



Araştırma Makalesi / Research Article
PRODUCTION OF SOPHOROLIPIDS USING THE YEAST *Candida bombicola* ATTC 22214 FOR THE APPLICATIONS IN THE FOOD INDUSTRY

Gülseren PEKİN*, Fazilet VARDAR-SUKAN

Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Bornova-İZMİR

Geliş/Received: 07.02.2006 Kabul/Accepted: 25.04.2006

ABSTRACT

Lactonic sophorolipids were produced by the yeast *Candida Bombicola* ATTC 22214 (*Torulopsis bombicola*) in a 3L bioreactor using batch cultivation, with corn oil and glucose as carbon sources. The main compound of the lactonic mixture was separated from the mixture by column chromatography and was identified as 17 hydroxyoctadecanoic-1',4''-lactone 6' 6'' diacetate sophorolipid. Surface tension measurements showed that both the crude lactonic mixture and the diacetyl lactone lowered the surface tension of pure water from 72 din cm⁻¹ to 43,5 din cm⁻¹ and 38.9 din cm⁻¹ respectively thus proving that both samples were surface active. The bio-product consists of only sophorose sugar and lipid in its structure and this can safely be used in food industry as a biosurfactant, either in its crude mixture form or in purified diacetyllactonic form.

Keywords: Biosurfactants, sophorolipids, *Candida bombicola*, *Torulopsis bombicola*.

***Candida bombicola* ATTC 22214 MAYASI İLE GIDA SEKTÖRÜNE YÖNELİK BİYOSURFAKTANT ÜRETİMİ**

ÖZET

Karbon kaynağı olarak mısır özü yağı ve glukoz içeren besi ortamında, 3L biyoreaktörde ve kesikli yöntemle *Candida Bombicola* ATTC 22214 (*Torulopsis bombicola*) mayası kullanarak laktonik soforozlipidleri üretilmiştir. Soforozlipidleri karışımındaki temel bileşik, kolon kromatografisi yöntemiyle karışımdan ayrıştırılmış ve bileşiğin 17 hidroksioktadekanik-1',4''-lakton 6' 6'' diasetat soforozlipid olarak NMR tanısı yapılmıştır. Laktonik karışım ve ayrıştırılan diasetillenmiş lakton, saf suyun ortalama 72 din cm⁻¹ olan yüzey gerilimini sırasıyla 43,5 din cm⁻¹ ve 38.9 din cm⁻¹ değerlerine düşürmüş ve böylece her iki ürünün de yüzey aktif özellikleri irdelenmiştir. Biyo-ürün, yapısında yalnızca soforoz şekeri ve yağ içerdiği için gerek saflaştırılıp temel bileşenine ayrılarak gerekse de saflaştırılmadan gıda sektörüne yönelik uygulamalarda biyosurfaktant olarak güvenle kullanılabilir.

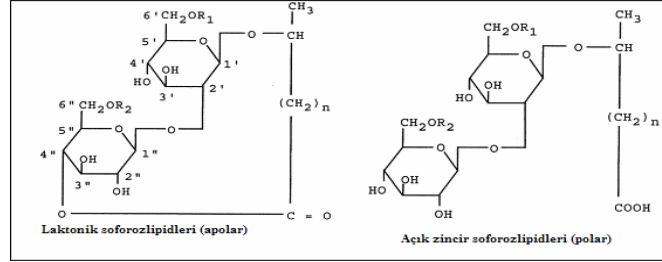
Anahtar Sözcükler: Biyosurfaktanlar, soforozlipidleri, *Candida bombicola*, *Torulopsis bombicola*.

1. GİRİŞ

Mikrobiyal biyosurfaktantlar birçok sanayide uygulama alanı bulan önemli ürünlerdir. Bu maddelerin özellikleri, yüzey gerilimini ve ara yüzey gerilimini düşürmeleri ve ıslatma, geçirgenlik, dağıtma, hidrofobluk ve hidrofilitik, emülsiyon etme ve emülsiyonu bozma, deterjanlık,

* Sorumlu Yazar/Corresponding Autor: e-mail/e-ileti: gulserenp@yahoo.com, tel: (0533) 245 10 21

jel oluşturma, köpürme, flokulasyon gibi etkilerle yüzey özelliklerini değiştirmeleridir. Ayrıca, bazı koşullarda mikrobiyal büyümeyi hızlandırırken bazı koşullarda anti-mikrobiyal etkileri sergilerler [1-3]. Mikrobiyal biosurfaktantlardan olan soforozlipidleri soforoz şekerine bağlı lipid zincirinden oluşurlar. Yapıları Şekil 1 de verilmiştir.



Şekil 1. *Candida bombicola* ATTC 22214 mayasının ürettiği polar ve apolar bileşiklerin genel yapıları

Organizmalar soforozlipidlerini laktonik ve açık zincirli olarak bir karışım halinde üretirler [4-7]. Kullanılan substrata ve/veya üretim yöntemine bağlı olarak elde edilen soforozlipidleri karışımındaki laktonik bileşenlerin yüzdeleri ve ürünün polarlığı değişir [8-11]. Soforozlipidleri üretiminde karbon kaynağı olarak, karbonhidratlar [12], bitkisel yağlar [13], n-alkanlar [14], hayvansal yağlar [15], yağ rafinerilerinden çıkan atıklar [16], 2-alkanoller [17], oleik asit [18] ve tek hücre yağı (single cell oil) [19], gibi birçok yenilenebilir karbon kaynakları denenmiştir.

Araştırma grubumuz *Candida bombicola* ATTC 22214 mayası ile farklı üretim yöntemleri uygulayarak soforozlipidleri üretmiş ve bu çalışmalar sırasında, üretim yöntemi olarak kesikli yöntem kullanıldığında soforozlipidi karışımında laktonların (Şekil 1) yüzdesinin arttığını gözlemlenmiştir. Apolar olan laktonlar alt akım ve saflaştırma işlemlerinde katı oluşturma ayırma ve saflaştırmada kolaylık sağlamışlardır [20].

Bu çalışmanın amacı, soforozlipidi karışımını kesikli yöntemle yani laktonik olarak elde edilip tanılarını yapmak ve elde edilen laktonların gıda sektörüne yönelik çalışmalar için yüzey aktif olup olmadığını saptamaktır. Çalışma, özellikle karbon kaynağı olarak mısır özü yağı kullanılması açısından özgün bir çalışmadır.

2. DENEYSEL ÇALIŞMA

2.1. Organizma

Bu çalışmada Western Ontario Üniversitesi-Kanada' dan temin edilmiş olan *Candida bombicola* ATCC 22214 mayası kullanılmıştır. Organizma, % 0,3 bacto dextrose, % 0,3 bacto-malt extract, % 0,4 bacto-peptone ve % 0,2 bacto agar deiyonize suyla 1L ye tamamlanarak hazırlanan ve 121atm de 30 dak.sterilize edilen yatık agar gelişme ortamına aşılmıştır. Yatık kültürde 25°C de üretilen organizma 4°C de muhafaza edilmiş ve her ay taze ortama transfer edilmiştir.

2.2. Kimyasallar

Kullanılan yağ mısır özü yağı'dır. %58,85 linoleik, %25,51 oleik ve % 12,19 palmatik yağ asitleri içermektedir Pekin ve ark.ları, [20].

Çalışmanın tümünde Analitik saflıkta kimyasallar kullanılmıştır. Tüm kimyasallar, Fluka, Buchs İsviçre malıdır.

Production of Sophorolipids Using the Yeast ...

İnce tabaka kromatografisinin tabakaları Kiselger F60₂₅₆ tabakalarıdır (Merck, Darmstadt, Almanya).

2.3. Kesikli Biyoreaktör Deneyinin Metodu

2.3.1. Biyoreaktörün Hazırlanışı

Kullanılan biyoreaktör, Bioengineering-Wald-Switzerland marka, 3L lik karıştırmalı cam biyoreaktördür. Karıştırma ve havalandırma kontrolleri ile donatılmıştır. Şekil 2 de kullanılan biyoreaktörün fotoğrafı görülmektedir.



Şekil 2. Kullanılan biyoreaktörün fotoğrafı

Biyoreaktör ile birlikte 1,5 litre ortam (Çizelge 1) 121⁰C de 30 dakika sterilize edilmiştir. 200g mısır özü yağı ve 200g glukoz 500 ml deiyonize suda çözülmüş ve ortamdan ayrı olarak 121⁰C de 30 dakika sterilize edilmiş ve aseptik koşullarda sonradan biyoreaktöre eklenmiştir.

2.3.2. Aşı Ortamının Hazırlanışı

Aşı ortamı (Çizelge 1) önce hazırlanıp sterilize edilmiş ve 2 öze dolusu stok kültürle aşılansak bir ön-aşı kültürü hazırlanmıştır. Ön aşı kültürü 25⁰C de 100 rpm de çalkalamalı inkübatörde 2 gün üretilmiş, 2. günün sonunda ön aşı kültüründen 2 ml alınarak taze hazırlanıp sterilize edilen 200mL Çizelge 1 ortamına katılarak biyoreaktör aşı kültürü hazırlanmıştır. Biyoreaktör aşı kültürü 3L lik biyoreaktöre katılmadan önce 25⁰C de çalkalamalı inkübatörde 100 rpm de 24 saat inkübe edilmiştir.

Çizelge 1. Biyoreaktör ortamı ve aşı ortamlarında kullanılan koşullar

| Kimyasallar ve parametreler | Değerler |
|-------------------------------------|---|
| Yeast extract (gL ⁻¹) | 10 |
| D-glukoz (gL ⁻¹) | 100 |
| Mısır özü yağı (gL ⁻¹) | 100 |
| Üre (gL ⁻¹) | 1 |
| pH | 3,5 |
| Sıcaklık (°C) | 25 |
| Karıştırıcı hızı rpm | Aşı kültürlerinde:100; biyoreaktörde değişken |
| Toplam hacim (mL) | Aşı ortamı için :200; biyoreaktörde: 2.200L |

Biyoreaktördeki üretimde, sıcaklık 25°C de ve pH 3,5 da tutulmuş ve karıştırıcının hızı, sürekli ayarlanarak biyoreaktörde çözünmüş oksijen % 25-35 hava doygunluğu değerleri arasında sabit tutulmaya gayret gösterilmiştir.

2.4. Soforozlipidlerin Ayırışılması ve Tanısı

Üretim sonunda biyoreaktördeki ortam dışarı pompalanmış ve ortam eşit hacimlerde etil asetatla ekstraksiyona alınmıştır. Etil asetat fazına susuz sodyum asetat eklenerek suyu alınmış ve örnek süzölmüştür. Etil asetat vakum altında uzaklaştırılmış ve oluşan katı faz n-hekzanla yıkanarak kullanılmamış yağdan arındırılmıştır.

Soforozlipidlerinin tanısı için ince tabaka kromatografisi plakaları (TLC plakaları) Kiselger F60₂₅₆ (Merck, Damstadt, Almanya) kullanılmıştır. Tabakalar 4 cm x 8 cm boyutlarında kesilerek kullanılmıştır.

TLC plakalarında örnekler, kloroform/metanol/su (65:15:2, v/v/v) mobil fazı ile yürütülmüş ve noktaların belirlenmesi için, tabakalar asetik asit/derişik sülfürik asit/ anisaldehit (100:2:1, v/v/v) ile boyanıp 150°C de 5 dakika tutulmuştur. Asmer ve ark.ları, [4] de tanımlanan yöntemle noktaların tanıları yapılmıştır.

Bir karışım halinde elde edilen soforozlipidlerin bileşenlerine ayrılmasında kullanılan kolon kromatografisi 38 cm uzunluğunda ve çapı 3 cm olan cam kolondur. Silika jel, mobil fazla karıştırılarak kolona doldurulmuştur. Kolondan akış hızı 5 mL dak⁻¹'a ayarlanmıştır. Eluantlar yaklaşık 12'şer mL olacak biçimde deney tüplerine alınmış ve her deney tüpü için ayrı bir TLC geliştirilmiştir. Geliştirilen TLC plakalarının değerlendirilmesinde Asmer ve ark.ları, [4] de verilen TLC plakası referans olarak alınmıştır. Deney sonunda TLC sonuçlarına göre birbirinin aynı olan örnekler bir araya toplanmış ve vakum evaporatöründe sıvı fazları uçurularak katılaştırılmışlardır.

Diasetillenmiş laktonun NMR tanısı Bruker AM 400 marka NMR da yapılmıştır.

2.5. Yüzey Gerilimi Ölçümleri

Elde edilen soforozlipidlerin yüzey gerilimi, du Nouy-ring TD1(Lauda, Almanya), tensiyometresi ile ölçölmüştür. Ölçümler ultra-saf suya karşı alınmıştır.

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmanın amacı, mısır özü yağı kullanarak laktonik soforozlipidlerin üretip tanılarının yapılması, ürünün yüzeyaktif olup olmadığının saptanmasıdır. Ayrıca, elde edilen biyo ürün yalnızca soforoz şekeri ve lipid içerdiğinden ürünün gıda sektörüne yönelik uygulamalar için bir biyosurfaktant olarak önerilmesi öngörölmüştür.

Karbon kaynağı olarak mısır özü yağı kullanarak, *Candida bombicola* ATTC 22214 mayası yardımı ile soforoz lipidlerinin üretilmesi gerçekleştirilmiş ve daha önceki bir çalışma sonucu olarak yayınlanmıştır. Bu çalışmalarda kesikli yöntemle elde edilen ürünün apolar olduğu ve katı halde elde edilebildiğı saptanmış ama ürünün laktonik karakterizasyonu yapılmamıştır[20].

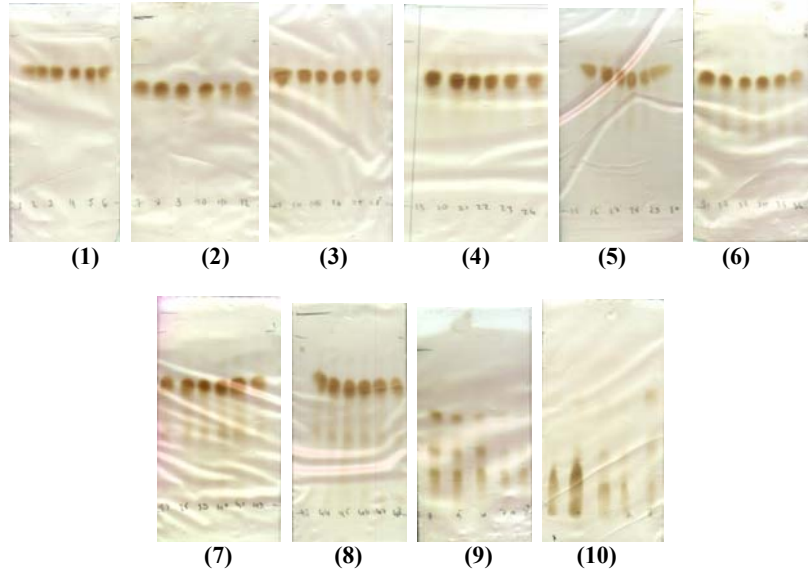
Bu çalışmada, katı halde laktonik biyo-ürün elde edilmesi ve ürünün karakterizasyonu amaçlandığı için, üretim yöntemi olarak yine kesikli üretim kullanılmıştır. Gerek grubumuzun çalışmalarından elde edilen sonuçlarda ve gerekse de literatürdeki çalışmalarda [13, 18, 21], karbon kaynağı olarak yağın yanında glukoz kullanıldığında üretimin arttığı kanıtlandığından glukoz, mısır özü yağının yanında ikinci bir karbon kaynağı olarak kullanılmıştır.

Kesikli üretim 103 saat sürmüştür. İlk soforozlipidleri 14. saatin sonunda, geliştirilen ince tabaka kromatografilerinde saptanmıştır. 60. saatin sonunda biyoreaktörde koyu, bal rengi

Production of Sophorolipids Using the Yeast ...

biyoürün kolaylıkla gözlenmeye başlamıştır. 103. saatte, çözülmüş oksijen % 82.4 e yükseldiğinde üretim sona erdirilmiştir.

Elde edilen soforoz lipidi karışımı etil asetatla ekstraksiyon edilip n-hekzanla yıkanırken katılaşmıştır. Bu bulgu da önceki çalışmalarla uyumludur [20], Kolon kromotografisinde dikloro metan- etanol (4:1) mobil fazı kullanılmıştır çünkü ince tabaka kromotografisiyle yapılan ön çalışmalarda (data gösterilmemiştir) bu karışımla en apolar bileşiğin diğer bileşiklerden önce kolondan alınabileceği görülmüştür. Yapılan kolon kromotografisi sırasında örneklerin ince tabaka kromotografileri geliştirilmiştir. Kolondan önce R_f değeri en yüksek olan olan yağ asitleri alınmıştır. Bunlar kullanılmamış yağa aittir (data gösterilmemiştir). Arkasından bir süre hiçbir nokta tesbit edilememiştir. Sonra Şekil 3 de 1-10 arasında numaralandırılan ince tabaka kromotografilerinde görülen bileşikler elde edilmiştir.



Şekil 3. Kolon kromotografisi sırasında geliştirilen ince tabaka kromotografileri: 1 ve 2 nolu tabakalarda bir tek R_f değerleri görülüyor. 3-10 nolu örneklerde birden fazla R_f değeri görülmektedir

Şekil 3 deki 1 ve 2 nolu TLC tabakalarından da görüldüğü gibi, en apolar bileşik karışımdan saf olarak alınmıştır. Yine Şekil 3, en apolar bileşenin temel bileşen olduğunu ve karışımın büyük bir yüzdesini içerdiğini göstermektedir. Tanı amaçlı incelemeler için Şekil 3 de verilen 1 ve 2 nolu örneklerle çalışılmıştır. Bu örneklerin hepsi R_f değeri 0,56 olan tek noktalarlardır.. Sıvı kısım vakum altında uçurulduğunda Şekil 4 deki fotoğrafta arkada görülen beyaz katı elde edilmiştir. Fotoğraftaki önde görülen katı saflaştırılmamış karışımdır.

Geliştirilen ince tabaka kromotografisinde saf katının R_f değeri 0.56 bulunmuş ve bu değer literatürde verilen R_f değerleriyle karşılaştırıldığında [4] ürünün diasetillenmiş lakton olabileceği saptanmıştır.

Laktonun NMR analizi yapılmıştır. Sonuçlar Çizelge 2 de sunulmuştur.



Şekil 4. Saf olarak elde edilen beyaz katı (arkada) ve saflaştırılmamış katı(önde)

Çizelge 2. Molekülün NMR analizi sonucu elde edilen şiftleri

| Moleküldeki yer | Şift |
|-----------------|---------------|
| 1 | 173.40 |
| 2 | 34.36 |
| 3 | 24.73 |
| 4-7, 12-14 | 26.9-30.2 |
| 8,11 | 27.21 |
| 9,10 | 129.93 |
| 15 | 25.32 |
| 16 | 37.52 |
| 17 | 79.40 |
| 18 | 21.06 |
| 1' | 102.42 |
| 2' | 82.06 |
| 3' | 75.73 |
| 4' | 69.71 |
| 5' | 73.89 |
| 6' | 63.59 |
| 1'' | 104.01 |
| 2'' | 75.22 |
| 3'' | 73.27 |
| 4'' | 70.44 |
| 5'' | 72.61 |
| 6'' | 62.06 |
| Ac | 171.67, 20.93 |
| Ac | 170.54, 20.83 |

Çizelge 2 den de görüldüğü gibi, örneğin NMR analizi sonucunda, yağ zinciri ve soforoz şekerinin şiftleri dışında bir de asetil grupları için ikili(dublet) pikler görülmüştür. Bu bulgular sonucunda, bileşik 17 hidroksioktadekanoik-1',4''-laktan 6' 6'' diasetat soforozlipid olarak belirtilmiştir. Bulgular literatürdeki bulgularla da uyumludur [7, 22].

Production of Sophorolipids Using the Yeast ...

Bunu izleyen aşamada, saf diasetillenmiş lakton ve saflaştırılmamış karışımın yüzey aktifliklerini belirlemek amacıyla saf suya karşı yüzey gerilimleri ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3 de verilmiştir.

Çizelge 3. Yüzey geriliminin derişimle değışimi

| Derişim(gL ⁻¹) | Diasetillenmiş lakton(din cm ⁻¹) | Saflaştırılmamış karışım (din cm ⁻¹) |
|----------------------------|--|--|
| 0,005 | 47,9 | 54,5 |
| 0,01 | 42,4 | 51,7 |
| 0,025 | 41,5 | 47,5 |
| 0,035 | 39,1 | 45,2 |
| 0,05 | 38,9 | 43,5 |

Çizelge 3 de görüldüğü gibi, diasetillenmiş lakton suyun ortalama 72 din cm⁻¹ olan yüzey gerilimini 38.9 din cm⁻¹ değerlerine düşürmüştür. Saflaştırılmamış karışım da aynı değeri 43,5 din cm⁻¹ ye düşürmüştür. Bu durumda her iki halde de ürün yüzey aktiftir.

Çalışmanın sonunda laktonik soforozlipidi karışımı elde edilebilmiş ve karışımın temel bileşeni olan diasetillenmiş lakton, 17 hidroksioktadekanoik-1',4''-lakton 6' 6'' diasetat soforozlipid, karışımından saf olarak ayrıştırılabilmıştır. Laktonik karışım ve ayrıştırılan diasetillenmiş lakton, saf suyun ortalama 72 din cm⁻¹ olan yüzey gerilimini sırasıyla 43,5 din cm⁻¹ ve 38.9 din cm⁻¹ değerine düşürmüştür ve böylece her iki örneğin de yüzey aktif olduğu kanıtlanmıştır.

Ürün, bileşiminde yalnızca soforoz şekeri ve yağ içermektedir ve ayrıca da biyosurfaktanttır. Bu nedenlerden ürünün, gerek saflaştırılıp temel bileşenine ayrılarak gerekse de saflaştırılmadan, gıda sektörüne yönelik uygulamalarda kullanımı mümkündür.

TEŞEKKÜR

Yazarlar, Stuttgart Üniversitesi Biyokimyasal Mühendislik bölümünün (Allmandring 31 D-70569 Stuttgart Almanya) laboratuvar imkanlarını bize açtığı için , Prof. C. Sylđatk'a ve No.98/DPT/010 projesi aracılığıyla gerçekleşen mali destek için Devlet Planlama Teşkilatına, teşekkür ederler.

KAYNAKLAR

- [1] Vardar-Sukan F., Kozaric N., Biosurfactants in *Encyclopedia of Microbiology* (Ed: J.Lederberg) Vol.1, 2nd ed, Academic Press, San Diego 2000, 618-635.
- [2] Deleu M.,Paquot M., "From renewable vegetable resources to micro organisms: New trends in surfactants", *Chimie*, 7, 641-646, 2004.
- [3] Banat I.M., Makkar R.S., Cameotra S.S., "Potential commercial applications of microbial surfactants", *Appl.Microbiol. Biotechnol.*, 53, 495-508, 2002.
- [4] Asmer H.J., Lang S., Wagner F., Wray V., "Microbial production, structure elucidation and bioconversion of sophorose lipids", *J. Am. Oil Chem.Soc.*, 65,1460-1466,1998.
- [5] Tulloch A.P., Hill A., Spencer J.F.T., "Structure and reaction of lactonic and acidic sophorosides of 17-dioxyoctadecanoic acid", *Can. J. Chem.*, 46, 3337-3351, 1968.
- [6] Weber L., Stach J., Haufe G., Hommel R., Kleber H.P., "Elucidation of structure of an unusual cyclic glycolipid from *Torulopsis apicola*", *Carbohydr. Res.*, 206 (1), 13-19,1990.
- [7] Otto R.T., Daniel H.J., Pekin G., Müller-Decker K., Fürstenberger G., Reuss M., Sylđatk C., "Production of sophorolipids from whey II. Product composition,surface active properties,cytotoxicity and stability against hydrolases by enzymatic treatent", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52, 495-501, 1999.

- [8] Davila A.M., Marchal R., Vanecastelee J.P., "Kinetics and balance of a fermentation free from product inhibition: sophorose lipid production by *Candida bombicola*", Appl. Microbiol. Biotechnol., 38, 6-11, 1992.
- [9] Tulloch A.P., Spencer J.F.T., Gorin P.A.J., "The fermentation of long chain compounds by *Torulopsis magnoliae* I. Structures of the hydroxyl fatty acids obtained by the fermentation of fatty acids and hydrocarbons", Can. J. Chem., 40, 1326-1338, 1962.
- [10] Rau U., Hammen S., Heckman R., Wray V., Lang S., "Sophorolipids: A source of novel compounds", Ind. Crop. Prod., 13 (2), 85-92, 2001.
- [11] Daniel H. J., Reuss M., Syltatk C., "Production of sophorolipids in high concentration from deproteinized whey and rapeseed oil in two stage fed-batch process using *Candida Bombicola* ATTC 22214 and *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509", Biotechnol. Lett., 20, 1153-1156, 1998.
- [12] Klekner V., Kosaric N., Zhou Q.H., "Sophorose lipids produced from sucrose", Biotechnol. Lett., 13, 345-348, 1991.
- [13] Zhou Q.H., Klekner V., Kosaric N., "Production of sophorose lipids by *Torulopsis bombicola* from sunflower oil and glucose", J. Oil Chem. Soc., 69, 89-91, 1992.
- [14] Jones D.F., Howe R., "Microbiological oxidation of long-chain aliphatic compounds, Part I, Alkanes and alk-1-enes", J. Chem. Soc., 2801-2808, 1968.
- [15] Deshande M., Daniels L., "Evaluation of sophorolipid biosurfactant production by *Candida Bombicola* using animal fat", Biores. Technol., 54, 143-150, 1995.
- [16] Bednarski W., Adamcz M., Tomasik J., Plaszczyk M., "Application of oil waste in the biosynthesis of glycolipids by yeast", Biores. Technol., 95, 15-18, 2004.
- [17] Brakemeier A., Wullbrant D., Merschel L., Bennighoven A., Buschmann N., "Novel sophorose lipids from microbial conversion of 2-alkanols", Biotechnol. Lett., 17, 1183-1188, 1995.
- [18] Rau U., Manzke C., Wagner F., "Influence of substrate supply on the production of sophorose lipids by *Candida Bombicola* ATTC 22214", Biotechnol. Lett., 18, 149-154, 1996.
- [19] Daniel H.J., Otto R.T., Reuss M., Syltatk C., "Production of sophorolipids from whey: Development of two stage fed-batch process with *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 and *Candida Bombicola* ATTC 22214 using deproteinized whey concentrates as substrates", Appl. Microbiol. Biotechnol., 51, 40-45, 1999.
- [20] Pekin G., Vardar-Sukan F., Kosaric N., "Production of sophorolipids from *Candida Bombicola* ATTC 22214 using Turkish corn oil and honey", Eng. Lif. Sci., 5, 4, 357-362, 2005.
- [21] Davila A.M., Marchal R., Vandecastelee J.P., "Sophorose lipid production from lipidic precursors: Predictive evaluation of industrial substrates", J. Ind. Microbiol., 13, 249-257, 1994.
- [22] Koster C.G., Heerma W., Peapermans H.A.M., Groenewegen A., Peters H., Haverkamp J., "Tandem mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy studied of *Candida bombicola* sophorolipids and product formed on hydrolysis by cutinase", Anal. Biochem., 230, 135-138, 1995.