valores em torno de 31 mN/m. O biopolímero produzido demonstrou estabilidade em condições extremas de pH, temperatura e concentrações salinas. O rendimento do biossurfactante isolado foi de 10 g/l, com uma concentração micelar crítica de 2,5%. A atividade de emulsificação do n-hexadecano pelo líquido metabólico livre de células foi totalmente recuperada após o isolamento do biossurfactante. O biossurfactante isolado foi capaz de recuperar 84% do óleo de motor de areia contaminada. A caracterização do biossurfactante indicou a presença de proteínas (45%), lipídios (20%) e carboidratos (10%). Os resultados obtidos com a produção de biossurfactante por uma nova linhagem de *Candida glabrata*, nas condições testadas acima, demonstraram propriedades promissoras do biopolímero, em especial, na remoção de óleos.

ABSTRACT

The production of surfactants of microbiologic origin has been intensively investigated during the last few years due their biotechnological potential and applications in different industrial sectors. Thus, the aim of the present work was to produce surfactants by a new strain of *Candida glabrata* UCP 1002 isolated from mangrove sediments. Cotton seed oil, glucose and yeast extract were used as substrates. The growth kinetics, biosurfactant production, biosurfactant properties, isolation, characterization and application in oil removal were studied. A factorial design was first conducted and the best conditions for n-hexadecane and cotton seed oil emulsification were found in the central point of the experimental design (mineral medium containing 7.5 % cotton seed oil, 5.0 % glucose and 0.3% yeast extract). The surface tension of the cell-free broth containing the biosurfactant produced under the conditions of the central point, after 144 hours of cultivation at 150 rpm, revealed the ability of the biosurfactant in reducing the surface tension of water from 70 mN/m to 31 mN/m. The biopolymer produced showed stability under extreme conditions of pH and temperature and in the presence of high salt concentrations. The yield of biosurfactant produced was 10 g/L, with a critical micellar concentration of 2.5%. The emulsification activity of n-hexadecane by the cell-free broth was totally recovered by the isolated biosurfactant. The isolated biosurfactant was able to recover 84% of the motor oil from contaminated sand. The characterization of the biosurfactant showed the presence of 45 % protein, 20% lipid and 10 % carbohydrate. The results obtained for the biosurfactant produced by a new *Candida glabrata* strain cultivated under conditions described above showed attractive properties of the biopolymer, specially in oils removal.

1. INTRODUÇÃO

Com a globalização da indústria e a necessidade de sustentabilidade ambiental, que busca tratar praticamente todos os resíduos gerados, a biotecnologia oferece soluções para reduzir os problemas ambientais gerados pelos grandes complexos industriais, destacando-se a indústria petroquímica. Os processos de biorremediação e biorremocão surgem como tecnologias inovadoras e apresentam resultados satisfatórios na remoção dos compostos derivados de petróleo e metais pesados, entre outros poluentes (COOPER & ZAJIC, 1980; SAINT-BLANQUAT, 1984; ABU-RUWAIDA et al., 1991; FIECHTER, 1992; CARRILO et al., 1996).

Os surfactantes constituem uma classe de compostos químicos amplamente utilizados em diversos setores industriais, uma vez que estes polímeros possuem propriedades para aplicação no controle de resíduos oleosos dispersos (LIN, 1996). A dificuldade de biodegradação de compostos hidrofóbicos se deve a ligação destes às partículas do solo e a pequena solubilidade em água, resultando numa biodisponibilidade reduzida para os microrganismos, o que pode retardar ou até mesmo paralisar o processo de degradação (DANIEL et al., 1998; MAKAR & CAMEOTRA, 1999b).

Os surfactantes possuem estrutura molecular com grupos hidrofílicos e hidrofóbicos que exibem propriedades como adsorção, formação de micelas, formação de macro ou micro emulsões, ação espumante, solubilidade e detergência (LANG & WULLBRANDT, 1999).

A busca por surfactantes naturais em substituição aos surfactantes sintéticos derivados do petróleo tem sido assunto de grande interesse da biotecnologia, em função da necessidade de preservação ambiental. Nesse contexto, destacam-se os metabólitos produzidos por microrganismos, os chamados biossurfactantes (HABA et al., 2000).

Os biossurfactantes incluem uma grande variedade de estruturas químicas tais como glicolipídios, lipopeptídeos, complexos proteínas-polissacarídeos, fosfolipídeos, ácidos graxos e lipídeos neutros produzidos por microrganismos quando cultivados em substratos insolúveis (óleos, resíduos e hidrocarbonetos) e solúveis (carboidratos). Devido a grande variedade de constituição ocorrem diversas propriedades e funções fisiológicas entre as várias famílias destes biopolímeros (KIM et al., 2000).

Nos últimos anos, os estudos voltados para a produção de biotensioativos têm se intensificado com a finalidade de utilizá-los na indústria, principalmente a do petróleo. Essas biomoléculas podem ser empregadas tanto na recuperação de petróleo quanto em processos de biorremediação e dispersão de derrames de óleo em terra e em mar (GUDIÑO & CRISPÍN, 2001).

1

Os biossurfactantes constituem uma classe importante de compostos químicos amplamente utilizada em diversos setores industriais, tais como farmacêuticos, cosméticos e alimentícios, entre outros. Suas inúmeras aplicações em diversos setores industriais envolvem desde ação de detergência à solubilização e dispersão de fases (MAKKAR & CAMEOTRA, 2002; RAHMAN et al., 2003; HUA et al., 2003).

O maior mercado para os biossurfactantes é a indústria petrolífera, onde podem ser utilizados na biorremediação e dispersão de derramamentos de óleos, remoção e mobilização de resíduos de óleos em tanques de estocagem, na recuperação melhorada de petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes (MULLIGAN et al., 2003; MULLIGAN, 2005). Outras aplicações incluem os mais diversos setores industriais, como as indústrias de alimentos, de detergentes, de cosméticos e farmacêutica (PAZ, 2005).

A tecnologia utilizada para produção de biossurfactantes por *Candida lipolytica* utilizando fontes nutricionais de baixo custo, como óleos vegetais e resíduos industriais, vem sendo amplamente investigada na literatura (VANCE-HARROP et al., 1997; SARUBBO et al., 1997; SARUBBO et al., 1999; VANCE-HARROP, 2000; SARUBBO et al., 2001).

Neste sentido, a continuidade de estudos para a produção de agentes surfactantes representa uma alternativa não só para o controle e prevenção da poluição ambiental, mas também para atender aos diversos setores industriais.

No presente trabalho foi investigada a produção de agentes surfactantes a partir de uma nova linhagem de *Candida glabrata* utilizando óleo de algodão, glicose e extrato de levedura como substratos através do uso de um planejamento fatorial. Além disso, foi realizado o estudo da cinética de crescimento e de produção de biossurfactante, o seu isolamento, caracterização e sua aplicação na remoção de óleos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 BIOSSURFACTANTES

Os biossurfactantes são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica. A porção polar é frequentemente uma cadeia hidrocarbonada enquanto que a apolar pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfotérica. Alguns exemplos de surfactantes iônicos utilizados comercialmente incluem ésteres sulfatados ou sulfatos de ácidos graxos (aniônicos) e sais de amônio quaternário (catiônico) (SANT-BLANQUAT, 1984; MARÍN, 1996). Em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade óleo/água e água/óleo (DESAI, 1997; PEKDEMIR, 1999).

Os compostos de origem microbiana denominados de biossurfactantes são produtos metabólicos de microrganismos como bactérias, fungos filamentosos e leveduras e exibem propriedades surfactantes com alta capacidade emulsificante e redução da tensão superficial (HOLMBERG, 2002).

A formação de um filme molecular reduz a tensão superficial e interfacial sendo responsável pelas propriedades únicas dos surfactantes (RON & ROSENBERG, 2001). A grande maioria dos surfactantes hoje disponível é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, as novas legislações de proteção ao meio ambiente, bem como a preocupação ambiental entre os consumidores, têm levado à procura por surfactantes naturais como alternativa aos produtos existentes (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Os biossurfactantes apresentam diversas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos e podem ser utilizados em uma grande variedade de aplicações industriais, porém ainda não são utilizados em larga escala devido aos custos de produção (VAN-HAMME et al., 2003), apesar de serem produzidos a partir de fontes renováveis e possuírem baixa toxicidade (QUEIROGA et al., 2003).

2.1.1 Classificação e natureza química

Os biossurfactantes são classificados de acordo com a sua composição química ou origem microbiana (Tabela1). As principais classes incluem glicolipídeos, lipopeptídeos, lipoproteínas, fosfolipídeos, ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (SOON et al., 2004).

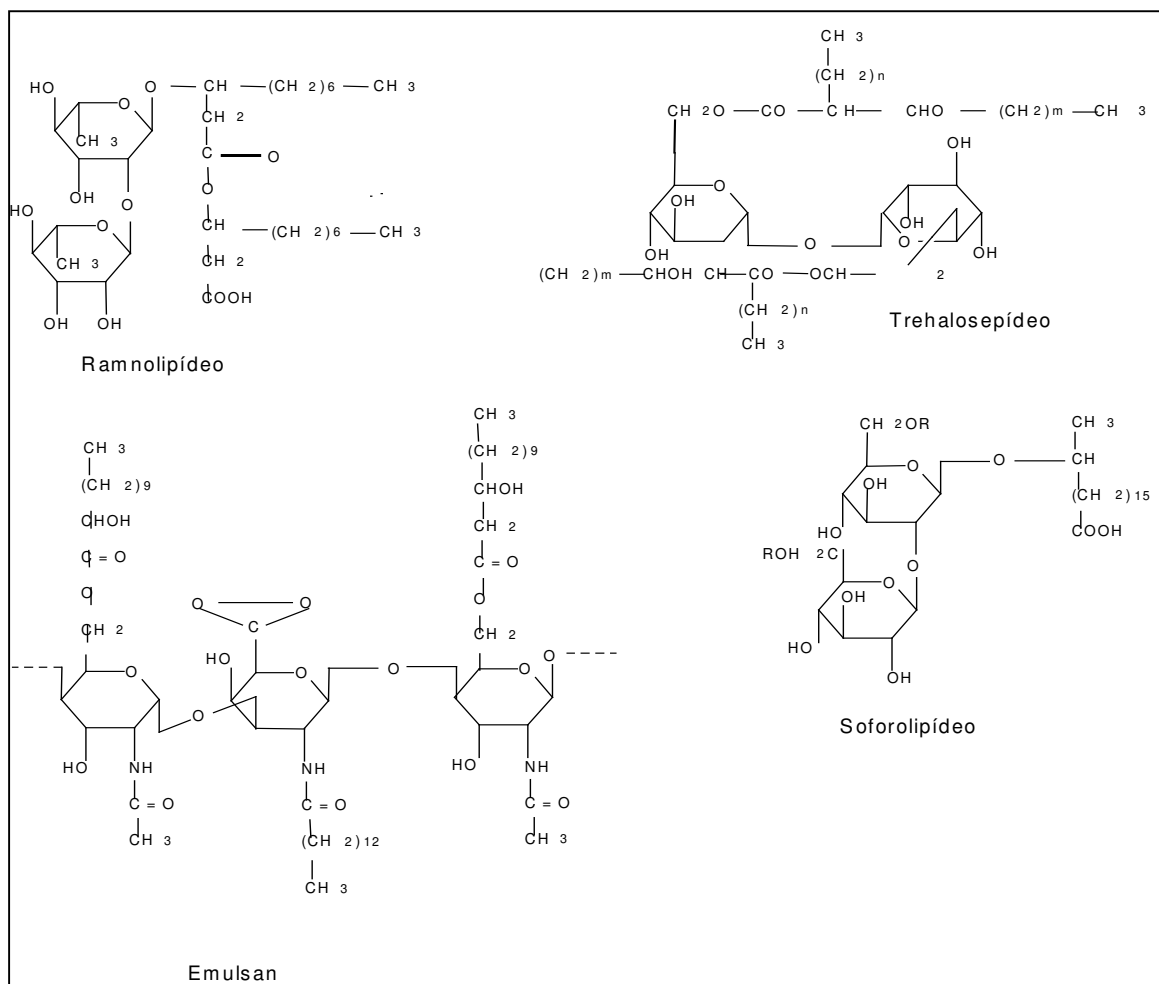
Tabela 1 - Principais classes de biossurfactantes e microrganismos produtores

Classe / Tipo de Biossurfactante	Microrganismo
Glicolipídeos	
-ramnolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
-soforolipídeos	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apicola</i>
-treololipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium sp.</i>
Lipopeptídeos e lipoproteínas	
-Peptídeo-lipídeo	<i>Bacillus licheniformis</i>
-Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
-Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
-Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
-Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
-Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
-Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos	
-Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
-Lipídeos neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
-Fosfolipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos	
-emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
-biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
-liposan	<i>Candida lipolytica</i>
-carboidrato-lipídeo-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
-manana-lipídeo-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
Surfactantes particulados	
-vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
-células	Várias bactérias

Fonte: DESAI; BANAT, 1997

Os surfactantes podem ser aniônicos, catiônicos, neutros, e anfotéricos. O maior grupo de surfactantes é formado por compostos dos tipos aniônico e neutro, enquanto que a utilização dos catiônicos e anfotéricos é muito pequena (URUM, 2004).

A habilidade dos surfactantes em atuar na interface entre dois líquidos imiscíveis deve-se a sua natureza anfipática. O grupo polar da molécula, constituído de mono, di ou polissacarídeos, ácidos carboxílicos, aminoácidos ou peptídeos, tem afinidade pela fase aquosa (hidrofílico) na qual se dissolve, enquanto que a porção apolar (hidrofóbica), usualmente uma cadeia de hidrocarboneto, tem afinidade pela fase orgânica (DELEU & PAQUOT, 2004). A figura 1 ilustra algumas estruturas químicas de biossurfactantes.



Fonte: DESAI; BANAT, 1997

Figura 1 - Estruturas químicas de biossurfactantes

2.1.2 Propriedades

Os surfactantes atuam como um produto que facilita a formação de uma emulsão devido à capacidade de reduzir a tensão interfacial entre duas fases distintas e, numa etapa subsequente, estabiliza a emulsão formada (CRUEGER & CRUEGER, 1984; FIECHTER, 1992). Muitas estruturas e propriedades dos biossurfactantes diferem dos surfactantes sintéticos, fornecendo novas possibilidades para aplicações industriais (MERCADÉ, 1994).

Surfactantes eficientes apresentam uma baixa concentração micelar crítica (CMC). A CMC determina o mínimo de concentração do biossurfactante necessária para formar micelas (STAMPFLI & NERSTEN, 1995). Na prática, a CMC representa também o máximo de monômeros surfactantes presentes na água influenciados pelo pH, temperatura e ligações iônicas (Figura 2).

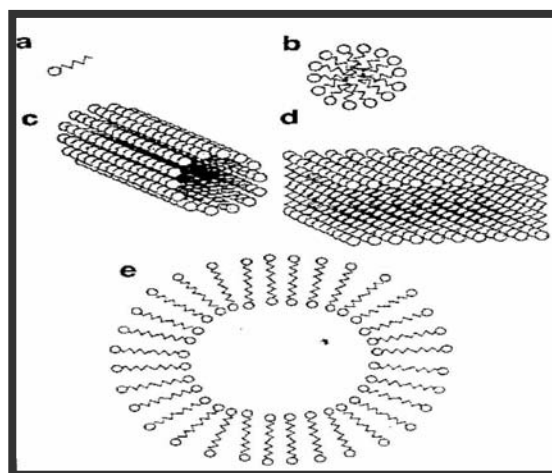


Figura 2 – Surfactantes são caracterizados por uma estrutura anfipática. As propriedades hidrofóbicas e hidrofílicas dependem da carga do grupo polar (aniônico, catiônico, neutro ou anfotérico). (a) monômero surfactante, denotado por um círculo representando a cabeça hidrofílica ligada à cadeia de hidrocarboneto; (b) micela circular; (c) micela cilíndrica; (d) camada micelar; e (e) representação de uma vesícula (MAKKAR & CAMEOTRA, 2002)

A CMC é uma propriedade característica de um surfactante que pode ser obtida a partir de um gráfico semi-logarítmico da tensão superficial de uma solução contra a concentração surfactante (KOSARIC, 1996).

A CMC é dos índices mais utilizados para a avaliação da atividade surfactante podendo ser definida também como a solubilidade de um surfactante dentro da fase aquosa ou a concentração mínima requerida para atingir a menor tensão superficial (LIN, 1996). A eficiência e a efetividade são características básicas essenciais que determinam um bom surfactante. A eficiência é medida através da CMC que varia de 1 a 2000 mg/L, enquanto que a efetividade está relacionada com as tensões superficiais e interfaciais as quais devem atingir valores em torno de 31 e 1 mN/m, respectivamente (RON & ROSENBERG, 2001).

As propriedades físicas e químicas dos biossurfactantes, como a redução da tensão superficial, a capacidade espumante, a capacidade emulsificante e estabilizante, concentrações micelares críticas baixas, solubilidade, poder detergente são muito importantes na avaliação de seu desempenho e na seleção de microrganismos com potencial de produção destes agentes (MAKKAR & CAMEOTRA, 2002).

O principal papel fisiológico dos biossurfactantes é permitir aos microrganismos crescerem em substratos insolúveis em água através da capacidade de redução da tensão superficial entre as fases, tornando o substrato mais disponível para ingestão e metabolismo (TULEVA et al., 2002).

2.1.3 MICRORGANISMOS PRODUTORES

Os biossurfactantes são produzidos por uma variedade de microrganismos e estes podem utilizar uma diversidade de substratos, desde os hidrocarbonetos até os substratos insolúveis (HITSATSUK et al., 1971; COOPER et al., 1984; JAVERI et al., 1985). Muitos deles produzem uma mistura complexa de polímeros, particularmente durante o crescimento em substratos imiscíveis. A maioria dos biossurfactantes encontrados tem sido principalmente produzidos por bactérias, seguindo-se as leveduras e alguns fungos filamentosos (Tabela 1) (GERRA-SANTOS et al., 1986; SYLDAK et al., 1987).

Os tipos, as quantidades e a qualidade do biossurfactante produzido são influenciados pela natureza do substrato e concentração de íons como P, N, Mg e Fe no meio de cultura, além das condições de cultivo (ROBERT et al., 1989).

Os hidrocarbonetos são os substratos mais utilizados na produção de biossurfactantes (YOUSSEF et al., 2004). A produção pode estar associada a um agente emulsificante (extracelular) ou a um componente que facilite a passagem do substrato na membrana celular (associação de membrana celular). Os biossurfactantes, no entanto, podem também ser produzidos por substratos solúveis, como os carboidratos (SARUBBO et al., 2001) ou a partir da combinação entre um substrato solúvel e insolúvel, como descrito para leveduras (AKSU, 2004).

Um grupo de biossurfactantes que vem sendo muito estudado é o de ramnolipideos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*. Valores de tensão superficial de 29 mN/m são característicos destes componentes, que podem ser produzidos a partir de vários substratos, incluindo alcanos (C11 e C12), piruvato, citrato, frutose, glicerol, óleo de oliva e glicose (GEORGIOU et al., 1992).

Segundo Bloomberg (1991), os ramnolipideos produzidos por *Pseudomonas* sp. têm a capacidade de diminuir a tensão interfacial contra n- hexadecano para 1mN/m e a tensão superficial do meio para 25-30 mN/m. No entanto, Mercade et al., (1993), descreve o sucesso da produção de biossurfactante utilizando óleo de oliva do efluente do moinho por *Pseudomonas* sp.

A produção de biossurfactantes também foi estudada com *Pseudomonas aeruginosa* em meio suplementado com glicose e hexadecano como substratos, apresentando uma redução da tensão superficial de 57 para 27 mN/m e uma produção do biossurfactante de 0,97 g/L (ZHOU & KOSARIC, 1993; 1995). Contudo, a composição e os rendimentos da produção de biossurfactante dependem do tipo do fermentador, do pH, da composição dos nutrientes, dos substratos e da temperatura utilizada (BANAT, 1995a; SUDHAKAR-BABU et al., 1996).

Para Bento e Gaylarde (1996), a produção de biossurfactantes por *Pseudomonas* sp. pode ocorrer na presença dos substratos glicose e óleo diesel. Em um estudo similar, Muriel et al., (1996) observaram a produção extracelular de biossurfactante por *Cladosporium resinae*. Essa produção foi observada através da redução da tensão superficial e da formação de emulsões.

Entre as leveduras mais utilizadas, os isolados do gênero *Candida* têm sido empregados com sucesso na fermentação de hidrocarbonetos e consequentemente, na produção de biossurfactantes. Em 1979, Pareilleux observou a presença de um polímero extracelular por *C. lipolytica* com propriedades emulsificantes, quando esta foi crescida em n-tetradecano ou na mistura de hidrocarbonetos lineares. Os polímeros recuperados do líquido metabólico demonstraram ser moléculas complexas, constituídas por uma fração lipídica, uma protéica e

outra por carboidratos, sendo esta última, em maior quantidade. Os resultados sugeriram que, para qualquer n-alceno utilizado como fonte de carbono, todos os componentes do polímero e suas respectivas proporções na molécula permaneciam inalterados.

Por outro lado, Cirigliano e Carman (1985) isolaram um bioemulsificante produzido por *C. lipolytica* cultivada em meio contendo n-hexadecano, demonstrando perspectivas e potencial para uso em sistemas alimentares; enquanto que, Marçal (1991) demonstrou a produção de biopolímeros por *C. lipolytica* com alta atividade de emulsificação utilizando substratos regionais (óleo de babassu, de coco e de dendê). Sarubbo e colaboradores (1999; 2001) também utilizaram a *C. lipolytica* na produção de agentes surfactantes em meios contendo óleo de babaçu e glicose como substratos.

A *Candida tropicalis* quando crescida em culturas em batelada alimentada utilizando n-hexadecano como fonte de carbono, exibiu produção de biossurfactante (SING et al., 1990). No mesmo ano, Kitamoto et al., (1990a) estudaram a produção de biossurfactantes por *C. antarctica* quando cultivada em óleo de soja como fonte de carbono, sendo o biopolímero constituído por glicolipídeos. Segundo Persson et al., (1999), a *C. bombicola* destaca-se entre as leveduras pelo alto rendimento na produção de biossurfactante (67 g/L), por fermentador, utilizando óleo de milho e glicose como substratos. Recentemente, Bednarski et al., (2004) estudaram a produção de biossurfactantes por *C. apicola* ATCC96134 utilizando um resíduo da refinaria de óleo como substrato.

2.1.4 Vantagens no uso de biossurfactantes

As pesquisas biotecnológicas para a produção de biossurfactantes estão direcionadas em função das vantagens desses compostos frente aos surfactantes sintéticos (REISER, 1989; ARORA, et al., 1992; MULLIGAN et al., 1993). Dentre as principais, destacam-se:

- **Diversidade:** existe um grande espectro de surfactantes para satisfazer a demanda industrial. Quase toda aplicação comercial possui condições únicas que ditam o melhor tipo de surfactante a ser utilizado. Um dos maiores problemas existentes hoje para os surfactantes microbianos é selecionar do mundo microbiológico microrganismos que produzam surfactantes com chances de serem comercializados com sucesso no mercado (BANAT, 1995a);

- Biodegradabilidade e inativação controlada dos biossurfactantes: vários surfactantes quimicamente sintetizados e comercializados resistem a biodegradação, acumulam-se na natureza e causam problemas ecológicos. Surfactantes microbiológicos, como todos os produtos naturais, são susceptíveis a degradação por microrganismos na água e no solo (BANAT, 1995b);
- Seletividade para interfaces específicas: um dos vários princípios das moléculas biológicas é sua notável especificidade comparada aos materiais quimicamente sintetizados (LIN, 1996);
- Atividade superficial e interfacial: os biossurfactantes são mais eficientes e mais efetivos do que os surfactantes convencionais (detergentes aniônicos sulfatados) pois produzem menor tensão superficial em menores concentrações de biossurfactante (DESAI, 1997);
- Baixa toxicidade: os biossurfactantes têm recebido maior atenção também devido à crescente preocupação da população com os efeitos alérgicos dos produtos artificiais; além disso, sua baixa toxicidade permite o uso em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (BONGNOLO, 1999);
- Tolerância à temperatura, pH e força iônica: alguns biossurfactantes apresentam elevada estabilidade térmica e de pH, podendo ser utilizados em ambientes com condições mais drásticas (MEYLHEUC & HENRY, 2001).

2.1.5 Aplicações

Estima-se que a produção mundial de surfactantes exceda três milhões de toneladas por ano (VATER, 1986; BROWN, 1991) sendo utilizados principalmente como matéria-prima na fabricação de detergentes de uso doméstico (FIECHTER, 1992; GERSON, 1993; MAIER & SOBERON-CHAVEZ, 2000). Na nova era global da industrialização, por outro lado, em que muitas indústrias clássicas estão sendo inovada e redirecionada para novas tecnologias, a biotecnologia tem um desafio que permite diversas oportunidades de pesquisas sem alterar a produtividade. Os rápidos desenvolvimentos na biotecnologia e o aumento da consciência

ambiental entre os produtores e consumidores estão colocando os produtos biológicos na preferência do mercado (ZHOU & KOSARIC, 1995; SHEPHERD et al., 1995).

O maior mercado para os biossurfactantes é a indústria petrolífera, onde são utilizados na produção de petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes (BANAT, 1995a; LIN, 1996). Também são aplicados na biorremediação e dispersão de derramamentos de óleos e na recuperação melhorada de petróleo (COBENAS et al., 1998; CAMEOTRA & MAKAR, 1998).

Os biossurfactantes vêm sendo testados em recuperação de óleos e no transporte de óleo bruto, mostrando-se eficientes na redução da tensão interfacial óleo/água *in situ*, na redução da viscosidade do óleo, e na limpeza da areia (GARCIA-OCHOA & CASAS, 1999; FOX et al., 2000). As moléculas de emulsan, um polissacarídeo composto por ácidos graxos e proteínas, vêm sendo comercializadas para este propósito (BANAT et al., 2000; DUBEY & JUWAKAR, 2001). Outros biossurfactantes são relatados por Ron e Rosenberg (2002). A maioria é produzida a partir de microrganismos aeróbios, embora existam alguns anaeróbios, como o *Bacillus licheniformes*, que podem ser utilizados na biorremediação de locais onde ocorrem derramamento de óleos. A Tabela 2 resume as principais aplicações comerciais para os biossurfactantes (BANAT et al., 2000).

Na indústria de alimentos, os biossurfactantes são utilizados como emulsificantes para o processamento de matérias - primas. A emulsificação é muito importante na formação da consistência e textura e também na dispersão de fases em alimentos (BANAT et al., 2000). Um bioemulsificante produzido por *Candida utilis* tem sido utilizado em molhos prontos para saladas (KIM et al., 2000).

Os biossurfactantes estão sendo utilizados no mercado de produtos de higiene pessoal devido às suas propriedades de baixa umidade e biocompatibilidade (BORDAS et al., 2001). Outras aplicações dos biossurfactantes incluem a agricultura, onde são utilizados na formulação de pesticidas e herbicidas (MEYLHEUC & HENRY, 2001), na indústria farmacêutica (NITSCHKE & PASTORE, 2002), além do emprego nas indústrias de papel, têxtil e cerâmica (RON et al., 2002; VAN HAMME et al., 2003; MULLIGAN, 2005).

Tabela 2 - Principais aplicações comerciais dos biossurfactantes

Funções	Campos de aplicação
Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, biorremediação, óleos, alimentos
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Agentes molhantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas
Detergentes	Produtos de limpeza, agricultura
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos e flotação de minérios
Agentes espessantes	Tintas e alimentos
Sequestrantes de metais	Mineração
Formadores de vesículas	Cosméticos e sistemas de liberação de drogas
Fator de crescimento microbiano	Tratamento de resíduos oleosos
Demulsificantes	Tratamento de resíduos, recuperação de petróleo
Redutores de viscosidade	Transporte em tubulações, oleodutos
Dispersantes	Misturas carvão-água, calcáreo-água
Fungicidas	Controle biológico de fitopatógenos
Agentes de recuperação	Recuperação terciária de petróleo (MEOR)

Fonte: BANAT et al., 2000

3. OBJETIVOS

Geral

Produzir agentes surfactantes a partir de uma nova linhagem de *Candida glabrata* isolada de sedimento de mangue utilizando óleo de algodão, glicose e extrato de levedura como substratos.

Específicos

- Determinar a cinética de crescimento do isolado de *Candida glabrata* utilizando óleo vegetal, glicose e extrato de levedura como substratos;
- Investigar a produção de surfactantes nas condições de cultivo estabelecidas através de um planejamento fatorial;
- Maximizar a produção dos biossurfactantes através das condições pré-estabelecidas;
- Realizar isolamento e caracterização físico-química e biológica do biossurfactante;
- Avaliar o potencial biotecnológico do biossurfactante selecionado.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-RUWAIDA, A.S.; BANAT, I.M.; HADITIRTO, S.; SALEM, A.; KADRI, M. Isolation of biosurfactant-producing bacteria-Product characterization, and evolution. **Acta Biotechnologica**, Berlin, v.2, n.4, p.315-324,1991.

ARORA, D. K.; ELANER, R. P.; MUKERJI, K. G. **Handbook of applied mycology fungal biotechnology**. New York: Marcel Dekker, v. 4, p.1114 , 1992.

AKSU, Z. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. **Process Biochemistry**, v.40, p.328-336, 2004.

BANAT, I.M. Biosurfactant production and use in microbial enhanced oil recovery and possible uses in pollution remediation: a review. **Bioresource Technology**, n.51, p.1-12, 1995(a).

BANAT, I.M . Characterization of biosurfactant and their use in pollution removal state of the art (Review). **Acta Biotechnology**, n.15, p.251-267, 1995 (b).

BANAT, I.M. MAKKAR, R.S. CAMEOTRA, S.S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 53, p.495-508, 2000.

BEDNARSKI, W.; ADAMCZAC, M.; TOMASIK, J.; PLASZCZYK, M. Application of oil refinery waste in the biosynthesis of glycolipids by yeast. **Bioresource Technology**, v. 95, p. 15-18, 2004.

BENTO, F.M.; GAYLARDE C.C. The production of interfacial emulsions by bacterial isolates from diesel. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 38, p.31-33, 1996.

BLOOMBERG, O. Designing proteins as emulsifiers. **Lebensmitteltechnolog**, v.24, p.130-131,1991.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 152, p.41-52, 1999.

BORDAS, F; LaFRANCE, P. Utilisation de biosurfactants (rhamnolipides) pour le traitement d'un sol sableux contamined par le pyrene-Essais em colonnes de sol. **Etude et Gestion des Sols**, v.8, p.187-188, 2001.

BROWN, M.J. Biosurfactants for cosmetic applications. **International Journal of Cosmetic Science**, v.13, p. 61-64,1991.

CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R.S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p.520-529, 1998.

CIRIGLIANO, C.; CARMAN, G. Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, p. 846-850, 1985.

CARRILLO, P.G.; MARDARAZ, C.; PITTA-ALVAREZ, S.I.; GIULIETTI, A M. Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.12, p.82-84, 1996.

COOPER, D.G & PADDOCK, D.A. Production of biosurfactant from *Touropsis bombicola*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.47, n.1, p. 173-176, 1984.

COOPER, D. G.; ZAJIC, J. E. Surface-active compounds from microorganisms. **Advances in Applied Microbiology**, v.26, p. 229-253, 1980.

COBENAS, R. H.; HOOG, S.L. Mejoramiento de la producción de petróleo mediante el uso de aplicaciones biotecnológicas. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v. 2, p.1-12, 1998.

CRUEGER, W.; CRUEGER, A. **Biotechnology: A text book of industrial microbiology**. Madison: Science Tech. p.297, 1984.

DANIEL, H.J.; RESS, M.; SYLDATK, C. Production of sorolipids in high concentration from deproteinized whey and rapeseed oil in a two stage fed batch process using *Candida bombicola* . **Biotechnology Letters**, v.20, p.1153-1156, 1998.

DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potencial. **Microbiology and molecular Biology reviews**, v. 61, p. 47 - 64, 1997.

DELEU, M.; PAQUOT, M. From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. **Computers Rendus Chimie**, (article in press), 2004.

DUBEY, K.; JUWARKAR, A. Destillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactants production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p. 61-69, 2001

FIECHTER, A. Biosurfactants: moving towards industrial application. **Trends in Biotechnology**, v. 10, p. 208-217, 1992.

FOX, S., BALA, G.A. Production of surfactant from *Bacillus* using potato substrates. **Bioresourse Technology**, v. 75, p. 235-240, 2000.

GARCÍA-OCHOA, F.; CASAS, J.A. Unstructured kinetic model for sophorolipid production by *Candida bombicola*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 613-621, 1999.

GERSON, D. F. Biosurfactants: production - properties - applications. In: **Biotechnology**. KOSARIC, N. (ed.) ,1993.

GEORGIU, G.; LIN, S.C.; SHARMA, M.M. Surface - active compounds from microorganisms. **Biotechnology**, v. 10, p. 60-65,1992.

GUERRA-SANTOS, L.H.; KAPPELI, O.; FIECHTER, A. *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.24, p.443-448, 1986.

GUDIÑO, J.M.T.; CRISPÍN, J.A.S. Producción de un biosurfactante microbiano por *Torulopsis magnoliae* en cultivos sumergidos por carga. **Ciência**, v.9, p.305 - 312. 2001.

HABA E.; ESPUNY, M.J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste flying oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.379-387, 2000.

HISTATSUK, K.I., et al. Formation of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* and its function in hydrocarbon fermentation. **Agricultural and biological Chemistry Journal**, v. 5, p. 686-692, 1971.

HOLMBERG, K. Handbook of applied surface and colloid chemistry. John Wiley, New York, v.1, 2002.

HUA, Z.; CHEN, J.; LUN, S.; WANG, X. Influence of biosurfactants produced by *Candida antarctica* on surface properties of microorganism and biodegradation of n- alkanes. **Water Research**, v.37. p.4143-4150, 2003.

KIM, S.H.; LIM, E.J.; LEE, S.O.; LEE, J.D.; LEE, T.H. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L - 417. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 31, p.249-253, 2000.

KITAMOTO, D.D.; AKIBA, S.; HIOKI, C.; TUTUCHI, T. Extracellular accumulation of mannosylerythritol lipids by a strain of *Candida antarctica*. **Agricultural and Biological Chemistry Journal**, Tokyo, v. 54, n. 1, p. 31-36, 1999.

KOSARIC, N. Biosurfactants. In: Rehm HJ, Reed G, Puffier A, Stadler P(eds) **Biotechnology**, VCH, Weinheim, v.6,p. 659-717, 1996

JAVERI, M.; JENNEMAN, G.E.; McINERNEY, M. J., et al. Anaerobic production of a biosurfactant by *Bacillus licheniformis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.50, n.3, p.698-700, 1985.

LANG, S. & WULLBRANDT, D. Rhamnose lipids-biosynthesis, microbial surfactants **Applied Microbiology Biotechnology** .v.51, p.21-32, 1999.

LIN, S.C. Biosurfactants: recent advances. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 66, p.109-120 ,1996.

MAIER, R.M.; SOBERON-CHAVEZ, G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.54, p.625-633, 2000.

MARÇAL, M.C.R. Produção de biopolímeros por *Candida lipolytica* em meio suplementado por óleos vegetais (babaçu, coco e dendê)1991. p.147. (Tese de Mestrado)- Departamento de Nutrição, Centro de Ciências Biológicas, UFPE, 1991.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Biochemical and structural characterization of biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* at thermophilic conditions. **Journal of Surfactants and Detergents**, v.2, p.371-376, 1999b.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 428-434, 2002.

MEYLHEUC, T.; HENRRY, J.M.; BELLON-FONTAINE, M.N. **Sci. Aliments**, v. 21, p.591, 2001.

MARÍN, M.; PEDREGOSA, A.; RIOS, S.; LABORDA, F. **International Biodeterioration & Biodegradation**. p. 69-75, 1996.

MERCADE, M.E.; MANRESA, M.A.; ROBERT, M.; ESPUNY, C.; GUINEA, J. Olive oil mill effluent (OOME) new substrate for biosurfactant production. **Bioresource Technology**, v.43, p. 1-6, 1993.

MERCADE, M.E.; MANRESA, M.A. The use of agro industrial by products for biosurfactant production. **Journal of American Oil and Chemistry Society**, v. 71, p. 61-64, 1994.

MULLIGAN, C.N.; GIBBS, B.F. Biosurfactants: production, properties, applications, 1993.

MULLIGAN, C.N.; YONG R.N.; GIBBS, B.F. Heavy metal removal from sediments by

biosurfactants. **Journal of Hazard Materials**, v. 85, p.111-125, 2001.

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

MURIEL, J.M.; BRUQUE, J.M.; OLÍAS, J.M.; JIMÉNEZ-SÁNCHEZ, A. Production of biosurfactants by *Cladosporium resinae*. **Biotechnology Letters**, v. 18, n.3, p.93-99, 1996.

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

PAREILLEUX, A. Hydrocarbon assimilation by *Candida lipolytica*: formation of a biosurfactant: effects on respiratory activity and growth. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 8, p. 91-101, 1979.

PAZ, M.C.F. Identificação e caracterização de *Bacillus licheniformis* e *Geobacillus stearothermophilus*. Produção de biossurfactante e degradação de dibenzotiofeno (DBT) – Por uma nova amostra de *Geobacillus stearothermophilus* UCP 986. (Tese de doutorado, Universidade Federal de Pernambuco), Recife, PE, 2005.

PEKDEMIR, T.; ISHIGAMI, Y.; UCHIYAMA, H. Characterisation of aescin as a biosurfactant for environmental remediation. **J. Surfactants Detergents**, v. 2, p. 337-341, 1999.

PERSSON, A.; MOLIN, G.; ANDERSSON, N.; SJOHOLM, J. Biosurfactant yields and nutrient consumption of *Pseudomonas fluorescens* studied in a microcomputer controlled multi-fermentation system. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 36, p. 252-255, 1990.

QUEIROGA, C.L.; NASCIMENTO, L.R.; SERRA, G.E. Evaluation of paraffins biodegradation and biosurfactant production by *Bacillus subtilis* in the presence of crude oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, p.1321-324, 2003.

RAHMAN, K.S.M.; RAHMAN, T.J.; KOURKOUTAS, Y.; PETSAS, I.; MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Enhanced bioremediation of n- alkanes in petroleum sludge using bacterial

consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. **Bioresource Technology**, v. 90, p.159-168, 2003.

REISER, J.; KOCH, A.K.; JENNY, K.; KAPPELI, O. **Advances in Applied Biotechnology Series**, 1989.

ROBERT, M.; MERCADÉ, E.; ANDRÉS, C.; ESPUNY, M. J.; MANRESA, M.A.; GUINEA, J. Optimización de la producción de biotensioativos por *Ipseudomonas aeruginosa* 44T1. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v. 42, n. 1, p. 1-7, 1991.

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

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

SAINT-BLANQUANT, G. Effects nutritionnels des agents émulsifiants utilisés in alimentation humaine. **Medicine and Nutrition**, Toulouse, v. 20, n. 6, p. 379-395, 1984.

SARUBBO, L. A. Otimização da produção de biopolímeros por *Candida lipolytica* utilizando óleo de babaçu como fonte de carbono. 1997. p.108. (Tese de Mestrado) UFPE, 1997.

SARUBBO, L.A.; PORTO, A.L.F.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. The use of babassu oil as substrate to produce bioemulsifiers by *Candida lipolytica*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 423-426, 1999.

SARUBBO, L. A.; MARÇAL, M. C. R.; NEVES, M. L. C.; SILVA, M. P. C.; PORTO, A. L. F.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, n. 95, p. 59-67, 2001.

SING, M.; SAINI, V.S.; ADHIKARI, D.K.; DESAI, J.D.; SISTA, V.R. Production of biomulsifier by a SCP-producing strain of *Candida tropicalis* during hydrocarbon fermentation. **Biotechnology Letters**, Surrey, v. 12, n. 10, p. 743- 746, 1990.

SYLDAK, C.; WAGNER, F. Production of biosurfactants. In N. KOSARIC, W.L.; CAIRNS, N.C.C. gray. **Biosurfactants and Biotechnology**, Marcel Dekker, Inc., New York, p. 89-120, 1987.

SOON, E.L.; SALLEH, A.B.; BASRI, M.; RAHMAN, R.N.Z.A.; KAMARUDDIN, K. Response surface methodological study on lipase-catalyze synthesis of amino acid surfactants. **Process Biochemistry**, v. 39, p.1511-1518, 2004.

SUDHAKAR-BABU, P.; et al. Kinetics of biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2 from industrial wastes. **Biotechnology Letters**, v.18, p.263-268, 1996.

SHEPHERD, R.; ROCKEY, J.; SUTHERLAND, I.W.; ROLLER, S. Novel bioemulsifier from microorganisms for use in foods. **Journal of Biotechnology**, v.40, p.207-217, 1995.

STAMPFLI, L.; NERSTEN, B. Emulsifiers in bread making. **Food Chemistry**, Oxford, v. 52, p. 353-360, 1995.

TULEVA, B.K.; IVANOV, G.R.; CHRISTOVA, N.E. Biosurfactant Production by a New *Pseudomonas putida* Strain. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 57, p.356 – 360, 2002.

URUM, K.; PEKDEMIR, T.; COPUR, M. Surtactants treatment of oil contaminated soils. **Journal of Colloid and interface Sciencw**, p. 456-464, 2004.

VANCE-HARROP, M.H.V.; ROCHA, J.A.; SARUBBO, L.A.; CARNEIRO DA CUNHA, M.G.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. **Utilization of babassu oil to produce biosurfactant with *Candida lipolytica***. XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular- SBBQ. Caxambu, 03 a 06 de maio de 1997.

VANCE-HARROP, M.H.V. Influência das fontes de carbono D-glicose e óleo de babaçu no crescimento de *Candida lipolytica* e na produção de biossurfactantes. Recife, p.72. Dissertação (mestrado em Biologia de fungos). Centro de Ciências Biológicas, UFPE, 2000.

VATER, P.J. Lipopeptides in food applications. In: Kosaric N (ed) **Biosurfactants - production, properties and applications**. Dekker, New York, p. 419-446, 1986.

VAN HAMME, J.D.; SINGH, A; WARD, O.P. Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.67, n. 4, p.503-549, 2003.

YOUSSEF, N.H.; DUCAN, K.E.; NAGLE, D.P.; SAVAGE, K.N.; KNAPP, R.M.; McINERNEY, M.J. Comparision of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganism. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, p.339-347, 2004.

ZHOU, Q.H.; KOSARIC, N. Effect of lactose and olive oil on intra- and extracellular lipids of *Torulopsis bombicola*. **Biotechnology Letters**, v. 15, p. 477-482, 1993.

ZHOU, Q.H.; KOSARIC, N. Utilization of Canola Oil and lactose to produce biosurfactant with *Candida bombicola*. **Journal American oil Chemistry Society**, v.72, p. 67-71, 1995.

BIOSSURFACTANTE PRODUZIDO POR UMA NOVA LINHAGEM DE *Candida glabrata* UTILIZANDO ÓLEO DE ALGODÃO, GLICOSE E EXTRATO DE LEVEDURA COMO SUBSTRATOS: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO

Manuscrito a ser Submetido ao Periódico Internacional:

World Journal of Microbiology and Biotechnology

BIOSURFACTANTE PRODUZIDO POR UMA NOVA LINHAGEM DE *Candida glabrata* UTILIZANDO ÓLEO DE ALGODÃO, GLICOSE E EXTRATO DE LEVEDURA COMO SUBSTRATOS: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO

J.M. Luna,^{1,3} L.A. Sarubbo^{2,3} and G.M. Campos-Takaki^{2,3,*}

¹*Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Rua Nelson Chaves, s/n, Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil*

²*Departamento de Química - Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), Rua do Príncipe, Boa Vista, Recife-PE, Brasil*

³*Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB) - UNICAP, Rua Nunes Machado, n. 42, Bloco J, Boa Vista, CEP: 50050-590, Recife-PE, Brasil*

*Autor para correspondência: Tel.: +55-81-21194044, Fax: +55-81-21194043, E-mail: takaki@unicap.br

BIOSURFACTANTE PRODUZIDO POR UMA NOVA LINHAGEM DE *Candida glabrata* UTILIZANDO ÓLEO DE ALGODÃO, GLICOSE E EXTRATO DE LEVEDURA COMO SUBSTRATOS: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO

Resumo

A produção de biossurfactantes por Candida glabrata UCP1002, levedura isolada de mangue, foi inicialmente estudada utilizando-se um planejamento fatorial, visando avaliar a influência da concentração dos seguintes componentes do meio de cultura: óleo de algodão, glicose e extrato de levedura. Os melhores resultados para a emulsificação do n-hexadecano foram obtidos no ponto central do planejamento experimental (7,5% óleo de algodão, 5% de glicose e 0,3% de extrato de levedura). A espécie de Candida mostrou-se capaz de reduzir a tensão superficial do meio para 31mN/m após 144 horas de cultivo, revelando a capacidade surfactante do biopolímero. O biossurfactante produzido apresentou estabilidade em condições extremas de pH, temperatura e sob elevadas concentrações salinas. O rendimento de produção nas condições acima foi de 10g/L. A análise preliminar dos constituintes do biossurfactante isolado indicou a presença de proteínas (45%), lipídios (20%) e carboidratos (10%). O biossurfactante apresentou potencial para aplicação ambiental como na remoção de óleo de areia contaminada.

Palavras-chave: biopolímero, bioemulsificante, *Candida glabrata*, remoção de óleo

Introdução

A produção mundial de surfactantes excede três milhões de toneladas por ano sendo a grande maioria dos surfactantes disponíveis sintetizados a partir de derivados de petróleo. Com o advento da biotecnologia e as novas legislações de controle ambiental têm incentivado a pesquisa por surfactantes naturais como alternativa aos produtos já existentes (Nitschke & Pastore 2002).

Os biossurfactantes constituem uma das principais classes de surfactantes naturais, produzidos por microrganismos, sendo classificados de acordo com a sua composição química ou origem microbiana. As principais classes incluem glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas (Ron 2001). Estes polímeros vêm, nos últimos anos, despertando considerável interesse devido à natureza biodegradável, baixa toxicidade e diversidade de aplicação. Outra vantagem reside no fato de serem compostos não derivados de petróleo, fator importante à medida que o preço do petróleo vem aumentando nos últimos tempos. A possibilidade de modificação da estrutura química e das propriedades físicas dos biossurfactantes através de manipulações genéticas, biológicas ou químicas, permite o desenvolvimento de produtos para necessidades específicas. Entre as aplicações comerciais dos biossurfactantes destacam-se a recuperação do petróleo e a formulação de lubrificantes, além de diferentes utilizações nas indústrias têxtil, cosmética, alimentícia e farmacêutica (Rahman *et al.* 2003).

Com a globalização da indústria e a necessidade de sustentabilidade ambiental, que busca tratar praticamente todos os resíduos gerados, a biotecnologia oferece, soluções para reduzir os problemas ambientais gerados pelos grandes complexos industriais, destacando-se a indústria petroquímica. Os processos de biorremediação e biorremoção surgem como tecnologias inovadoras e apresentam resultados satisfatórios na remoção dos compostos derivados de petróleo, metais pesados, entre outros poluentes (Hua *et al.* 2003; Queiroga *et al.* 2003; Dubey & Juwarkar 2001).

Os biossurfactantes, apesar da diversidade de aplicações industriais, ainda não são amplamente utilizados devido aos altos custos de produção associados a métodos ineficientes de recuperação do produto e ao uso de substratos caros. O problema econômico da produção de biossurfactantes, no entanto, pode ser significativamente reduzido através do uso de fontes alternativas de nutrientes facilmente disponíveis e de baixo custo, como o efluente da indústria de óleo de oliva, resíduos de óleo lubrificantes e óleos vegetais domésticos (Mercade *et al.* 1993; Mercade *et al.* 1996; Vollbrecht *et al.* 1999; Deleu & Paquot 2004).

A literatura descreve um grande número de fontes de carbono, incluindo rejeitos agrícolas, como açúcares e óleos, como substratos atrativos para a produção de biossurfactantes com potencial de aplicação industrial e ambiental (Lang *et al.* 1989; Gallert 2002). Altos rendimentos em produtos têm sido obtidos através da combinação entre um óleo vegetal e um carboidrato como substratos (Zhou & Kosaric 1993).

Entre as leveduras, espécies de *Candida* têm sido largamente empregadas na produção de biossurfactantes a partir de fontes de carbono solúveis e insolúveis (Sarubbo *et al.* 1997; 1999). Neste trabalho a produção de biossurfactantes por uma nova linhagem de *Candida glabrata* foi obtida utilizando óleo de algodão, glicose e extrato de levedura como substratos. O isolamento, a caracterização e aplicação do biopolímero também foram realizados.

Materiais e métodos

Microorganismo

Candida glabrata (Anderson) Meyer & Yarrow (UCP 1002), levedura isolada de sedimento de mangue, coletada no Município de Rio Formoso, Estado de Pernambuco, Brasil, (NASCIMENTO et al. 2000) e depositada no Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco foi utilizada como microrganismo produtor de biossurfactante. A cultura foi mantida a 5°C no meio Yeast Mold Agar (YMA), com a seguinte composição (p/v): extrato de levedura (0.3%), extrato de malte (0.3%), triptona (0.5%), D-glicose (1%) e ágar (5%). Repiques foram mensalmente realizados para manter a viabilidade celular.

Meio de produção

As culturas foram crescidas em meio mineral contendo NH_4NO_3 (0,1%), KH_2PO_4 (0,01%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5%), FeCl_3 (0,01%), NaCl (0,01%) e uréia (0,1%). Os ingredientes foram dissolvidos e o meio esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos, sendo o pH final de 5,7.

Substratos

Óleo de algodão, de padrão alimentar (Bunge Alimentos S.A; SC-Brasil), glicose (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) e extrato de levedura (Oxoid) foram utilizados como substratos e adicionados ao meio de produção segundo as condições estabelecidas pelo planejamento fatorial.

Planejamento Fatorial

Inicialmente, realizou-se um planejamento fatorial completo 2^3 com 4 pontos centrais para analisar os efeitos principais e interações das variáveis concentrações de óleo de algodão, glicose e extrato de levedura sobre a variável resposta atividade de emulsificação. A matriz do planejamento codificada e os valores das variáveis independentes nos níveis -1 e +1 e no ponto central encontram-se especificados na Tabela 1. A análise dos resultados foi realizada utilizando o programa STATISTIC versão 6.0 da Statsoft, USA.

Determinação da velocidade máxima de crescimento (μ_{max}) e tempo de geração (T_G)

A velocidade máxima de crescimento (μ_{max}) e o tempo de geração (T_G) foram determinados de acordo com Pirt (1975).

Produção dos biossurfactantes

Os cultivos para produção dos biossurfactantes foram realizadas em frascos Erlenmeyer com 1000mL de capacidade contendo 300mL do meio de produção e inoculados com 3mL da suspensão contendo 10^7 células/mL. Os frascos foram mantidos sob agitação orbital de 150 rpm durante 144 horas, à temperatura de 27°C. Alíquotas de 4 mL, em duplicata, foram coletadas de 6 em 6 horas nas primeiras 24 horas de cultivo e, em seguida, a cada 24 horas até o período de 144 horas, sendo utilizadas para as seguintes determinações: cinética de crescimento, determinação do pH e atividade de emulsificação.

Determinação da atividade de emulsificação

Para a determinação da atividade de emulsificação, as amostras retiradas do meio de cultivo ao longo da fermentação foram centrifugadas 10000 x g durante 15 minutos e, em seguida, analisadas conforme descrito por Cooper e Goldenberg (1987). 1,0 mL de n-hexadecano foi

adicionado a 2,0 mL do líquido metabólico em tubo graduado e a mistura agitada em vortex por 1 minuto. A estabilidade da emulsão foi determinada após 24 horas e o índice de Emulsificação foi calculado dividindo-se a altura da emulsão pela altura total da mistura e multiplicando-se por 100 para fornecer o percentual da emulsão formada no tubo.

Determinação da estabilidade do biossurfactante

A estabilidade do biossurfactante produzido na condição selecionada a partir do planejamento fatorial foi avaliada através da determinação da tensão superficial do líquido metabólico livre de células frente a diferentes temperaturas (4, 27 e 80 °C), por 10 minutos, diferente pH's (2, 4, 6, 8, 10 e 12) e diferentes concentrações de NaCl (2, 4, 6, 8 e 10%). Os ensaios foram realizados em triplicada.

Isolamento do biossurfactante

Após 144 horas de cultivo de *Candida glabrata*, o líquido metabólico foi mantido sob refrigeração durante 24 horas para sedimentação das células, sendo centrifugado a 10000 x g durante 15 minutos a 28°C. Em seguida, o líquido metabólico foi filtrado papel Whatman Nº 1 e concentrado por liofilização e ressuspendido em água destilada para 1/5 do volume inicial. A extração foi realizada utilizando clorofórmio 1:1 (v/v) à temperatura de 27°C. A fase aquosa foi extraída por três vezes e o produto da extração foi liofilizado. O biopolímero obtido da fase orgânica foi evaporado com rotoevaporador à temperatura de 80°C, lavado com n-hexano e mantido em dessecador até peso constante (Cirigliano & Carman 1985). O rendimento do produto isolado foi calculado em g/L e o biossurfactante caracterizado através da determinação da tensão superficial, da CMC e composição química preliminar.

Determinação da tensão superficial e da concentração micelar crítica (CMC)

A tensão superficial e a CMC foram medidas de acordo com a metodologia descrita por Kuyukina et al. (2001), em tensiômetro automático (Modelo Sigma 70, KSV Ltd., Finland) utilizando o anel de NUOY. A CMC foi determinada, partindo-se de uma solução de concentração conhecida do biossurfactante isolado.

Composição química do biossurfactante

A concentração de proteína do biossurfactante isolado foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951), usando albumina bovina como padrão. Os carboidratos foram determinados pelo método ácido fenol-sulfúrico, usando D-glicose como padrão (Hanson *et al.* 1981) e os lipídios quantificados de acordo com Manocha *et al.* (1980).

Aplicação do biossurfactante na remoção de óleo motor de areia contaminada

A remoção de óleo de motor da areia foi realizada utilizando-se 60g de areia de praia impregnada com 5 mL do óleo. Frações de 20 g da areia contaminada foram transferidas para Erlenmeyers de 250 mL de capacidade, os quais foram submetidos aos seguintes tratamentos: a- adição de 60 mL de água destilada (controle), b- adição de 60 mL de solução aquosa do biossurfactante isolado a 1,5% e c- adição de 60 mL de solução aquosa do biossurfactante isolado a 2,5%. Os frascos foram submetidos à agitação de 150 rpm por 24 horas, a 27°C e, em seguida, centrifugados a 10000 x g por 5 minutos para separação da solução de lavagem e da areia. A quantidade de óleo removido foi determinada na areia lavada por gravimetria após extração do mesmo com hexano, sendo expressa em percentagem (Nistschke & Pastore 2002).

Resultados e discussão

Os meios utilizados na produção de biossurfactantes por leveduras normalmente incluem três nutrientes: um carboidrato, usualmente a glicose, um óleo vegetal e o extrato de levedura. Cada um destes componentes exerce uma função específica no processo de obtenção do biopolímero (Garcia-Ochoa *et al.* 1999). O carboidrato é consumido para crescimento da biomassa e produção do surfactante. A glicose é assimilada durante o crescimento da levedura até uma outra fonte essencial, normalmente a fonte de nitrogênio, ser esgotada, sendo importante também na produção do polímero. O óleo vegetal, por sua vez, é utilizado na produção do biossurfactante. A produção ocorre através da utilização dos ácidos graxos obtidos dos triglicerídeos do óleo, enquanto que o glicerol liberado deve ser utilizado para manutenção da energia. O extrato de levedura contém nitrogênio, fosfato e oligoelementos requeridos para o crescimento da levedura e produção do biossurfactante, sendo, conseqüentemente, importante para aumentar as concentrações de biomassa e surfactante (Casas 1996).

Perfil de crescimento de Candida glabrata

As figuras de 1 a 3 apresentam o perfil de crescimento de *C. glabrata*, acompanhado através da atividade de emulsificação e do pH obtidos para os cultivos em óleo de algodão e glicose e extrato de levedura como substratos, segundo o planejamento fatorial.

As cinéticas de crescimento da *C. glabrata* (figuras 1 e 2) demonstraram um perfil de diauxia. A presença de glicose nos cultivos de *C. glabrata* foi um fator determinante da acidez do meio já que, em sua presença, houve uma redução no pH (Figuras 1C, 2A, 3A, 3B e 3C), o qual atingiu valores estáveis em torno de 3,0, no início da fase estacionária de crescimento, provavelmente pela produção de ácidos orgânicos. Por outro lado, na ausência de glicose

(Figuras 1A, 1B, 2B e 2C) observou-se um grande aumento do pH nas primeiras horas do cultivo, o qual atingiu valores próximos a 8,0, com estabilização em torno de 7,0 até o final das 144 horas de fermentação.

A cinética de produção de atividade de emulsificação demonstrou que *C. glabrata* não foi capaz de emulsificar efetivamente o n-hexadecano nos meios sem glicose (Figuras 1A, 1B, 2B e 2C). Nos meios contendo 5 e 10% de óleo de algodão, 10% de glicose e 0,4 % de extrato de levedura (Figuras 2A, 3A e 3B) observaram-se dois picos de atividade de emulsificação, sendo o primeiro no início da fase estacionária de crescimento, por volta de 24 horas e o segundo por volta das 120 horas de cultivo. As condições de cultivo que representam o ponto central do planejamento fatorial, ilustradas na Figura 3C, apresentaram resultados similares aos obtidos nas Figuras 3A e 3B, no que se refere à emulsificação do n-hexadecano.

*Seleção do biossurfactante com maior capacidade de emulsificação em função do planejamento experimental*³⁰

A Tabela 1 mostra os experimentos codificados e o resultado da variável resposta índice de emulsificação com 96 horas usando n-hexadecano. No diagrama de Pareto de efeitos padronizados (Figura 4) pode-se observar que, para um nível de confiança de 95%, apenas a variável independente concentração de glicose produziu efeito positivo e estatisticamente significativo sobre o aumento do índice de emulsificação do n-hexadecano com 96 h. As variáveis concentrações óleo de algodão e extrato de levedura mostrou, embora não significativamente do ponto de vista estatístico, ter influência negativa sobre o índice de emulsificação do n-hexadecano.

Foi possível selecionar a condição do ponto central contendo (7,5% de óleo de algodão, 5% de glicose e 0,3% de extrato de levedura), para a emulsificação do n-hexadecano, considerando o melhor valor de atividade de emulsificação (66%) após 96 horas de cultivo

(Tabela 1). A curva de crescimento de *C. glabrata* nesta condição (Figura 3C) demonstrou que a máxima concentração celular foi atingida após 72 horas de cultivo. Após 48 horas de crescimento, um perfil de diauxia foi observado. A velocidade máxima de crescimento da levedura foi de $0,69 \text{ h}^{-1}$ com um tempo de geração de 1,0 h.

Propriedades do biossurfactante selecionado

A estabilidade do biossurfactante foi avaliada no líquido metabólico livre de células após 144 horas de cultivo quanto a diferentes valores de pH, temperatura e concentrações crescentes de NaCl em função da tensão superficial do biopolímero (Figura 5).

Os testes realizados no líquido metabólico livre de células, com relação à variação do pH, demonstraram uma estabilidade efetiva da tensão superficial (Figura 5A). De acordo com Kim e colaboradores (2000), as tensões superficiais do biossurfactante de *Nocardia sp.* L-417 foram mantidas em todos os valores de pH testados (de 2 a 12), indicando que a variação do pH também não teve efeito significativo sobre a tensão superficial.

Estudos realizados anteriormente para o biossurfactante da *C. glabrata* UCP1002 produzido no mesmo meio e nas mesmas condições desse trabalho demonstraram que a variação do pH não exerceu grande influência sobre a capacidade de emulsificação do líquido metabólico, embora um aumento tenha sido observado no pH 12 para a emulsificação do óleo de algodão. Os autores sugerem que a redução da capacidade surfactante do biossurfactante tenha ocorrido com o aumento da ionização (Sarubbo *et al. in press*). A atividade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* também foi estável a diferentes valores de pH (Makkar & Cameotra 1998), embora a efetividade do liposan de *Candida lipolytica* como emulsificante tenha sido limitada à faixa de pH ácido (Cirigliano & Carman 1984).

A tensão superficial no líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante mostrou-se estável, independente da concentração de sal adicionada (Figura 5 B). Estudos

realizados por Desai e Banat (1997) demonstraram que concentrações acima de 2% de NaCl são suficientes para inativar o surfactante sintético.

A adição de 10% de NaCl ao líquido metabólico livre de células do biossurfactante de *C. glabrata* UCP1002 provocou redução de aproximadamente 20% na atividade de hexadecano, mostrando tolerância da emulsão a elevadas concentrações de sal (Sarubbo *et al. in press*). Também foram observadas reduções na atividade de emulsificação do surfactante de *C. lipolytica* cultivada em n-hexadecano e em culturas mistas suplementadas com melaço (Ghurye *et al.* 1994).

Com relação à influência da temperatura sobre a tensão superficial do líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante (Figura 5C), observou-se que a mesma permaneceu estável frente às temperaturas estudadas. Os resultados obtidos por Brown e colaboradores (1991) para o biossurfactante produzido pela bactéria designada como isolado 1165 demonstrou uma redução da tensão superficial no líquido metabólico livre de células quando submetido à temperatura entre (0 °C e 4°C), embora quando exposta a temperaturas elevadas (100 e 120 °C) tenha apresentado valores estáveis de tensões entre 30,5mN/m e 31,8. Markkar e Cameotra (2002) observaram a estabilidade da tensão superficial após a exposição do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* a temperatura de 100°C.

A variação da temperatura também não exerceu grande influência na capacidade de emulsificação do líquido metabólico livre de células do biossurfactante de *C. glabrata* UCP1002 (Sarubbo *et al. in press*). A capacidade de emulsificação do liposan de *Candida lipolytica* demonstrou relativa estabilidade entre 30 e 90°C, embora 60% de sua atividade tenha sido perdida após 1 hora a 100 °C (Soon *et al.* 2004).

É importante ressaltar que os resultados obtidos nesse trabalho para as propriedades do biossurfactante de *Candida glabrata* UCP1002 foram comparados aos achados da literatura para surfactantes de bactérias, uma vez que os trabalhos que descrevem a estabilidade da tensão superficial de surfactantes de leveduras são escassos.

Isolamento do biossurfactante selecionado

O biossurfactante foi isolado do filtrado de *C. glabrata* após 144 horas de cultivo. O precipitado coletado na fase aquosa recuperou 100% da atividade de emulsificação em n-hexadecano. As emulsões formadas pelo biossurfactante isolado permaneceram estáveis por mais de quatro semanas. O rendimento do precipitado obtido na fase aquosa foi de aproximadamente 10,0 g/L. O rendimento de produção do biossurfactante de *C. utilis* variou de 0,26 a 0,93 g/L em função das condições do processo fermentativo, enquanto que o rendimento do agente emulsificante extracelular de *Curvularia lunata* foi de 2,6 g/L (Paraszkiewicz *et al.* 2002).

Tensão superficial e concentração micelar crítica (CMC) do biossurfactante

A presença de um surfactante reduz a tensão superficial ar/água, sendo este efeito proporcional à concentração do biossurfactante em solução, até se atingir a CMC (Ron & Ronsengerg 2001). De acordo com a Figura 6, a CMC do biossurfactante de *C. glabrata* foi de aproximadamente 25g/l e a tensão superficial nesse ponto foi de 31 mN/m. Este valor de tensão é semelhante aos valores relatados para outros biossurfactantes produzidos por leveduras cultivadas em óleos vegetais e carboidratos como substratos (Davila *et al.* 1992; Marin 1996).

Composição química do biossurfactante

A biossíntese de biossurfactantes por um grande variedade de bactérias e leveduras tem sido reportada (Daniel *et al.* 1998; Lang *et al.* 1989) envolvendo geralmente raminolipídeos e lipídios sulfurosos (Zhou & Kosaric 1995). A análise preliminar do biossurfactante isolado a partir do cultivo de *C. glabrata* em óleo de algodão, glicose e extrato de levedura como substratos indicou a presença de 45% de proteínas, 20% de lipídios e 10% de carboidratos. Liposan, um emulsificante produzido por *C. lipolytica* é composto por 93% de carboidratos e 7% de proteínas (Cirigliano & Carman 1985). Outros polímeros emulsificantes contendo proteínas, carboidratos e lipídios também foram produzidos por *C. lipolytica* quando cultivada em óleo vegetal de babaçu e glicose como fontes de carbono (Sarubbo *et al.* 1999).

Aplicação do biossurfactante na remoção de óleo

A Tabela 2 ilustra a remoção do óleo de motor pela solução do biossurfactante. Os resultados obtidos demonstraram que o biossurfactante a 2,5% de concentração, ou seja, na sua CMC, foi capaz de remover 84% do óleo contido na areia, enquanto que a água destilada removeu 56% do óleo contaminado. Estudos realizados por Abu-Ruwaida *et al.* (1991) demonstraram que o líquido metabólico contendo o biossurfactante produzido por um isolado bacteriano foi capaz de recuperar 86% de óleo residual bruto, enquanto que a água destilada removeu cerca de 65% do óleo. Cameotra e Makkar (1998) demonstraram que o biossurfactante isolado de *Pseudomonas aeruginosa* foi capaz de recuperar 56% do óleo adsorvido em areia contida em coluna.

Agradecimentos

Os autores agradecem às agências financiadoras CNPq, FINEP e PRONEX e a UNICAP, pelo uso de suas instalações.

Referências

- Abu-Ruwaida, A.S.; Banat, I.M.; Haditirto, S.; Salem, A. & Kadri, M. 1991. Isolation of biosurfactant-producing bacteria-Product characterization, and evolution. *Acta Biotechnologica*, Berlin **2**, 315-324.
- Brown, M.J. 1991. Biosurfactants for cosmetic applications. *International Journal of Cosmetic Science* **13**, 61-64.
- Casas, J.A. 1996. Producción de soforolípidos por *Candida bombicola*. Tese PhD - Universidad Complutense, Madri.
- Cameotra, S.S. & Makkar, R.S. 1998. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology* **50**, 520-529.
- Cirigliano, M.C. & Carman, G. M. 1985. Purification and characterization of liposan a bioemulsier from *Candida lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington **50**, 846-850.
- Cirigliano, M.C. & Carman, G.M. 1984. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*. **48**, 747-750.
- Cooper, D.G. & Goldenberg, B.G. 1987. Surface active agents from two *Bacillus* species. *Applied Enviromental Microbiology*. **53**, 224-229.
- Davila, A.M; Marchal, R. & Vandecastele, J. P. 1992. Kinetics and balance of a fermentation free from product inhibition: sophorose lipid production by *Candida bombicola*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **38** 6-11.

- Desai J.D. & Banat, I.M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbial Molecular Reviews*. **61**, 47-64.
- Deleu, M. & Paquot, M. 2004. From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants *Comptes Rendus Chimie*. (article in press).
- Dubey, K. & Juwarkar, A. 2001. Destillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactants production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **17**, 61-69.
- Garcia-Ochoa, F. & Casas, J.A. 1999. Unstructured kinetic model for sophorolipid production by *Candida bombicola*. *Enzyme and Microbial Technology*. **25**, 613-621.
- Gallert, C. & Winter, J. 2002. Solid and liquid residues as raw materials for biotechnology. *Zeitschrift fur Naturforschung* **89**, 483-496.
- Gerson, D. F. 1993. Biosurfactants: production - properties - applications. In: *Biotechnology*.
- Ghurye, G. L.; Vipulananda, C. & Wilson, R. C. A. 1994. Practical approach to biosurfactant production using nonaseptic fermentation of mixed cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. **44**, 661 – 666.
- Hanson, R.S.; Phillips, J.A. & Gherhardt, P. 1981. *Manual of Methods for General Bacteriology*, American Society for Microbiology, Washington, DC. 328-364.
- Hua, Z.; Chen, J.; Lun, S. & Wang, X. 2003. Influence of biosurfactants produced by *Candida antarctica* on surface properties of microorganism and biodegradation of n-alkanes. *Water Research*. **37**, 4143 - 4150.
- Kim, S.H.; Lim, E.J.; Lee, S.O.; Lee, J.D. & Lee, T.H. 2000. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia sp.* L - 417. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. **31**, 249-253.
- Kuyukina, M.S.; Ivshina, I.B.; Philp, J.C.; Christofi, N.; Dunbar, S.A. & Ritchkova, M.I. 2001. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. *Journal of Microbiological Methods*. **46**, 109-120.

- Lang, S.; Katsiwala, E. & Wagner F. 1989. Antimicrobial effects of biosurfactants. *Fat Science and Technology*. **9**, 363-366
- Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L. & Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. **193**, 265-275.
- Manocha, M.S.; San-Blas, G. & Centeno, S. 1980. Lipid composition of *Paracoccidioides brasilienses*: possible correlation with virulence of different strains. *Journal of General Microbiology* 117, 147-154
- Makkar, R.S & Cameotra, S.S. 1998. Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. *Journal of Microbiology & Biotechnology* 20, 48-52
- Makkar, R.S. & Cameotra, S.S. 2002. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Applied and Environmental Microbiology*. **58**, 428
- Marín, M. & Pedregosa, A . 1996. International. *Biodeterioration and Biodegradation*. 69-75.
- Mercadé., M.E., Moneon, L., de Andes, C., Rondon, I., Martinez, E., Espuny, M.J. & Manresa, A. 1996. Screening and selection of surfactant- producing bacteria from waste lubricating oil. *Journal applied Bacteriology* **8**, 161-168.
- Mercade, M.E.; Manresa, M.A.; Robert, M.; Espuny, C. & Guinea, J. 1993. Olive oil mill effluent (OOME) new substrate for biosurfactant production. *Bioresource Technology*. **43**, 1-6.
- Nascimento, R.M.L; Pimentel, A. C.M.; Araújo, S.F.S.; Okada, k.; Nascimento, A.E.; Alves da Silva.; C.A & Campos Takaki, G.M. 2000. *Symposium* 56-59.
- Nitschke, M. & Pastore, G. M. 2002. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. *Química Nova*. **25**, 772-776.

- Pareilleux, A. 1979. Hydrocarbon assimilation by *Candida lipolytica*: formation of a biosurfactant, effects on respiratory activity and growth. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin. **8**, 91-101
- Paraszkiewicz, K.; Kanwal, A. & Dlugonski, J. 2002. Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization. Journal of Biotechnology. **92**, 287-294
- Pirt, S. J. 1975. Principles of microbe and cell cultivation. London: Blackwell Scientific. 214-215.
- Queiroga, C.L; Nascimento, L.R. & Serra, G.E. 2003. Evaluation of paraffins biodegradation and biosurfactant production by *Bacillus subtilis* in the presence of crude oil. Brazilian Journal of Microbiology **34**, 1321-324
- Rahman, K.S.M.; Rahman, T.J.; Kourkoutas, Y.; Petsas, I.; Marchant, R & Banat, I.M.2003. Enhanced bioremediation of n- alkanes in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. Bioresource Technology. **90**, 159-168
- Ron, E.Z. & Rosenberg, E. 2001. Natural roles of biosurfactants, Zeitschrift fur Naturforschung. **3**, 229-236.
- Sarubbo, L.A.; Marcel M.C.R. & Campos-Takai G.M. 1997. Comparative study on bioemulsifiers produced by *Candida lipolytica* strains. Arq Biol Tecnol. **40**, 707-720.
- Sarubbo, L. A.; Porto, A.L.F. & Campos-Takaki, G.M. 1999. The use of babassu oil as substrate to produce bioemulsifiers by *Candida lipolytica*. Canadian Journal of Microbiology. **45**, 423-426.
- Sarubbo, L. A.; Luna, J.M. & Campos-Takaki, G.M. Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of *Candida glabrata* UCP 1002. Electronic Journal of Biotechnology. In press.

- Soon, E.L.; Salleh, A.B.; Basri, M.; Rahman, R.N. & Kamaruddin, K. 2004. Response surface methodological study on lipase-catalyze synthesis of amino acid surfactants. *Process Biochemistry* **39**, 1511-1518.
- Vollbrecht E.; Rau U. & Lang S. 1999. Microbial conversion of vegetable oils into surface-active di-, tri-, and tetrasaccharide lipids (biosurfactants) by the bacterial strain *Tsukamurella* spec. *Fett/Lipid* **101**, 389-394.
- Zhou, Q. H. & Kosaric, N. 1993. Effect of lactose and olive oil on intra- and extracellular lipids of *Torulopsis bombicola*. *Biotechnology Letters* **15**, 477-482.
- Zhou, Q.H. & N. Kosaric. 1995. Utilization of Canola Oil and lactose to produce biosurfactant with *Candida bombicola*. *Journal of American Oil and Chemistry Society*. **72**, p. 67-71.

Figura 1. Curvas de crescimento de *Candida glabrata*, pH e atividade de emulsificação em n-hexadecano. (A) Crescimento em 5% do óleo de algodão e 0,2% do extrato de levedura; (B) Crescimento em 10% do óleo de algodão e 0,2% do extrato de levedura; (C) Crescimento em 5% de óleo de algodão, 10% de glicose e 0,2% de extrato de levedura

Figura 2. Curvas de crescimento de *Candida glabrata*, pH e atividade de emulsificação em n-hexadecano. (A) Crescimento em 10% de óleo de algodão, 10% de glicose e 0,4% de extrato de levedura; (B) Crescimento em 5% de óleo de algodão e 0,4% de extrato de levedura; (C) Crescimento em 10% de óleo de algodão e 0,4% de extrato de levedura

Figura 3. Curvas de crescimento de *Candida glabrata*, pH e atividade de emulsificação em n-hexadecano. (A) Crescimento em 5% de óleo de algodão, 10% de glicose e 0,4% de extrato de levedura; (B) Crescimento em 10% de óleo de algodão, 10% de glicose e 0,4% de extrato de levedura; (C) Crescimento em 7, 5% de óleo de algodão 5% de glicose e 0,3% de extrato de levedura

Figura 4. Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis utilizadas sobre o índice de emulsificação do surfactante produzido por *Candida glabrata* com 96 h usando n- hexadecano

Figura 5. Estabilidade do biossurfactante determinada através da tensão superficial do líquido metabólico livre de células de *Candida glabrata* cultivada em meio mineral contendo 7,5 % de óleo de algodão, 5 % de glicose e 0,3% de extrato de levedura: (A) diferentes valores pH; (B) diferentes concentrações de NaCl e (C) diferentes temperaturas

Figura 6. Determinação da concentração micelar crítica (CMC) do biossurfactante isolado de *Candida glabrata* cultivada em meio mineral contendo 7,5 % de óleo de algodão, 5 % de glicose e 0,3% de extrato de levedura na redução da tensão superficial

Tabela 1. Valores das variáveis independentes do planejamento fatorial nos níveis -1, +1 e no ponto central. Variável resposta: atividade de emulsificação após 96 horas de cultivo

Condição	Óleo de algodão	Glicose	Extrato de levedura	Emulsificação do Hexadecano (%) (96h)
1	-1	-1	-1	0,000
2	+1	-1	-1	0,000
3	-1	+1	-1	65,000
4	+1	+1	-1	53,000
5	-1	-1	+1	0,000
6	+1	-1	+1	0,000
7	-1	+1	+1	65,000
8	+1	+1	+1	50,000
9	0	0	0	66,000
10	0	0	0	66,000
11	0	0	0	66,000
12	0	0	0	66,000

As variáveis utilizadas foram codificadas com os seguintes valores: óleo de algodão, 5% (-1) e 10% (+1); glicose, 0% (-1) e 10% (+1); extrato de levedura 0,2% (-1) e 0,4% (+1). Os valores dos pontos centrais foram: óleo de algodão, 7,5%; glicose 5%; extrato de levedura 0,3%.

Tabela 2. Remoção de óleo de motor presente em areia pelo biossurfactante isolado de Candida glabrata UCP 1002

Tratamentos	Óleo remanescente (%)	Óleo removido (%)
Água destilada	43,7	56,3
Solução aquosa de biossurfactante a 1,5%	36,4	63,6
Solução aquosa de biossurfactante a 2,5%	16,2	84

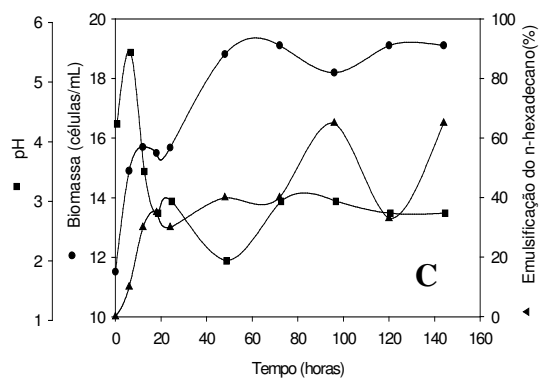
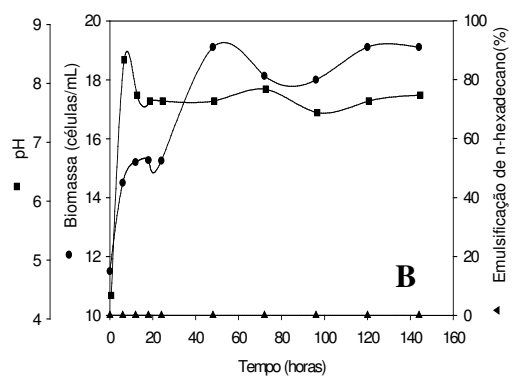
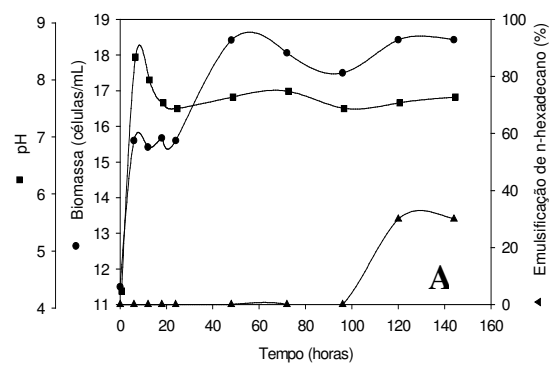


Figura 1

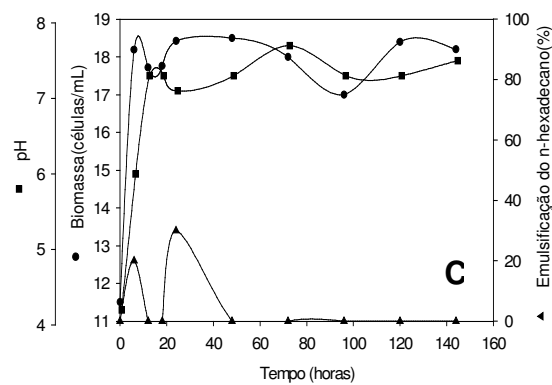
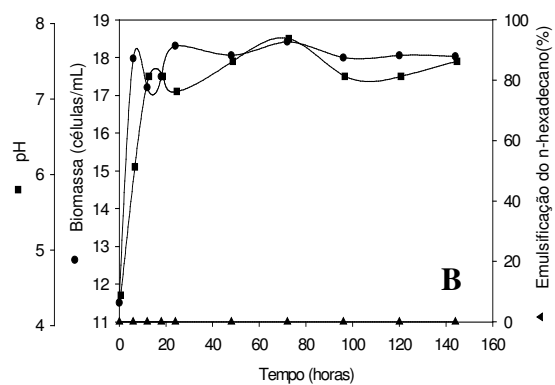
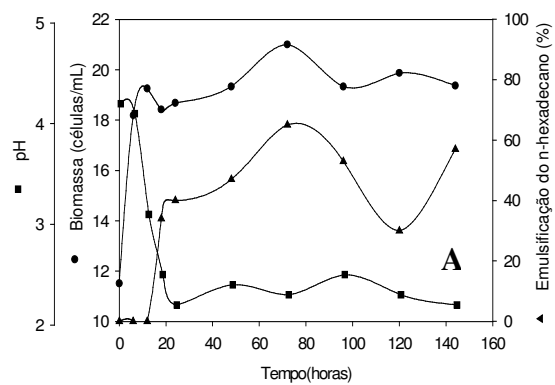


Figura 2

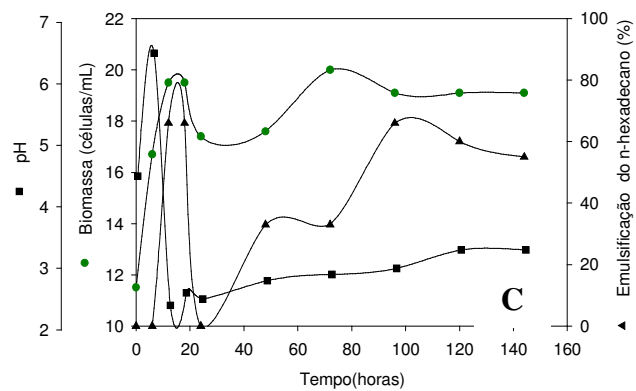
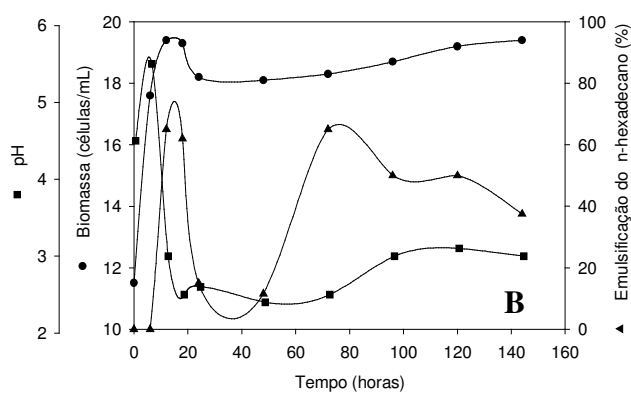
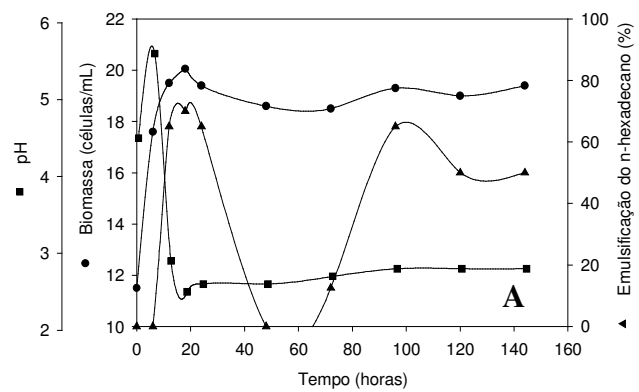


Figura 3

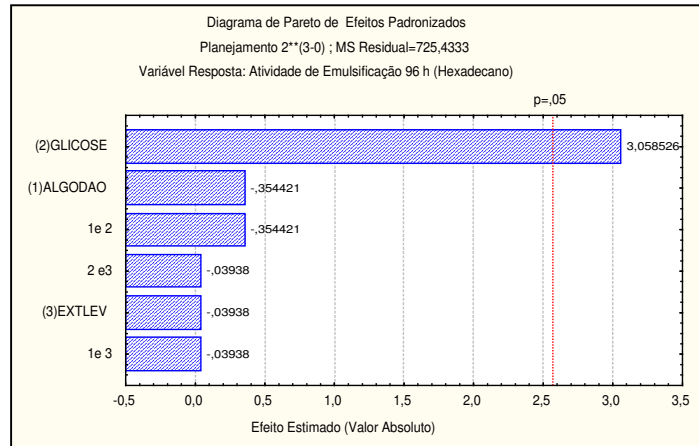


Figura 4

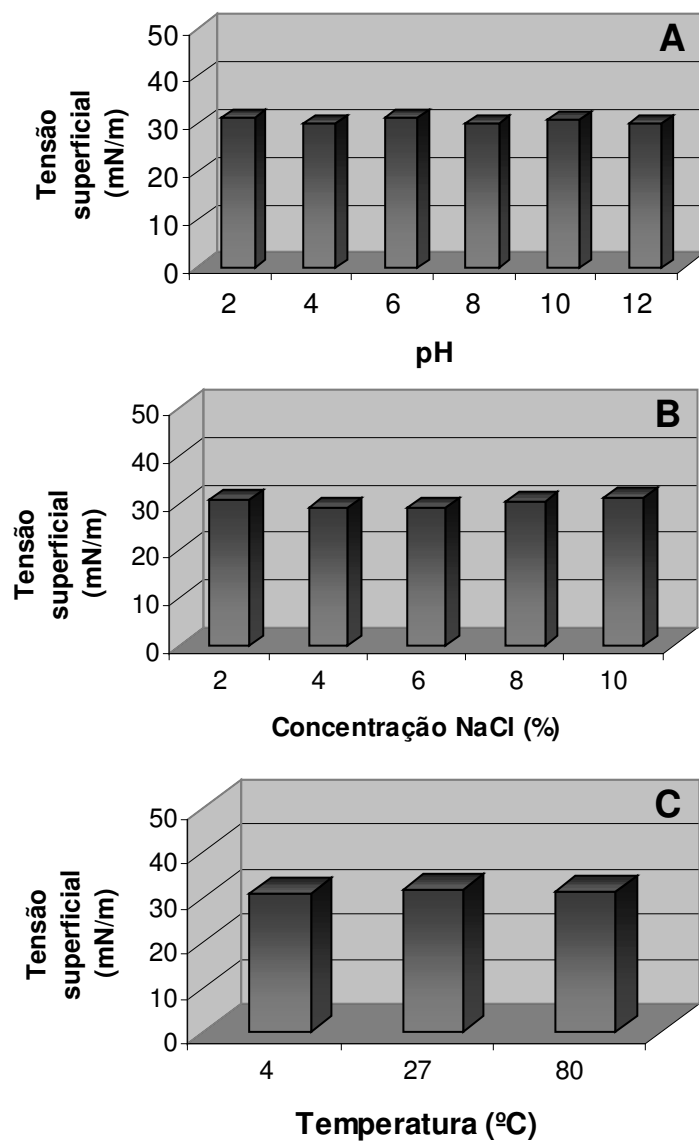


Figura 5

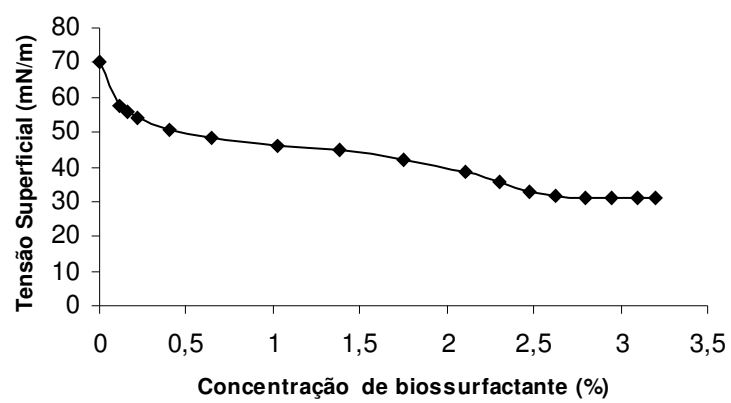


Figura 6

6 . CONCLUSÕES GERAIS

Os estudos realizados com uma nova linhagem de *Candida glabrata* apresentam as seguintes conclusões:

- Todas as curvas de crescimento estudadas no planejamento fatorial apresentaram fenômeno de diauxia;
- A nova linhagem de *Candida glabrata* (UCP 1002) isolada de mangue apresenta grande potencial como microrganismo produtor de compostos com atividade emulsificante e surfactante;
- Dentre as variáveis utilizadas como substratos, glicose, óleo de algodão e extrato de levedura, apenas a glicose apresenta efeito significativo do ponto de vista estatístico na produção do biossurfactante;
- A redução da tensão superficial ocorre simultaneamente com a maior produção do biossurfactante;
- O biopolímero presente no líquido metabólico mantém-se estável quando submetido a condições extremas de pH, temperatura e diferentes concentrações de NaCl;
- O biossurfactante é isolado em grande quantidade, considerando os experimentos em batelada;
- O biossurfactante isolado apresenta potencial de aplicação na biorremediação de areia contaminada com óleo motor;
- O biossurfactante isolado é pertencente ao grupo dos heteropolímeros.

ANEXOS

Parte dos resultados contidos neste trabalho submetidos para publicação e apresentados em Congresso:

LUNA, J.M.; FARIAS, C.B.B.; RUFINO, R.D.; SARUBBO, L.A. Propriedades emulsificantes do surfactante produzido por uma levedura isolada de mangue. IV Congresso Brasileiro de Micologia da Sociedade Brasileira de Micologia, 17 a 20 de Outubro de 2004, Ouro Preto, MG. Anais, p. 88-88, 2004.

LUNA, J.M.; FARIAS, C.B.B.; SARUBBO, L.A. Produção de biopolímero com atividade surfactante por *Candida glabrata*. IX Encontro Nacional em Microbiologia Ambiental, 16 a 19 de novembro de 2004, Curitiba-PR. Anais, p. 69-69, 2004.

LUNA, J.M.; SARUBBO, L.A. Produção de biossurfactantes por *Candida glabrata* utilizando óleo de algodão como substrato. II Semana de Integração Universidade-Sociedade, 2004, Universidade Católica de Pernambuco, Recife-PE. p. 805-808, 2004.

LUNA, J.M.; RUFINO, R.D.; SARUBBO, L.A. CAMPOS-TAKAKI, G.M. Produção de surfactantes por *Candida glabrata* em meio de baixo custo. XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 22 a 25 de novembro, Santos, SP, 2005.

LUNA, J.M.; RUFINO, R.D.; GUSMÃO, C.A.B.; SARUBBO, L.A. Produção de biossurfactantes por *Candida glabrata* utilizando óleo de algodão como substrato. XV Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2 a 5 de agosto, Recife, PE, 2005.

**Manuscrito aceito para publicação no Eletronic Journal of
Biotechnology**

**Production and stability studies of the bioemulsifier obtained
from a new strain of *Candida glabrata* UCP 1002**

Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of *Candida glabrata* UCP 1002

Leonie Asfora Sarubbo

Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB)

Departamento de Química

Universidade Católica de Pernambuco

Rua Nunes Machado, n.42, Bl J, Boa Vista, Recife-PE, Brasil CEP: 50050-590

Tel.: +55-81-21194017; Fax Number: +55-81-21194043

E-mail: leonie@unicap.br

Juliana Moura de Luna

Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB)

Mestrado em Ciências Biológicas

Centro de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Pernambuco

Av, Prof. Moraes Rêgo, s/n, Cidade Universitária, CEP: 50900-000, Recife-PE, Brasil

Galba Maria de Campos-Takaki*

Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB)

Departamento de Química

Universidade Católica de Pernambuco

Rua Nunes Machado, n.42, Bl J, Boa Vista, Recife-PE, Brasil CEP: 50050-590

Tel.: +55-81-21194017; Fax Number: +55-81-21194043

E-mail: takaki@unicap.br

Financial support: *the work was financed by Agência Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), Pernambuco, Brazil.*

Keywords: biosurfactant, *Candida*, emulsifier, glucose, fermentation, vegetal oil.

** Corresponding author*

Evaluation of both tenso-active and emulsifying activities indicated that a biosurfactant was produced by the newly isolated and promising strain *Candida glabrata* isolated from mangrove sediments. The extracellular water-soluble emulsifying agent was isolated and identified as a heteropolymer. The maximum of bioemulsifier production was observed when

the strain was grown on soluble and insoluble substrates cotton seed oil plus glucose, reaching values of 10.0 g/l after 144 hours at 200 rpm. The cell-free culture broth containing the examined agent lowered the surface tension of the medium to 31 mN/m. Stable and compact emulsions with emulsifying activity of 75 % of cotton seed oil were detected. The emulsification

**capacity remained practically unaltered within
a wide pH (2-12), temperature (4-80 °C) ranges
and under NaCl concentrations up to 10 %.**

Surfactants and emulsifiers are indispensable components of daily life. They are widely used in the pharmaceutical, cosmetic, petroleum and food industries (Lang, 2002; Makkar and Cameotra, 1998). The surfactant industry now exceeds US\$ 9 billion per year (Desai and Banat, 1997). Most of these compounds are of petroleum origin, which are not easily biodegradable and their manufacturing processes and by-products can be environmentally hazardous. Increased environmental awareness and strict legislation has made environmental compatibility of surfactants an important factor in their applications for various uses (Maier and Soberon-Chaves, 2000). Several different microbial products that exhibit surface-active properties have been identified in the past. These so called biosurfactants are produced by certain bacteria and by a number of yeasts and filamentous fungi. They include low-molecular-weight glycolipids, lipopeptides and high-molecular-weight lipid-containing polymers such as lipoproteins, lipopolysaccharide-protein complexes and polysaccharide-protein-fatty acid complexes (Ron and Rosenberg, 2000). Because biosurfactants are readily biodegradable and can be produced in large amounts by microorganisms and thus are not dependent on petroleum-derived products, they might well be able to replace, in some instances, the traditional synthetic surfactants (Banat et al. 2000).

The success of biosurfactant production depends on the development of cheaper processes and the use of low cost raw materials, which account for 10-30 % of the overall cost. Most oils and fats produced in the world are used in the food industry, which generates great quantities of wastes, tallow, lard, marine oils and free fatty acids from the extraction of seed oils (Makkar and Cameotra, 1998; 2002). The literature shows that a wide range of carbon sources, including agricultural renewable resources, like sugars and oils, are suitable carbon sources for production of ecologically safe biosurfactants with good properties. (Gallert and Winter, 2002). Optimal yields of bioemulsifier are usually obtained when carbohydrate and vegetable oil are used as substrate (Zhou and Kosaric, 1995).

Among yeasts, *Candida* species have been widely employed for insoluble substrates fermentation and have been reported to produce surface active agents (Sarubbo et al. 1999; 2001). The objective of this work is to investigate the production of a biosurfactant by *Candida glabrata* isolated from mangrove sediments and to show the capacity of the emulsifying agent in stabilizing water-in-oil emulsions.

MATERIALS AND METHODS

Organism

Candida glabrata UCP 1002 was isolated from mangrove sediment collected in the City of Rio Formoso, Pernambuco State, Brazil by Gomes et al. (2000). The isolation and identification of strain are according to O'Donnell (1979). The organism was kindly supplied from the Culture Collection of Nucleus of Resource in Environmental Sciences, Catholic University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil. The culture was maintained at 5°C on Yeast Mold Agar (YMA) slants containing (w/v): yeast extract (0.3 %), malt extract (0.3 %), tryptone (0.5 %), D-glucose (1 %) and agar (5 %). Transfers were made to fresh agar slants each month to maintain viability.

Reagents

n-Hexadecane was obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO); food grade cotton seed oil was kindly supplied from Bunge Alimentos S.A. (SC, Brasil). Other chemicals used were analytical grade.

Media and cultivation conditions

Cultures were grown on a mineral medium containing 0.1% NH₄NO₃, 0.02% KH₂PO₄, 0.02% MgSO₄.7H₂O, 0.3% yeast extract and 7.5 % cotton seed oil plus 5.0 % glucose as substrates. The final pH of the medium was 5.7.

The *Candida glabrata* was grown in solid medium at 27 °C for 48-72 hours; then, a loopful of the cream coloured culture was transferred to Erlenmeyer flasks of 250-ml containing 50-ml of the liquid medium, Yeast Mold Broth (CYM) and incubated for one day at 27 °C on an orbital shaker (200 rpm). The CYM culture contained 10⁴ cells/ml and was used to initiate growth in mineral medium using a 10% vol/vol inoculum. The production of the emulsifier was carried out in Erlenmeyer's

flasks of 500-ml containing 100 ml of the production medium and shaking at 200 rpm for 144 hours at 27 °C. The pH of the media was not adjusted during cultivation. Growth of the culture was monitored by counts on Neubauer Camera and plate Yeast Mold Agar. The fermentation's was monitored by aseptically removing of samples until the end of the experiment. All analyses were performed in triplicate and did not vary more than 5%.

Emulsification activity

Emulsification activity was measured using the method described by Cooper and Goldenberg (1987) whereby 6 ml of n-hexadecane or cotton seed oil was added to 4 ml of the culture broth free of cells in a graduated screwcap test tube and vortexed at 3000 rpm for 2 min. The emulsion stability was determined after 24 hours, and the emulsification index was calculated by dividing the measured height of the emulsion layer by the mixture's total height and multiplying by 100.

Efficiency studies

The efficiency of the biosurfactant as an emulsifying agent was measured on the cell-free broth. Variations between volumes of the oil phase (n-hexadecane or cotton seed oil) and aqueous phase were prepared for water in oil emulsions.

Stability studies

Stability studies were done using the cell-free broth obtained centrifuging the cultures at 10000 x g for 15 minutes. 4 ml of the culture broth free of cells were heated at 80 °C, and cooled to room temperature, after which the emulsification activity was measured. The emulsification capacity of culture broth free of cells was also determined after exposure at lower temperature (0-4°C). To study the pH stability of the cell-free broth, the pH of the cell-free broth was adjusted to different pH values (2 to 12) and the emulsification activity was measured. The culture liquid pH was adjusted with 1 M NaOH. The effect of NaCl concentrations (2 to 10 %) on the emulsification capacity of the culture broth free of cells was also determined.

Surface activities

Surface tension and critical micellar concentration (CMC) were determined on cell-free broth obtained by centrifuging the cultures at 10000 x g

for 15 minutes with a Tensiometer model Sigma 70 (KSV Instruments LTD - Finland) using the Du Nouy ring method at room temperature. The CMC was determined by measuring the surface tensions of dilutions of cell-free broth in distilled water up to a constant value of surface tension. Measurements of surface tension from distilled water and from the mineral medium were used as controls.

Isolation of biosurfactant

The 144-h culture was refrigerated for 24 h to solidify the remaining oil and to effect yeast settling. The culture was filtered through Whatman no. 1 filter paper and centrifuged at 10000 x g for 15 minutes. The cell-free broth was concentrated (500 ml) by freeze drying and extracted three times with chloroform (1:1, by vol.) in a separatory funnel at 28°C.

Analytical methods

Protein concentration in the isolated bioemulsifier was determined by the Lowry method (Lowry et al. 1951) using Bovine serum albumin as a standard. Carbohydrates were determined by the phenol-sulfuric acid method, using D-glucose as a standard (Hanson and Phillips, 1981). The lipid composition of the crude bioemulsifier was determined according to Manocha et al. (1980).

RESULTS AND DISCUSSION

Growth kinetics and extracellular bioemulsifier production

Figure 1 shows the biomass concentration, pH and emulsification index of *Candida glabrata* cultivation in mineral medium containing 7.5 % of cotton seed oil plus 5 % of glucose. Maximum biomass concentration was achieved after 72h. After 48h of growth, a diauxic behavior was observed, probably due to the consumption of other substrate used in the fermentation. During the exponential growth phase, culture medium pH gradually decreased from 5.7 to 2.6, after which it remained around 3.0. The profile of emulsification activity production was observed in three independently run fermentations. Emulsification of cotton seed oil increased with increasing biomass formation, reaching its optimum nearly at about 24h, and after 48h of growth it showed with constant values around 75 % until the end of

cultivation. Conversely, the emulsification of n-hexadecane started after the microorganism

entered the stationary growth phase, with maximum activity of 67 % after 96 hours of cultivation.

Bioemulsifier properties

For the measurements of surface tension of distilled water after different dilutions of the cell-free broth after 144h of cultivation, it was found that the emulsifier agent obtained from glucose plus cotton seed oil could lower the surface tension of water (air-water interface) from 68 mN/m to 31

mN/m (CMC), which shows that it is a good surfactant (Figure 2). This result is similar to others surfactants produced by yeast from carbohydrate and vegetal oil as substrates (Davila et al. 1992; Garcia-Ochoa and Casas, 1999; Zhou and Kosaric, 1995). The efficiency of the bioemulsifier containing cell-free broth is shown in Figure 3. The results showed that the biosurfactant form *Candida glabrata* was efficient in emulsifying the cotton seed oil once no significant variation in the emulsification index was observed for this substrate, however, for n-hexadecane emulsification, the reduction of cell-free broth volume decreased the emulsification capacity.

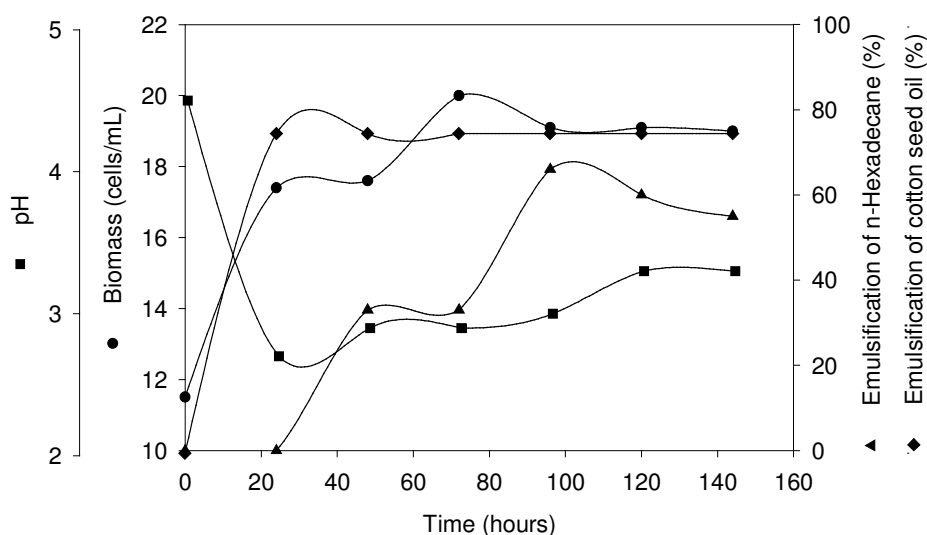


Figure 1. Time courses of growth, culture pH and emulsifications of n-hexadecane and cotton seed oil by *Candida glabrata* grown on mineral medium supplemented with 7.5 % cotton seed oil plus 5.0 % glucose

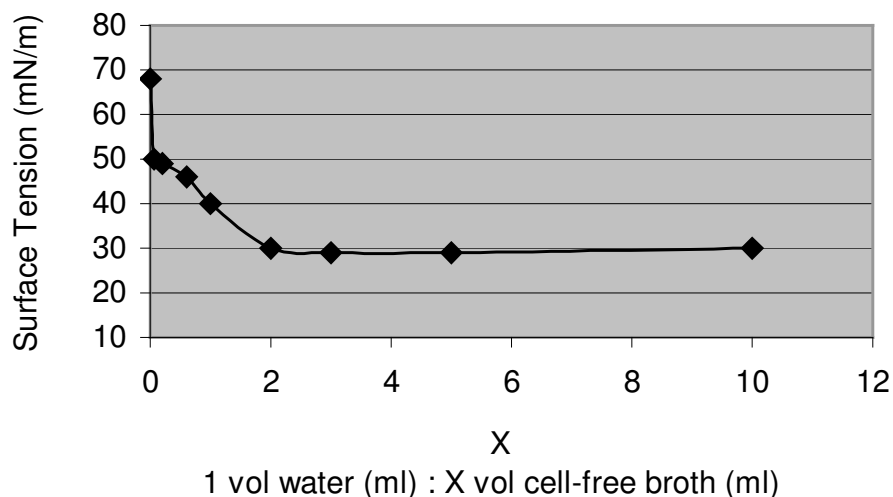


Figure 2. Surface tension reduction of distilled water by the cell-free broth of *Candida glabrata* grown on mineral medium supplemented with 7.5 % cotton seed oil plus 5.0 % glucose

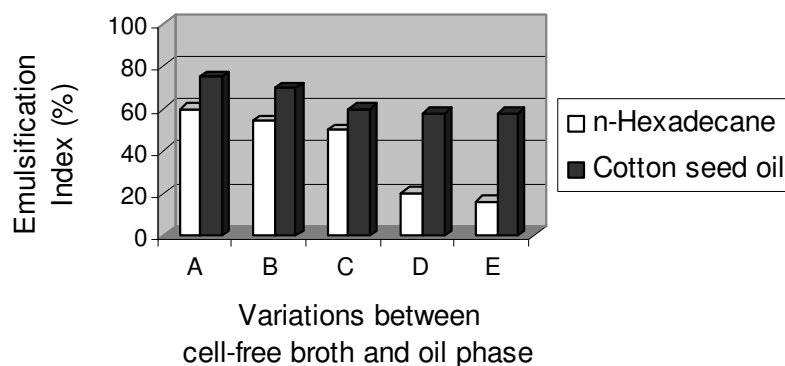


Figure 3. Efficiency of emulsifying activity of cell-free broth of *Candida glabrata* grown on mineral medium supplemented with 7.5 % cotton seed oil plus 5.0 % glucose as a function of volumes variation between the cell-free broth (aqueous phase) and the substrate (oil phase), respectively. (A = 3.0 ml and 2.5 ml; B = 2.5 ml and 3.0 ml; C = 2.0 ml and 3.5 ml; D = 1.5 ml and 4.0 ml; E = 1.0 ml and 4.5 ml)

The effect of added NaCl concentrations on n-hexadecane and cotton seed oil emulsification capacity of the cell-free broth is summarized in Figure 4. A reduction of approximately 20 % of emulsification activity was observed with the addition of up to 10 % (w/v) sodium chloride for both substrates, showing a relative tolerance over these salt concentrations. Once the salinity decreases the viscosity, it is possible that the increase of NaCl concentration had influenced the quality of the emulsion, thus reducing the

emulsification capacity. Reductions in emulsification activity were also reported for other surfactants of microorganisms as *Candida lipolytica* grown in n-hexadecane (Cirigliano and Carman, 1984) and a mixed culture cultivated in molasses (Ghurye et al. 1994).

The effect of thermal treatment on the emulsifier activity of *Candada glabrata* culture showed that no appreciable changes in emulsification capacity occurred, if the cell-free broth was heated, once

only 10 % of activity was lost at 80 °C. The loss of emulsifier activity could be explained by the denaturation of proteinaceous compounds of the bioemulsifier during heating. There was no significant change at lower temperature (4 °C). Liposan from *Candida lipolytica* found to be relatively stable between 30 and 90 °C, but lost 60 % of its activity after boiling for 1 hour (Cirigliano and Carman, 1984).

The pH of the cell-free broth was varied from 2 to 12 to test the effect of pH on emulsification capacity. No appreciable effect on activity was observed along the pH range, although it was observed an increase at pH 12, especially for cotton seed oil emulsification. Extremes of pH could possibly transform less surface-active species into more active emulsifiers by increased ionization. The activity of the biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* was also pH stable (Makkar and Cameotra, 1998), while the effectiveness of liposan as emulsifier was limited

to the acid to neutral pH (Cirigliano and Carman, 1984).

Bioemulsifier isolation

The examined agent was isolated from the culture filtrate of *Candida glabrata*. The precipitate collected in the aqueous phase recovered 100 % of the emulsification activity of n-hexadecane that was present in the culture filtrate, while the emulsification activity of the cotton seed oil increased 25 %. The average yield of precipitate in the aqueous phase was approximately 10.0 g/l. Bioemulsifier production by yeast *Candida utilis* varied from 0.26 to 0.93 g/l and depended on process conditions (Shepherd et al. 1995), while the extracellular emulsifying agent from *Curvularia lunata* yielded 2.6 g/l (Paraszkiewicz et al. 2002). The emulsification activity of both the isolated biosurfactant and the cell-free remained stable for a reasonable period (more than 4 weeks) under low temperature and upon sterilization.

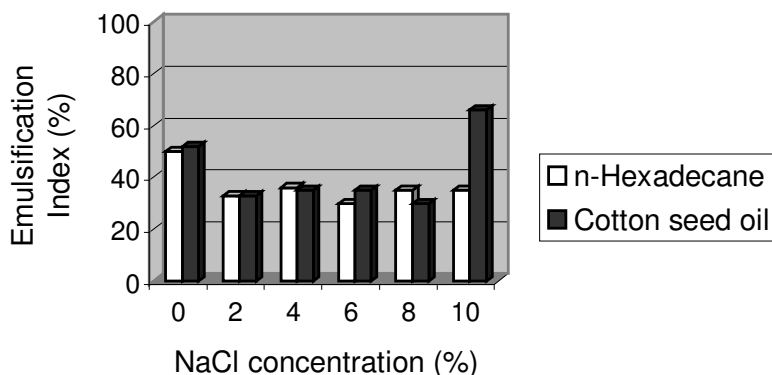


Figure 4. Effect of different sodium chloride concentrations on the emulsifying activity of cell-free broth of *Candida glabrata* grown on mineral medium supplemented with 7.5 % cotton seed oil plus 5.0 % glucose

Preliminary chemical characteristics of bioemulsifier

Biosynthesis of biosurfactants from a variety of bacteria and yeasts has been reported (Davila et al. 1992; Daniel et al. 1999; Lang and Wulbrandt, 1999; Zhou and Kosaric, 1995), most commonly involving rhamno-lipids, trehalose and sophorose-lipids. These usually contain various hydroxy fatty acids and carbohydrates and are

characterized by unique surfactant properties (Ron and Rosenberg, 2000). Preliminary analysis of the bioemulsifier produced by the new strain *Candida glabrata* indicated that it was a heteropolymer, which consisted of 45 % protein, 20% lipid and 10 % carbohydrate. Liposan, an extracellular emulsifier synthesized by *Candida lipolytica* was composed of 93 % carbohydrate and 7 % protein (Cirigliano and Carman, 1985). Other polymeric emulsifiers containing proteins,

carbohydrates and lipids were also produced by *Candida lipolytica* when grown in babassu vegetal oil (Sarubbo et al. 1999) or glucose (Sarubbo et al. 2001) as the sole carbon sources.

CONCLUDING REMARKS

The results obtained in this work show that this new strain of *Candida glabrata* represents a valuable source of new compounds with surface-active properties, with potential of application in different industries. Work is in progress to improve the production process of these compounds by using industrial wastes as substrates.

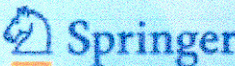
REFERENCES

- COOPER, D.G. and GOLDENBERG, B.G. Surface active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 1987, vol. 53, p. 224-229.
- BANAT, I.M.; MAKKAR, R.S. and CAMEOTRA, S.S. Potential applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, vol. 53, p. 495-508.
- CIRIGLIANO, M.C. and CARMAN, G.M. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1984, vol. 48, p. 747-750.
- DANIEL, H-J.; OTTO, R.T.; BINDER, M.; REUS, M. and 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*, 1999, vol. 51, p. 40-45.
- DAVILA, A-M.; MARCHAL, R. and VANDECASTEELE, J-P. Kinetics and balance of a fermentation free from product inhibition: sophorose lipid production by *Candida bombicola*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, June 1992., vol. 38, p. 6-11.
- DESAI, J.D. and BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology Molecular Review*, 1997, vol. 61, p. 47-64.
- GALLERT, C. and WINTER, J. Solid and liquid residues as raw materials for biotechnology. *Naturwissenschaften*, 2002, vol. 89, p. 483-496.
- GARCIA-OCHOA, F.; and CASAS, J.A. Unstructured kinetic model for sophorolipid production by *Candida bombicola*. *Enzyme and Microbial Technology*, 1999, vol. 25, p.613-621.
- GHURYE, G.L.; VIPULANANDAN, C. and WILSON, R.C. A practical approach to biosurfactant production using nonaseptic fermentation of mixed cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 1994, vol. 44, p. 661-666.
- GOMES, P.F.; NASCIMENTO, A.E.; OKADA, K.; MESSIAS, A.S.; SHARIA, A.E.N. and CAMPOS-TAKAKI, G.M. Aspectos da qualidade de ecossistemas do Município do Rio Formoso. In: *International Conference: Sustainable use of estuaries and mangroves: challenges and prospects*. Abstracts, 2000. p. 82.
- HANSON, R.S. and PHILLIPS, J.A. In: GHERHARDT, P. ed., *Manual of Methods for General Bacteriology*, American Society for Microbiology, Washington, DC, 1981, p. 328-364.
- LANG, S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2002, vol. 7, p. 12-20.
- LANG, S. and WULLBRANDT, D. Rhamnose lipids – biosynthesis, microbial production and application potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999, vol. 51, p. 22-32.
- LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L. and RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, vol. 193, p. 265-275.
- MAKKAR, R.S. and CAMEOTRA, S.S. Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 1998, vol. 20, p. 48-52.
- MAKKAR, R.S.; and CAMEOTRA, S.S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, vol. 58, p. 428-434.

- MAIER, R.M. and SOBERON-CHAVES, G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, vol. 54, p. 625-633.
- MANOCHA, M.S.; SAN-BLAS, G. and CENTENO, S. Lipid composition of *Paracoccidioides brasilienses*: possible correlation with virulence of different strains. *Journal of General Microbiology*, 1980, vol. 117, p. 147-154.
- O'DONNELL, K.L. *Zygomycetes in culture*. Palfrey Contributions in Botany. Athens, Department of Botany, University of Georgia, 1979. 257p.
- PARASZKIEWICZ, K.; KANWAL, A. and DLUGONSKI, J. Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization. *Journal of Biotechnology*, 2002, vol. 92, p. 287-294.
- RON, M. and ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology*, 2001, vol. 3, p. 229-236.
- SARUBBO, L.A.; PORTO, A.L.F. and CAMPOS-TAKAKI, G.M. The use of babassu oil as substrate to produce bioemulsifiers by *Candida lipolytica*. *Canadian Journal of Microbiology*, 1999, vol. 45, p. 423-426.
- SARUBBO, L.A.; MARÇAL, M.C.; NEVES, M.L.C.; SILVA, M.P.C.; PORTO, A.L.F. and CAMPOS-TAKAKI, G.M. Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2001, vol. 95, p. 59-67.
- SHEPHERD, R.; ROCKEY, J.; SHUTHERLAND, I.W. and ROLLER, S. Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. *Journal of Biotechnology*, 1995, vol. 40, p. 207-217.
- ZHOU, Q-H. and N. KOSARIC Utilization of Canola Oil and lactose to produce biosurfactant with *Candida bombicola*. *Journal of American Oil and Chemistry Society*, 1995, vol. 72, p. 67-71.

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

**World journal of Microbiology and
Biotechnology**



[HOME](#)
[HELP](#)
[CART](#)
[LOGIN](#)
[MY SPRINGER](#)



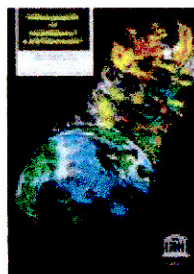
[SEARCH BY](#)
 All

[Journals](#)
[Books](#)
[Textbooks](#)
[Contact](#)

Biochemistry

 Select your subdiscipline

 Select a discipline

[Home](#) / [Life Sciences](#) / [Biochemistry](#)


World Journal of Microbiology and Biotechnology

Editor-in-Chief: P.J. Large

ISSN: 0959-3993 (print version)

ISSN: 1573-0972 (electronic version)

Journal no. 11274

Springer Netherlands

[Online version available](#)

 [Print version](#)
 [Recommend](#)

E-content



[Description](#) | [Editorial Board](#) | [Most viewed articles](#)

Instructions for Authors

World Journal of Microbiology and Biotechnology

[Springer Open Choice](#)

[Instructions to Authors](#)

[Manuscript Presentation](#)

[References](#)

[Figure Legends](#)

[Symbols and Units](#)

[Nomenclature](#)

[Proofs](#)

[Offprints](#)

[Page Charge](#)

[Copyright](#)

[Permissions](#)

[Manuscript Submission](#)

[Table 1](#)

[Table 2](#)

[Additional Information](#)

Springer Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. To publish via Springer Open Choice, upon acceptance please visit www.springer.com/openchoice to complete the relevant order form and provide the required payment information. Payment must be received in full before publication or articles will

For authors an

[Aims and scope](#)

[Submit online](#)

[Instructions for Authors \(196 Kb\)](#)

[Instructions for Authors \(OpenChoice\)](#)

Table of Contents

Please register

E-mail

Retype E-mail

☐ Please fee
send me in
from Sprin

Additional info

[Order this journal](#)

[Article Reprints](#)

[Bulk Orders](#)

Other contacts

[Production](#)

[Customer Service](#)

[Advertising](#)

Related subject

[Biochemistry](#)

[Biotechnology](#)

publish as regular subscription-model articles.

Environmental Sc
Microbiology

www.springer.com/openchoice

Instructions to Authors

The World journal of Microbiology & Biotechnology welcomes research papers, short communications, short notes, technical communications and review papers.

Full-length Research Papers:

These should describe new and carefully confirmed findings. Experimental procedures should be given in sufficient detail for others to verify the work. The length of a full paper should be the minimum required to describe and interpret the work clearly.

Short Communications:

A Short Communication is suitable for recording the results of complete but small investigations or giving details of new methods, techniques or apparatus. Short communications are two printed pages in length. Progress reports are not acceptable.

Short Notes:

Short Notes are one printed page in length. They are suitable for reports of simple findings such as the properties of an already well described enzyme or of observations not requiring elaboration. They should be written with a short (40-word) summary, no main subdivisions, they may contain one table or figure, or two if the text is brief, and no more than three references.

Technical Communications:

These are reports of processes or procedures which may be published as an annex to a full-length paper or on their own provided that the work described is of sufficient interest to other workers in the field.

Review Papers:

These should be submitted only after consultation with the Editor. They will be limited to no more than 8 printed pages.

Manuscript Presentation

Manuscripts not conforming to the instructions below will be returned for reformatting without review. You should refer to a previously published article in the journal which can be downloaded for free from the journal website at <http://www.springer.com>. The journal's language is English. British English or American English spelling and terminology may be used, but either one should be followed consistently throughout the article. If English is not your first language please ensure that the language is corrected by a fluent English speaker or via www.manuscript-improvement.com before submission. Manuscripts submitted in poor English may be returned for revision without review. Text should be formatted to fit A4 or US Letter paper size, leaving 2.5 cm margins on all sides of the text. Please double-space all material, including notes and references. Quotations of more than 40 words should be set off clearly, either by indenting the left-hand margin or by using a smaller typeface. Use double quotation marks for direct quotations and single quotation marks for quotations within quotations and for words or phrases used in a special sense.

Number the pages consecutively with the first page containing:

- running head (shortened title)
- title
- author(s)
- affiliation(s)
- full address for correspondence, including telephone and fax number and e-mail address

Summary

Please provide a short abstract of 100 to 250 words. The summary should not contain any undefined abbreviations or unspecified references. It should be page 2 of the manuscript with the title repeated on that sheet.

Key Words

Please provide 5 to 10 key words or short phrases in alphabetical order.

Abbreviations

Abbreviations should be explained at first occurrence in the text though extensive mathematical symbols should be defined collectively before the introduction begins on page 3. A list of abbreviations which need not be defined is given in Table 1 at the end of this document.

Main text

Presentation of the main text depends on the type of article. For guidance on this respect

you should refer to a previously published article in the journal which can be downloaded for free from the journals' website at www.springeronline.com. Sections headings should be clearly distinguishable but not numbered. If you decide to use notes, please use endnotes rather than footnotes. Notes should be indicated by consecutive superscript numbers in the text and listed at the end of the article before the references. Please consult a current issue for the styles.

References are cited in the text by giving the name(s) of the author or authors up to two and the year. When there are more than two authors, only the first author's name should be given followed by et al. In the event that a cited author has two or more works published during the same year, the reference, both in the text and in the reference list, should be identified by a, b etc. after the date to distinguish the works.

Full-length Research papers should be presented under the following headers: Introduction (including a consideration of the current literature and the objectives of the study), Materials & Methods (with sufficient detail to allow the work to be repeated), Results & Discussion (focus the reader's attention on your key results and put your key results into the context of current information) and Conclusions (please avoid unwarranted or unsupported speculations).

The style of main sections of Short Communications need not conform to that of full-length papers. However, we encourage authors to present the main text under the following headers: Introduction, Materials & Methods, Results & Discussion and Conclusions.

Acknowledgements

Acknowledgements (including funding agencies and help from other colleagues) should follow the main text and precede the references.

www.manuscript-improvement.com

References

References to books, journal articles, articles in collections and conference or workshop proceedings, and technical reports should be listed at the end of the paper in alphabetical order. Articles in preparation or articles submitted for publication, unpublished observations, personal communications, etc. should not be included in the reference list but should only be mentioned in the article text (e.g., T. Moore, personal communication).

References to books should include the author's name; year of publication; title; page numbers where appropriate; publisher; place of publication; ISBN number, in the order given in the example below.

Attwood, T.K. & Parry-Smith, D.J. 1999 Introduction to Bioinformatics. pp. 69–80. Harlow: Addison Wesley Longman. ISBN 0–582–32788–1.

References to articles in an edited collection should include the author's name; year of publication; article title; editor's name; title of collection; first and last page numbers; publisher; place of publication; ISBN number, in the order given in the example below.

Steinbuechel, A. 1996 PHB and other polyhydroxyalkanoic acids. In Biotechnology. 2nd edn. Vol 6, ed. Rehm, H.-J. Weinheim: VCH Publishers.

References to articles in conference proceedings should include the author's name; year of publication; article title; editor's name (if any); title of proceedings; first and last page numbers; place and date of conference; publisher and/or organization from which the proceedings can be obtained; place of publication; ISBN number, in the order given in the example below.

Charnley, A.K. 1992 Mechanisms of fungal pathogenesis in insects with particular reference to locusts. In Biological Controls of Locusts and Grasshoppers: Proceedings of an international workshop held at Cotonou, Benin, ed Lomer, C.J. & Prior, C. pp. 181–190. Oxford: C.A.B. International. ISBN 0–5198779–6.

References to articles in periodicals should include the author's name; year of publication; article title; full title of periodical; volume number (issue number where appropriate); first and last page numbers, in the order given in the example below.

Saha, B.C. & Zeikus, J.G. 1989 Improved method for preparing high maltose conversion syrups. Biotechnology and Bioengineering 34, 299–303.

References to technical reports or doctoral dissertations, which must be in the public domain, should include the author's name; year of publication; title of report or dissertation; institution; location of institution, in the order given in the example below.

Singh, K.L. 1997 Physiological and biochemical studies on microbes isolated from the harsh conditions. Ph.D Thesis, BHU, Varanasi, India.

Figure Legends

Figure legends should follow the references on a separate page and precede the tables. Each figure should be mentioned in the text.

Tables

Each table should be numbered consecutively (1, 2, etc.). Please provide a short explanatory caption (without abbreviations) to each table, refer to the table in the text and note its approximate location in the margin. Finally, please place the tables after the figure legends in the manuscript. In tables, footnotes are preferable to long explanatory material in either the heading or body of the table. Such explanatory footnotes, identified by superscript letters, a, b, c etc., should be placed immediately below the table.

Figures

All photographs, graphs and diagrams should be referred to as a 'Figure' and they should be numbered consecutively (1, 2, etc.). Multipart figures ought to be labelled with lower case letters (a, b, etc.). Please insert keys and scale bars directly in the figures. Relatively small text and great variation in text sizes within figures should be avoided as figures are often reduced in size. Figures may be sized to fit approximately within the column(s) of the journal. Provide a detailed legend (without abbreviations) to each figure, refer to the figure in the text and note its approximate location in the margin. Please place the legends in the manuscript after the references.

Policy on Colour Figures:

Springer treats the inclusion of color figures on a per article basis and offers two options 1) Free Online Color, the color figures will only appear in color on the journals' website and b/w in the printed version of the journal 2) Online and Printed Color which comes at a charge of Euro 950/ USD 1150 per article. The color figures will appear in color on the website and in the printed version of the journal.

Symbols and Units

Only recommended SI units should be used. Authors may use either superscript presentations (mg ml^{-1}) or the solidus (/) presentation (mg/ml).

When giving the concentration of a solution in a solvent the correct description is, for example, 10 g glucose/100 ml, not 10 g/100 ml glucose. The term % used to express a concentration must be used correctly, i.e. g per 100 g solution; otherwise % (v/v) or % (w/v) should be used for solutions of concentration greater than 1%. For solvent mixtures use, for example, butan-1-ol/acetic acid/water (4:1:1, by vol.) or chloroform/methanol (2:1, v/v).

Nomenclature

Chemical and biochemical nomenclature should follow the IUPAC-IUB Commission guidelines; appropriate guidelines are given in, for example

Policy of the Journal and Instructions to Authors

The Biochemical Society

59 Portland Place

London W1N 3AJ

UK

and references therein. This document is available online at (Please use the link below).

The Enzyme Commission (EC) number for enzymes should be given at the first time of mention; see Enzyme Nomenclature (1992), Academic Press; London & New York, or visit

<http://www.expasy.org/enzyme/>

(Please copy & paste the link into the address field of your browser)

Microorganisms must be correctly named using the current codes for bacteria, yeasts, fungi, algae and protozoa; (see Microbiology 1999, 145 (January), p. viii). Guidelines for genetic nomenclature are quoted in the same publication. For further information on quantities and units, see Table 2 at the end of this document.

<http://www.biochemj.org/bj/bji2a.htm>

Proofs

Proofs will be sent to the corresponding author by e-mail (if no e-mail address is available or appears to be out of order, proofs will be sent by regular mail).

Your response, with or without corrections, should be sent within 72 hours!

Corrections should be sent as an e-mail attachment to: proofscorrection@springer.com.

Always quote the four-letter journal code and article number from your proof in the subject field of your e-mail.

Offprints

Fifty (50) offprints of each article will be provided free of charge. Additional offprints (both hard copies and PDF files) can be ordered by means of an offprint order form supplied with the proofs.

Page Charge

No page charges are levied on authors or their institutions.

Copyright

Authors will be asked, upon acceptance of an article, to transfer copyright of the article to the Publisher (see section Manuscript Submission). This will ensure the widest possible dissemination of information under copyright laws.

Permissions

It is the responsibility of the author to obtain written permission for a quotation from unpublished material, or for all quotations in excess of 250 words in one extract or words in total from any work still in copyright, and for the reprinting of figures, tables or poems from unpublished or copyrighted material.

Manuscript Submission

The World Journal of Microbiology and Biotechnology has a fully web-enabled manuscript submission and review system. This system offers authors the option of tracking in real time the review process of their manuscripts. The online manuscript and review system offers easy and straightforward login and submission procedures. This system supports a wide range of submission file formats:

For manuscripts - Word, WordPerfect, RTF, TXT and LaTeX

For figures - TIFF, EPS, PS, GIF, JPEG and PPT

PDF is NOT a recommended format.

Manuscripts should be submitted to:

<http://wibi.edmgr.com>

Authors are requested to download the Consent to Publish and Transfer of Copyright form from this system.

Please send a completed and signed form either by mail or fax to the World Journal of Microbiology and Biotechnology Office.

The World Journal of Microbiology and Biotechnology.

Springer, Journals Editorial Office

Van Godewijkstraat 30

3311 GX Dordrecht

The Netherlands

Fax: (+31) 78 6576254

NOTE: By using the online manuscript submission and review system, it is NOT necessary to submit the manuscript also as printout + disk. In case you encounter any difficulties while submitting your manuscript online, please get in touch with the responsible Editorial Assistant by clicking on "CONTACT US" from the toolbar. The conventional way of submitting your manuscript (e.g. mailing printout + disk) is NOT possible.

Submitted manuscripts should not be in consideration in whole or in part by another journal. Nor has it already appeared in print, in whole or in part, in any language, in any other journal.

IMPORTANT: Please supply the names in the Enter Comments box of Editorial Manager of not less than three suitably qualified persons whom the editors might wish to consider as possible reviewers of your manuscript.

<http://www.wibi.edmgr.com>

Table 1

Abbreviations and Conventions. These abbreviations may be used without definition.

(i) General

ADP, CDP, GDP, IDP, UDP, XDP, dTDP	5'-pyrophosphates of adenosine, cytidine, guanosine, inosine, uridine, xanthosine, thymidine
AMP etc.	adenosine 5'-phosphate, etc.
ATP etc.	adenosine 5'-triphosphate, etc.
Approx.	approximately (not c. or ca.)
Aq.	aqueous
BSA	bovine serum albumin
CM-cellulose	carboxymethylcellulose
CoA, CoASH	coenzyme A
conc.	concentrated
Cyclic AMP	adenosine 3':5'-cyclic
cAMP, etc.	monophosphate, etc.
DEAE-cellulose	diethylaminoethylcellulose
DNA	deoxyribonucleic acid
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
DNAase	deoxyribonuclease
DMSO	dimethyl sulphoxide
EDTA	ethylenediaminetetra-acetate
FAD	flavin-adenine dinucleotide
FMN	flavin mononucleotide
GSH, GSSG	glutathione, reduced and oxidized forms
IgG, IgM, etc.	immunoglobulin G, M, etc.
i.r.	infrared
LPS	lipopolysaccharide
LD ₅₀	median lethal dose
MIC	minimal inhibitory concentration
NAD ⁺	nicotinamide-adenine dinucleotide, oxidized (NADH for reduced form)
NADP ⁺	nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, oxidized (NADPH for reduced form)
NTG	N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
P _i /PP _i	orthophosphate, pyrophosphate
ppGpp	guanosine 3'-diphosphate 5'-diphosphate
pppGpp	guanosine 3'-diphosphate 5'-triphosphate

PEG	polyethylene glycol
PMSF	phenylmethanesulphonyl fluoride
RNA	ribonucleic acid
mRNA	messenger ribonucleic acid
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
tRNA	transfer ribonucleic acid
RNAase	ribonuclease
SDS	sodium dodecyl sulphate
u.v.	ultra-violet
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl B-D-galacto-pyranoside

(ii) Scintillants

BBOT	2,5-di[5'-tert-butylbenzoxazolyl (2)']thiophen
Butyl-PBD	2-4(4'-tert-butylphenyl)-5(4" biphenyl)-1,3,4-oxadiazole
Dimethyl-POPOP	1,4-di-2-(4-methyl-5 POPOP phenyloxazolyl) benzene
POPOP	1,4-di-2-(5-phenyloxazolyl) benzene
PPO	2,5-diphenyloxazole

(iii) Buffers

Aces	N-(2-acetamido)-2-amino ethanesulphonic acid
Ada	N-(2-acetamido) iminodiacetic acid
Bes	N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-amino ethanesulphonic acid
Bicine	N,N-bis(2-hydroxyethyl)glycine
Caps	3-cyclohexylaminopropanesulphonic acid
Chaps	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propane sulphonic acid
Ches	2-(cyclohexylamino)ethane sulphonic acid
Hepes	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulphonic acid
Hepps	N-2-hydroxyethylpiperazine-
Mes	N'-3-propanesulphonic acid 2-(N-morpholino)ethane sulphonic acid
Mops	3-(N-morpholino)propane sulphonic acid
PBS	phosphate-buffered saline (but composition must be specified!)

Pipes	piperazine-N,N'-bis-2-ethane sulphonic acid
Tes	N-tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulphonic acid
Tricine	N-tris-(hydroxymethyl) methyl glycine
Tris	tris(hydroxymethyl) methylamine

(iv) Techniques

ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ESR (or EPR)	electron spin (paramagnetic) resonance
FPLC	fast protein liquid chromatography
GC (or GLC)	gas chromatography (or gas-liquid chromatography)
GC-MS	gas chromatography combined with mass spectrometry
HPLC	high-pressure (performance) liquid chromatography
HPTLC	high-pressure thin-layer chromatography
MIC	minimum inhibitory concentration
MS	mass spectrometry
NMR	nuclear magnetic resonance
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
Py-MS	pyrolysis mass spectrometry
Py-GC	pyrolysis gas chromatography
RIA	radioimmunoassay
TLC	thin-layer chromatography

(v) Units**Z0,1**

bp	base pairs
c.f.u.	colony-forming units
c.p.m.	counts per minute
Da, kDa,	daltons, kilodaltons,
MDa	megadaltons
d.p.m.	disintegrations per minute
(or d.p.s.)	(second)
kb (or kpb)	kilobase pairs
p.f.u.	plaque-forming units

rev/min (rev. min⁻¹)

revolutions per minute

Table 2

Selected Symbols for quantities and units

(i) Space, time and related quantities

Quantity		Unit
l	length	m, mm, μm (not μl), nm (not $\text{\AA}$), etc.
V	volume	l (or dm^3), ml (or cm^3), μl (or mm^3) etc.
λ	wavelength	nm (not ml or $\text{\AA}$)
t	time	h (not hr), min (not mn), s (not sec), ms, etc.
ν , f	frequency	Hz

(ii) Mechanical and related quantities

Quantity	Z1,1	Unit
m	mass	kg, g, mg, etc.
F	force	N (kg m s^{-2})
E	energy	J (not cal)
p, P	pressure	Pa (N/m^2) 1 bar = 10^5 Pa; 1 atm = 101325 Pa
S	sedimentation coefficient	$S = 10^{-13} \text{ s rad}^{-2}$
g	centrifugal field	(9.81 m . s)

(iii) Molecular and related quantities

Quantity		Unit
m	molecular mass	Da(dalton), kDa, etc
n	amount of substance	mol, mmol, etc.
M	molar mass	g/mol or kg/mol
m_m	relative	-
M_r	molecular mass	

(iv) Chemical reactions

Quantity		Unit
K	equilibrium constant	

K_m	Michaelis constant	M, mM, etc
K_i	inhibition constant	M, mM, etc.
K_d	dissociation constant	M, mM, etc.
k	rate constant	s^{-1} , or $M^{-1} s^{-1}$
v	rate of reaction	M (or mM, etc.) s^{-1}
—	enzyme activity	kat
V	rate of enzyme catalysed reaction at infinite concentration of substrate	M (or mM, etc.) s^{-1}

(v) Electricity, magnetism and electromagnetic radiation

Quantity		Unit
I	electric current	A
R	resistance	Ω
I	luminous intensity	cd
T	transmittance (I/I_0)	—
A	absorbance ($-\log T$)	—
D	attenuance	—
ϵ	molar absorption coefficient	$M^{-1} cm^{-1}$
—	radioactivity	Bq (=1 dis. s^{-1}) or Ci (37 CBq)

Additional Information

Mike van den Bosch, PhD
Publishing Editor
Springer
P.O. Box 17
3300AA Dordrecht
The Netherlands
Phone: +31(0) 78 6576-188
Fax: +31(0) 786576-388
mike.vandenbosch@springer.com