

PRODUÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR *Yarrowia lipolytica* CULTIVADA EM FONTES ALTERNATIVAS DE CARBONO

H. L. da Silva¹, H. da S. Paltian², S. H. Duarte³

1- Escola de Química e Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande – CEP: 96203-900 – Rio Grande – RS – Brasil, Telefone: 55 (53) 98158-6012 – e-mail: (helenaleivas.silva@gmail.com)

2- Escola de Química e Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande – CEP: 96203-900 – Rio Grande – RS – Brasil, Telefone: 55 (53) 984272183 – e-mail: (hemily.s.paltian@gmail.com)

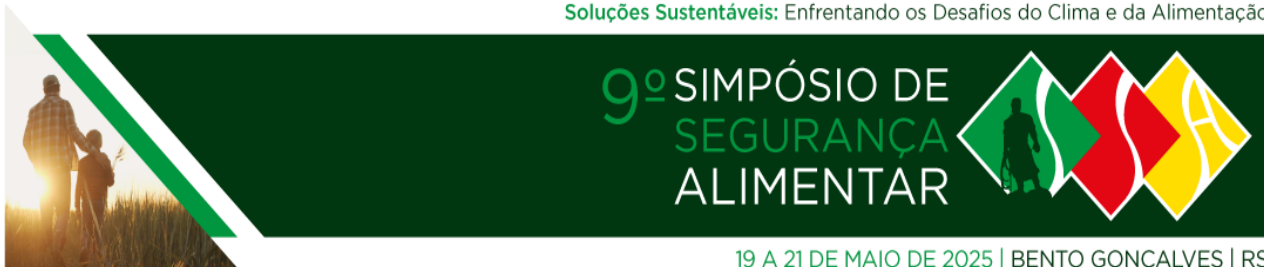
3- Escola de Química e Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande – CEP: 96203-900 – Rio Grande – RS – Brasil, Telefone: 55 (53) 999234659 – e-mail: (susanduarte@gmail.com)

RESUMO – Biossurfactantes são moléculas de característica anfipática produzidas por microrganismos, com comercialização limitada devido ao custo de produção. A levedura *Yarrowia lipolytica* possui certificação GRAS e é promissora na produção de biossurfactante. O objetivo deste trabalho foi estudar a produção de biossurfactante por *Y. lipolytica* utilizando óleo residual de fritura e glicerol residual, visando reduzir custos com substratos. A levedura foi cultivada em meio contendo: glicerol residual (3% m v⁻¹); óleo de fritura residual (4% m v⁻¹); extrato de levedura (0,5 g L⁻¹); e (NH₄)₂SO₄ (10 g L⁻¹), à 180 rpm, 30 °C por 144 h. O meio fermentado livre de células foi concentrado por ultrafiltração e as frações obtidas caracterizadas quanto ao IE e FTIR. Em 144 h de cultivo foi obtido IE de 58,21%, o qual aumentou para 61% na fração retida após a ultrafiltração. O biossurfactante produzido apresentou características de carboidrato-lipídeo-proteína.

ABSTRACT – Biosurfactants are amphipathic molecules produced by microorganisms, with limited commercialization due to production costs. The yeast *Yarrowia lipolytica* has GRAS certification and is promising for biosurfactant production. This study aimed to investigate biosurfactant production by *Y. lipolytica* using waste frying oil and residual glycerol to reduce substrate costs. The yeast was cultivated in a medium containing: residual glycerol (3% w v⁻¹); waste frying oil (4% w v⁻¹); yeast extract (0.5 g L⁻¹); and (NH₄)₂SO₄ (10 g L⁻¹), at 180 rpm, 30 °C for 144 h. The cell-free fermented medium was concentrated by ultrafiltration, and the obtained fractions were characterized in terms of EI and FTIR. After 144 h of cultivation, an EI of 58.21% was obtained, which increased to 61% in the retained fraction after ultrafiltration. The produced biosurfactant exhibited carbohydrate-lipid-protein characteristics.

PALAVRAS-CHAVE: Glicerol residual; Levedura; Óleo residual; Processos fermentativos.

KEYWORDS: Residual glycerol; Yeast; Residual oil; Fermentation processes.



19 A 21 DE MAIO DE 2025 | BENTO GONÇALVES | RS

1. INTRODUÇÃO

Os biossurfactantes são moléculas anfipáticas, característica que permite que interajam com moléculas de diferentes polaridades em superfícies e interfaces de fases distintas, reduzindo a tensão interfacial e superficial. Dentre as diversas aplicações, podem ser utilizados como emulsificantes na produção de alimentos e são alternativa sustentável à surfactantes químicos, visto que são biodegradáveis e de baixa ou nenhuma toxicidade (Qamar; Pacífico, 2023). A levedura *Yarrowia lipolytica* é um microrganismo que possui certificação GRAS (*Generally Recognized as Safe*), sendo atóxica, não patogênica, e capaz de degradar substratos hidrofóbicos e orgânicos para obtenção de energia (Mamaev; Zvyagilskaya, 2021).

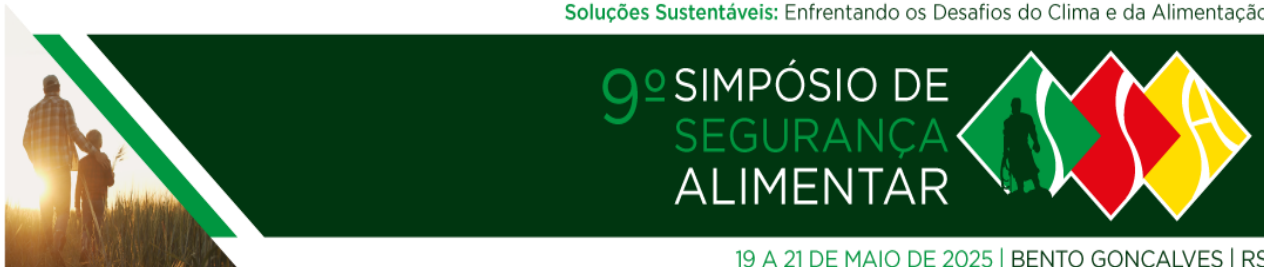
A produção de biossurfactantes apresenta desafios, especialmente em larga escala, devido ao elevado custo e baixo rendimento do processo. Entre as alternativas que podem ser aplicadas ao processo está a utilização de fontes de carbono de baixo custo como nutrientes dos meios de cultivo. A utilização de resíduos industriais em meios de cultivo pode viabilizar a produção de biossurfactantes e garantir um destino adequado aos resíduos (Qamar; Pacífico, 2023). Com a adição obrigatória de 14% de biodiesel ao diesel de petróleo no Brasil (Brasil, 2024), o grande volume de glicerol gerado como subproduto na produção não é consumido em sua totalidade, resultando na sua desvalorização no mercado (Alves; Filho; Mendes, 2017). Outro resíduo produzido em grande escala são os oleosos, como o óleo residual de fritura, sendo gerados após diversos processos de fritura e não sendo indicados para consumo humano devido características nocivas à saúde (Mendonça, 2008).

Sendo assim, o presente trabalho busca avaliar o potencial do glicerol residual e do óleo de fritura residual como fontes de carbono alternativas na produção de biossurfactante por *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-1095, além de concentrar e caracterizar parcialmente o biossurfactante produzido.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo, Manutenção da Cultura e Obtenção do Inóculo

A levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-1095 foi reativada por meio de repique em tubos de ensaio contendo ágar batata dextrose, incubados em estufa bacteriológica à 27 °C por 24 h. O inóculo foi preparado com raspagem de células de dois tubos contendo levedura e 10 mL de água destilada. As células foram transferidas para *Erlenmeyer* contendo 180 mL de meio de composição: glicose 2% m v⁻¹, glicerol 4% v v⁻¹, extrato de levedura 0,5 g L⁻¹ e (NH₄)₂SO₄ 10 g L⁻¹, e incubadas em Shaker à 30 °C, 180 rpm por 24 h.



2.2 Produção do biossurfactante

Os cultivos foram realizados pelo preparo de 180 mL de meio de composição: glicerol residual (3% m v⁻¹); óleo de fritura residual (4% m v⁻¹); extrato de levedura (0,5 g L⁻¹); e (NH₄)₂SO₄ (10 g L⁻¹). Após, inoculados com 20 mL de inóculo (10% v v⁻¹) e mantidos em Shaker (New Brunswick™, Innova® 44) à 30 °C, 180 rpm por 144 h. A concentração de biomassa, consumo de glicerol e índice de emulsificação (IE) foram acompanhados ao longo do cultivo. A concentração de biomassa foi determinada por medida de absorbância em espectrofotômetro a 600 nm, relacionando com uma curva padrão de biomassa (Liu *et al.*, 2013). A concentração de glicerol foi determinada pelo método de Bondioli e Bella (2005) e os dados apresentados com base no consumo de glicerol relativo (%). O IE foi medido segundo a metodologia de Cooper e Goldenberg (1987) na qual foram adicionados 2 mL de sobrenadante livre de células e 2 mL de óleo de soja em tubo de ensaio, e agitados em vórtex por 2 min. Após 24 h, foram medidas a altura total da emulsão (H_{EL}) e altura total do líquido (H_S), em cm, sendo o IE (%) obtido pela Equação 1.

$$IE (\%) = \frac{H_{EL}}{H_S} \times 100 \quad (1)$$

2.3 Concentração e Caracterização do Biossurfactante

O meio fermentado foi centrifugado a 2100 xg por 15 min. Após, 100 mL do sobrenadante foi destinado ao processo de ultrafiltração em membrana NADIR® UP010 P, com limite de peso molecular nominal específico de 10 kDa. Após, os meios retido e permeado foram analisados por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para identificar os grupos funcionais da estrutura química do biossurfactante produzido. As amostras de material permeado e retido foram lidas na faixa de 4000 e 1000 cm⁻¹, com resolução de 0,5 cm⁻¹.

2.4 Análise Estatística

Os cultivos foram realizados em triplicata e os resultados para consumo relativo de glicerol, concentração de biomassa e IE foram analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Tukey utilizando o software Statistica 7,0, sendo considerados valores significativamente diferentes quando $p \leq 0,05$.



3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os valores de consumo de glicerol relativo, concentração de biomassa e IE ao longo do cultivo. Os valores de IE para os tempos de 0, 120 e 144 h não apresentaram diferença significativa entre si, mas foram estatisticamente maiores que os valores de IE em 48 e 96 h. Com isso, observa-se que o cultivo inicia com valor superior de IE quando comparado aos pontos seguintes, tendo uma diminuição e posterior aumento a partir das 96 h. É possível que o meio tenha em sua composição inicial substratos com capacidade emulsificante, sendo consumido pela levedura durante seu crescimento promovendo posteriormente a produção do biossurfactante.

Tabela 1 – Valores de consumo de glicerol relativo, concentração de biomassa e índice de emulsificação obtidos para o cultivo de 144 h.

Tempo (h)	Consumo de glicerol relativo (%)	Concentração de biomassa (g L ⁻¹)	IE (%)
0	-	0,13 ± 0,03 ^c	54,86 ± 0,02 ^{a,b}
48	48,48 ± 3,06 ^d	3,98 ± 0,20 ^d	49,28 ± 0,03 ^c
96	69,17 ± 0,98 ^c	5,32 ± 0,36 ^c	50,79 ± 0,04 ^{b,c}
120	77,66 ± 3,21 ^b	6,30 ± 0,33 ^b	57,03 ± 0,05 ^{a,b}
144	88,24 ± 1,37 ^a	8,86 ± 0,10 ^a	58,21 ± 0,06 ^a
MP	-	-	45,45
MR	-	-	61,00

Letras minúsculas sobrescritas iguais na mesma coluna indicam que as médias diferem estatisticamente ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$). MR – Meio retido pós ultrafiltração; MP – Meio permeado pós ultrafiltração.

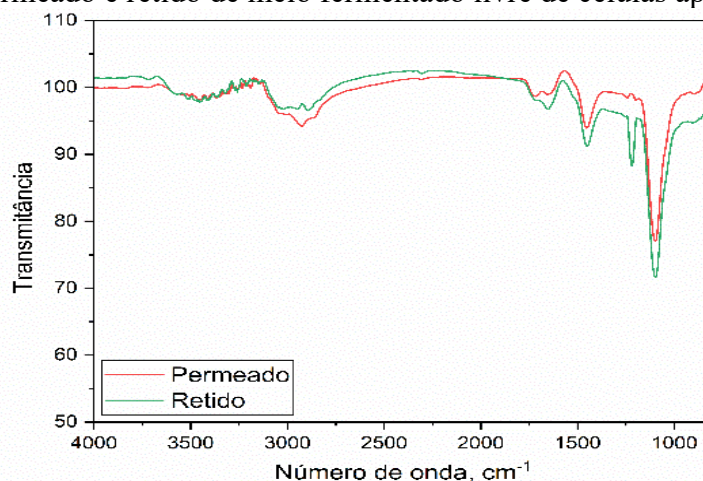
A levedura não atingiu sua fase estacionária de crescimento, visto os valores crescentes de concentração de biomassa. Isso indica que ainda havia fonte de nitrogênio e carbono disponíveis, sendo estas necessárias para o crescimento celular, a qual é confirmada pelo consumo de glicerol relativo de 88,24% em 144 h. Tendo em vista que o glicerol é de mais fácil assimilação e que ainda estava presente no meio, é possível que o óleo residual de fritura não tenha sido consumido ou consumido em pequena quantidade. Os biossurfactantes podem ser liberados no meio durante a fase exponencial ou estacionária de crescimento ou se manter aderidos à parede celular para facilitar o acesso de compostos hidrofóbicos ao interior da célula (Santos, 2019). Logo, torna-se necessário avaliar a produção de biossurfactante em maior tempo de cultivo com a finalidade de atingir a fase estacionária, além de quantificar o biossurfactante possivelmente aderido à parede celular.

A Figura 1 mostra os dados obtidos para a análise de FTIR para as frações retido e permeado obtidas após ultrafiltração do meio fermentado livre de células. As curvas para as diferentes frações



apresentaram composições estruturais similares. É possível verificar picos nas faixas de 1700 a 1000 cm^{-1} , com alongamentos característicos de C-O-C (entre 1250 cm^{-1} e 1100 cm^{-1}), que indicam a presença de carboidratos. Alongamentos do tipo N-H são observados próximos da faixa de 1500 cm^{-1} , caracterizando a presença de proteínas. As faixas de 3000 e 1714 cm^{-1} são características de ligações NH_2 e $\text{C}=\text{O}$, sugerindo presença de proteínas e ésteres de lipídeo, respectivamente (Alves *et al.*, 2017). Estes dados indicam a presença de um biossurfactante polimérico do tipo carboidrato-lipídeo-proteína.

Figura 1 – Análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier para as amostras de permeado e retido de meio fermentado livre de células após ultrafiltração.



Considerando que o FTIR se trata de uma análise qualitativa, não é possível afirmar que as concentrações de biossurfactante em ambas as frações são equivalentes. Porém, considerando que o meio retido apresentou IE superior ao meio permeado (Tabela 1), acredita-se que a ultrafiltração permitiu a concentração do biossurfactante presente no meio fermentado. Entretanto, há a necessidade de análises complementares para quantificar e confirmar a concentração por ultrafiltração.

4. CONCLUSÕES

Os maiores valores de concentração de biomassa (8,86 g L^{-1}) e IE (58,21%) foram obtidos em 144 h de cultivo, e o IE aumentou para 61% na fração retida após a ultrafiltração do meio fermentado livre de células. O material retido e permeado, obtidos após processo de ultrafiltração, apresentaram características estruturais semelhantes indicando um biossurfactante polimérico do tipo carboidrato-lipídeo-proteína. Os resultados indicam que a levedura *Yarrowia lipolytica* possui



capacidade de produção de biossurfactante utilizando resíduos como fontes alternativas de carbono de baixo custo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, A. P.; FILHO, G. M. R.; MENDES, M. F. Avaliação técnica de diferentes processos de separação para purificação do glicerol como subproduto – Revisão. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 6, n. 5, p. 955-982, 2017.

ALVES, E. P.; TAVARES, L. B. B.; GERN, R. M. M.; SILVA, D. A. K.; FURLAN, S. A.; WISBECK, E. Produção e caracterização de biossurfactantes metabolizados por *Pleurotus sajor-caju* a partir de óleo de soja. **Revista Matéria**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 3, 2017.

BONDIOLI, P.; BELLA, L. D. An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel. **European Journal Lipid Science and Technology**, v. 107, p. 153-157, 2005.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. **Mistura de 14% de biodiesel no diesel começa a valer nesta sexta-feira**. fev. 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/mme/pt-br/assuntos/noticias/mistura-de-14-de-biodiesel-no-diesel-comeca-a-valer-nesta-sexta-feira#:~:text=Desta%20forma%2C%20o%20diesel%20que,1%20C%20BA%20de%20mar%20C3%A7o%20de%202025>. Acesso em: 23 jun. 2024.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 224-229, 1987.

LIU, Z.; GAO, Y.; CHEN, J.; IMANAKA, T.; BAO, J.; HUA, Q. Analysis of metabolic fluxes for better understanding of mechanisms related to lipid accumulation in oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum*. **Bioresource technology**, v. 130, p. 144-151, 2013.

MAMAEV, D.; ZVYAGILSKAYA, R. *Yarrowia lipolytica*: a multitasking yeast species of ecological significance. **FEMS Yeast Research**, v. 21, n. 2, mar. 2021.

MENDONÇA, M. A. **Efeito do binômio tempo/temperatura sobre a fração lipídica de óleos vegetais submetidos a processos de frituras**. Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana) – Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

QAMAR, S. A.; PACIFICO, S. Cleaner production of biosurfactants via bio-waste valorization: A comprehensive review of characteristics, challenges, and opportunities in bio-sector applications. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [S.l.], v. 11, p. 111555, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.111555>. Acesso em: 2 mar. 2025.

SANTOS, F. F. **Produção e caracterização parcial de biossurfactante por *Yarrowia lipolytica* em resíduos agroindustriais com potencial aplicação na indústria de alimentos**. Dissertação (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.