

# **ULTRAFILTRAÇÃO COMO PROCESSO CHAVE NO DOWNSTREAM DA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR YARROWIA LIPOLYTICA**

G. C. FONTES, P. F. F. AMARAL, M. A. Z COELHO e M. H. M. ROCHA-LEÃO

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Engenharia Bioquímica  
E-mail para contato: gizelecf@yahoo.com.br

**RESUMO** - Os biossurfactantes são moléculas anfipáticas produzidas por micro-organismos. Embora apresentem diversas aplicações, seu uso é limitado pelo alto custo de produção. Visando reduzir os custos, várias tecnologias verdes vêm sendo desenvolvidas. Dentre as tecnologias, os processos de separação por membrana, como a ultrafiltração, atingiu o status de processos comerciais. Neste trabalho, o processo de ultrafiltração foi utilizado para concentração e parcial purificação do biossurfactante produzido pela *Y. lipolytica* em meio de cultivo contendo o glicerol, subproduto da produção do biodiesel. Na ultrafiltração, um volume de 0,5 litros de meio de cultivo foi concentrado a 9,4% de seu volume inicial. O retentado e o permeado apresentaram tensão superficial de 26,41 e 65,56 mN/m, respectivamente. O índice de emulsificação do retentado foi de 93,51%, sendo que no permeado não foi observado formação de emulsão. Além disso, houve a remoção de 80% do glicerol residual presente no meio de cultivo.

## **1. INTRODUÇÃO**

Surfactantes são moléculas anfipáticas amplamente utilizadas nas indústrias. Devido às suas propriedades emulsificantes e surfactantes são capazes de alterar a tensão superficial e interfacial de um líquido, servindo de matéria-prima para uma grande quantidade de produtos químicos (ZINJARDE e PANT, 2002). No entanto, a maioria dos surfactantes atualmente utilizados pelas indústrias é de origem sintética e, portanto, nociva ao meio ambiente. Além de serem tóxicos, os surfactantes sintéticos não são biodegradáveis e seu acúmulo na biosfera gera poluição e contaminações prejudiciais à saúde dos seres vivos (MORITA *et al.*, 2007).

Com o intuito de buscar produtos menos agressivos ao meio ambiente e, assim, amenizar os danos causados pelos surfactantes na biosfera, vem sendo estudado nas últimas décadas o desenvolvimento de emulsificantes microbianos (bioemulsificantes), junto às suas diversas oportunidades de aplicação (BANAT *et al.*, 2000).

Apesar de apresentarem diversas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos, como biodegradabilidade e abrangência de sua aplicação a todas as áreas da indústria química, os bioemulsificantes ainda não são amplamente utilizados. Isto se deve aos altos custos de sua produção, associados aos métodos ineficientes de recuperação do produto e ao uso de substratos caros, tornando-os, na atual circunstância, incapazes de competir economicamente com os surfactantes químicos (BANAT *et al.*, 2000).

Visando reduzir os custos do processo de separação e purificação e os impactos ambientais provocados por alguns métodos, a exemplo de precipitação com acetona e sulfato de amônia, várias tecnologias verdes vêm sendo desenvolvidas. Dentre as tecnologias, destacam-se os processos de separação por membranas (PSM), como a ultrafiltração, pois atingiram o status de processos comerciais devido a uma série de vantagens inerentes a esta tecnologia. Algumas dessas vantagens incluem: simplicidade de operação e escalonamento, separação de compostos termolábeis, seletividade e economia de energia.

A ultrafiltração, quando aplicada para o processo de separação e purificação de biossurfactante, utiliza a capacidade destes em formar micelas após certa concentração, chamada de concentração micelar crítica (CMC) (MUKHERJEE *et al*, 2006). A partir desta concentração, os biossurfactantes formam agregados relativamente estáveis chamados micelas, fazendo com que estes compostos atinjam diâmetros suficientemente grandes para que sejam separados por processos de ultrafiltração (LIN *et al*, 1997).

No Brasil, o problema econômico da produção de biossurfactantes pode ser significativamente reduzido, não só pelo uso da técnica de ultrafiltração, mas também através do uso de fontes alternativas de nutrientes, como os resíduos agroindustriais e o glicerol (subproduto da produção de biodiesel). Assim, o conhecimento de novas fontes de carbono renovável para produção de biossurfactantes e estudos das etapas de purificação pode viabilizar o seu custo de produção. O objetivo desse trabalho foi a produção de biossurfactante pela *Y. lipolytica* utilizando o glicerol, subproduto da produção do biodiesel e posterior utilização da ultrafiltração para concentração e parcial purificação do biossurfactante produzido.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Micro-organismo**

A levedura empregada no presente trabalho é uma cepa selvagem de *Yarrowia lipolytica* 583 IMUFRJ 50682 selecionada de um estuário da Baía de Guanabara no Rio de Janeiro, Brasil (HAGLER e MENDONÇA-HAGLER, 1981) e identificada pelo Instituto de Microbiologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

### **2.2. Manutenção da cultura**

As células foram conservadas a 4°C após 24 horas de crescimento em tubos de ensaio com meio YPD (“*Yeast Extract*, *Peptone*, *Dextrose*”) contendo (em p/v): extrato de lêvedo 1%, peptona 2%, glicose 2% e agar 2%.

### **2.3. Obtenção do inoculo**

A partir dos tubos contendo as células preservadas em meio sólido YPD (descrito no item 1.2) inoculava-se, de forma estéril com uma alça de platina, 200 mL de meio de cultivo YPD em erlenmeyers de 500 mL. Após cerca de 70 horas em um incubador rotatório a 28°C, 160 rpm, a absorvância (570 nm) de uma amostra deste cultivo era determinada e, em seguida as células eram centrifugadas de forma estéril a 3.000 g por 10 minutos e ressuspensas em 10 mL de meio de cultivo servindo de inóculo dos experimentos que serão descritos nos itens posteriores. O volume centrifugado desse pré-inóculo era suficiente para se obter uma concentração inicial de células de, aproximadamente,  $1,0 \pm 0,1$  mg p.s. cel/mL nos meios de cultivo, esta concentração inicial foi utilizada em todos os experimentos

### **2.4. Produção do biossurfactante**

Após as 70 horas de inoculação, as células foram ressuspensas e inoculadas em 500 mL de meio de cultivo contendo  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de sulfato de amônio,  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  de extrato de lêvedo e 3% v/v de glicerol bruto em erlenmeyers de 1 L. Os experimentos foram conduzidos em incubador rotatório (28 °C, 250 rpm) durante 96 horas.

A cada 24 horas foram retiradas duas alíquotas do meio fermentado em câmara de fluxo estéril para determinação do crescimento celular e medida da produção do biossurfactante.

### **2.5. Ultrafiltração**

A ultrafiltração por membrana filtrante plana (GE) de porosidade 1 kDa, foi utilizada para concentrar e purificar parcialmente o biossurfactante presente no líquido metabólico livre de células.

### **2.6. Medida da produção de biossurfactante**

Tensão superficial: foi realizada utilizando o tensiômetro K100 Krüss, segundo o método da placa e anel De Nöuy.

Índice de emulsificação: foi realizado, segundo Cooper e Goldenberg (1987), com algumas modificações. Este procedimento consistiu em colocar 1 mL do meio de cultura fermentado em tubo de ensaio, adicionando o mesmo volume de hexadecano, seguidos por agitação em vórtex por 2 minutos. Após 24 horas calculou-se a razão entre a altura da região emulsificada e altura total (Equação 1).

$$E_{24}(\%) = \frac{H_{EL}}{H_S} * 100 \quad (1)$$

## 2.7. Métodos analíticos

Quantificação do crescimento celular: O crescimento celular foi acompanhado através de medidas de absorvância em espectrofotômetro a 570 nm e os valores foram convertidos para mg p.s. cél/mL utilizando-se o fator de conversão obtido pela curva de peso seco.

Quantificação do substrato glicerol: A quantificação de glicerol foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Waters®). Para realização desta análise utiliza-se coluna *Aminex*® HPX- 87H, 300 x 7,8mm (*Bio-Rad Laboratories Ltd*) acoplada a uma pré-coluna trocadora de cátions (*Bio-Rad Laboratories Ltd*), detector de índice de refração (Waters 2414), bomba binária (Waters 1525), forno e módulo controlador de temperatura (Waters) e software cromatográfico *Breeze*. A fase móvel utilizada é H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5mM com vazão de 0,8 mL/min, e a temperatura da coluna mantida a 60°C. As amostras foram filtradas em membrana (Waters) com diâmetro de 0,45 µm e injetadas para a quantificação através do uso da curva padrão.

Determinação de proteína: Para a determinação do teor de proteína presente no meio de cultivo, foi utilizada a metodologia desenvolvida por Bradford (1976). Em *ependorfs*, adicionou-se 1 mL de reagente de Bradford a 0,1 mL da amostra, agitou-se e esperou-se por 2 minutos para realizar a leitura de absorvância ( $\lambda = 595$  nm) em espectrofotômetro. Para obtenção da curva de calibração de proteína, correlacionaram-se valores de absorvância obtidos a partir da leitura de soluções de albumina de soro bovino a concentrações conhecidas de proteínas, variando-se a concentração entre 0 a 400 µg de proteína/mL.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta o perfil cinético de crescimento de *Y. lipolytica* no meio de cultivo contendo o glicerol bruto proveniente da produção do biodiesel. Ao final de 96 horas de cultivo a produção de biomassa para o meio contendo glicerina bruta, tratada e pura, foi de 12,03 g.L<sup>-1</sup>. Ashby *et al.* (2005) que, ao utilizarem o subproduto da produção do biodiesel (4%) para o crescimento de *Candida bombicola*, obtiveram uma produção de biomassa de 42,5 g.L<sup>-1</sup>, e ao utilizarem glicerol puro (10% v/v) obtiveram apenas 8,7 g.L<sup>-1</sup>, indicando que possivelmente altas concentrações de glicerol no meio tem efeito inibitório no crescimento celular causado pelo estresse osmótico. Segundo Ashby *et al.* (2005) o subproduto do processo de síntese do biodiesel, a partir de óleo de soja, contém 40% de glicerol, 34% de compostos solúveis em hexano (sendo estes 92% de razão ácido graxo/metil ester de ácido graxo e 6% de MAG/DAG – monoacil glicerol/diacilglicerol) e 26% de água, mostrando que há ácidos graxos presentes.

A Figura 1 mostra também o consumo de glicerol por *Y. lipolytica* nos ensaios realizados. Ao final de 96h de cultivo o glicerol foi praticamente consumido. O glicerol é tipicamente consumido pela célula pelo transporte através da membrana celular por difusão facilitada sobre um gradiente de concentração e é sequencialmente convertido em diidroxiacetona fosfato (DHAP), um intermediário comum da via glicolítica, pela ação da glicerol quinase e glicerol fosfato desidrogenase, respectivamente. A DHAP é enzimaticamente transformada em seu

isômero gliceraldeído 3-fosfato (G3P), e ambos podem ser convertidos à glicose pela via da gliconeogênese e subsequentemente aos açúcares presentes nos biossurfactantes ou direcionar para o crescimento celular. Alternativamente, G3P pode ser convertido a piruvato para subsequente conversão a acetil-CoA, principal precursor metabólico para a biossíntese de ácido graxo (Lehninger *et al.*, 1995).

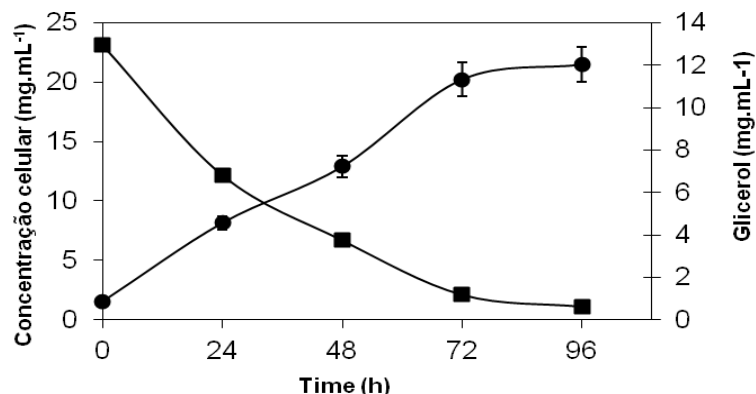


Figura 1. Perfil cinético de crescimento celular (●) e de consumo do glicerol (■) por *Y.lipolytica* em meio contendo glicerina bruta (3% v/v).

A Figura 2 apresenta a evolução da tensão superficial e do índice de emulsificação. Pode-se observar que o IE foi de 70,22% e  $\Delta TS$  de 22 mN/m, em 96 horas de cultivo. A maior produção de biossurfactante ocorreu durante a fase estacionária, porém houve produção durante a fase exponencial de crescimento celular, sendo a produção de biossurfactante considerada semi-associada ao crescimento.

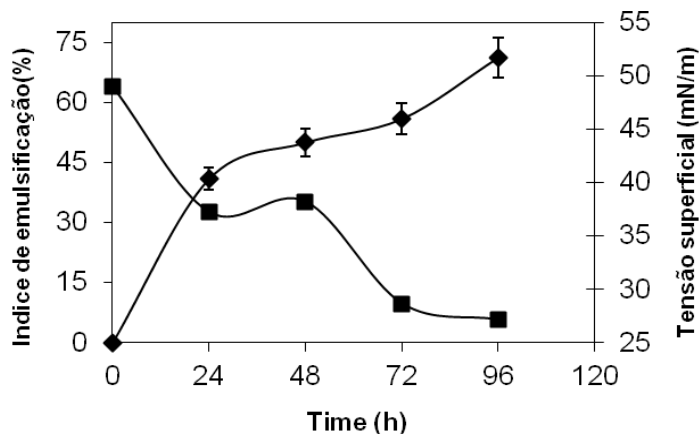


Figura 2 - Evolução do índice de emulsificação e da tensão superficial durante a produção de biossurfactante

Após as 96 horas de cultivo, o meio livre de célula foi submetido ao processo de ultrafiltração para concentração e parcial purificação do biossurfactante. Um volume de 0,5 litros de meio de cultivo foi concentrado, em média, a 9,4% de seu volume inicial, obtendo-se um fator de concentração igual a 10,6.

A determinação do biossurfactante na amostra pré-ultrafiltração, no permeado e no retido, foi realizada indiretamente pela medida da tensão superficial e índice de emulsificação. Os resultados estão apresentados na Tabela 1. Pode-se observar que a tensão superficial da amostra pré-filtração e do retentado foram similares. Esse resultado mostra que a quantidade de biossurfactante no meio de cultivo pré-filtração já atingiu a concentração micelar crítica (CMC). Segundo Saharan et al (2011), a tensão superficial de uma solução de biossurfactante, após atingir a CMC, permanece constante, mesmo com aumento da concentração do mesmo. No caso da amostra do permeado, a tensão superficial indica que existe uma pequena concentração de biossurfactante presente, pois o valor foi bem acima dos valores da tensão superficial dos biossurfactantes em suas concentrações micelares crítica que atingem tensão na faixa de 25 a 35,5 mN/m. Abaixo da CMC, as moléculas de biossurfactante encontram-se dispersas na solução, aumentando, portanto, os valores de tensão superficial.

Tabela 1 - Parâmetros avaliados pré e pós a ultrafiltração do meio de cultivo contendo o biossurfactante produzido por *Y. lipolytica*

Amostra	Tensão superficial (mN/m)	Índice de emulsificação (%)	Proteína (mg/mL)	Glicerol (mg/mL)
<b>Pré- ultrafiltração</b>	33,54 ± 1,20	80,30 ± 3,21	67,81 ± 0,60	12,32 ± 1,32
<b>Retentado</b>	26,41 ± 0,99	93,51 ± 3,21	721,55 ± 1,20	2,54 ± 0,42
<b>Permeado</b>	65,56 ± 0,80	00,00 ± 00,00	3,66 ± 1,20	9,58 ± 0,87

A Figura 3 apresenta a fotografia do índice de emulsificação do retentado e do permeado após 24 horas de repouso. Observa-se que o processo de ultrafiltração para concentração de biossurfactante mostrou-se muito eficiente, pois não foi observado emulsão no permeado.

A Tabela 1 apresenta também o conteúdo de proteína e glicerol nas amostras. Pode-se observar, que a membrana de 10 KDa utilizada na ultrafiltração das amostras foi eficiente em concentrar proteínas. Cabe ressaltar, que nem toda proteína concentrada compõe a estrutura do biossurfactante. Entretanto, o glicerol, utilizado como fonte de carbono para produção do biossurfactante pela *Y. lipolytica*, foi removido facilmente do meio de cultivo, pois apresenta baixo peso molecular.



Figura 1. Fotografia do índice de emulsificação do retentado (a) e do permeado (b)

#### 4. CONCLUSÃO

A fase glicerínica, proveniente da produção do biodiesel, suplementada com sulfato de amônio consistiu em um meio de cultura alternativo capaz de suportar o crescimento de *Y.lipolytica* e a biossíntese do surfactante. Os resultados foram bastantes satisfatórios, pois além de reduzir os custos da matéria prima, diminuem a geração de poluentes e excedentes na produção de biodiesel. Pode-se concluir também que a ultrafiltração foi um método eficiente de purificação parcial e concentração do biossurfactante presente no meio de cultivo, apresentando potencial para aplicação futura no *downstream* da produção de biossurfactante.

#### 5. REFERÊNCIAS

- ASHBY, R. D.; NUÑEZ, A.; SOLAIMAN, D. K.Y., FOGLIA, T. A. Sophorolipid biosynthesis from a biodiesel co-product stream. *Journal of the american oil chemists' society*, v. 82, p. 625–630, 2005.
- BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S.S. Potencial commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiol Biotechnology*, v. 53, p. 495 – 508, 2000.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p. 248-254, 1976.
- COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-Active Agents from Two Bacillus Species. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 53, n. 2, p. 224-229, 1987.
- HAGLER, A. N., MENDONÇA-HAGLER, L. C. Yeasts from Marine and Estuarine Waters with Different Levels of Pollution in the State of Rio de Janeiro, *Brazil. Appl Environ Microbiol.* 41(1): 173–178, 1981.
- LEHNINGER, A.; NELSON, D.L; COX, M. M. Princípios de bioquímica, 2º ed. Editora Sarvier, São Paulo, Brasil, 1995.
- LIN, S. C.; JIANG, H. J. Recovery and purification of the lipopeptide biosurfactant of *Bacillus subtilis* by ultrafiltration. *Biotechnology Techniques*, v. 11, p. 413-416, 1997.
- MORITA, T.; KONISHI, M. FUKUOKA, T.; IMURA, T.; KITAMOTO, D. Microbial Conversion of Glycerol into Glycolipid Biosurfactants, Mannosylerythritol Lipids, by a Basidiomycete Yeast, *Pseudozyma antarctica* JCM 10317T. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 104, n. 1, p. 78-81, 2007.



- MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends in Biotechnology*. v. 24, p.509-515, 2006.
- SAHARAN, B. S., SAHU, R.K., SHARMA, D. A Review on Biosurfactants: Fermentation, Current Developments and Perspectives. *Genetic Engineering and Biotechnology Journal*, v. 29, p. 13-25, 2011.
- ZINJARDE, S. S.; PANT, A. Emulsifier from a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *Journal of Basic Microbiology*, v. 42, p. 67–73, 2002.