

# BIOSURFACTANTS RECOVERY THROUGH MEMBRANE SEPARATION PROCESS

*Ângela Carolina Cappellaro, Thaís Strieder Machado, Andressa Decesaro, Alan Rempel, Luciane Maria Colla, Christian Oliveira Reinehr*

Universidade de Passo Fundo - UPF

Curso de Engenharia Ambiental - Faculdade de Engenharia e Arquitetura - Passo Fundo, RS  
angelzir@hotmail.com, thais.strieder@hotmail.com, andressa\_decesaro@hotmail.com,  
alan.rempel@hotmail.com, lmcolla@upf.br, reinehr@upf.br

**Abstract.** During the process of cheese fabrication, have been a high generation of residue with high pollution potential, among them the milk serum, that even after the ultrafiltration still presenting high average of milk-sugar and salts. These residues can be used in biosurfactants production, like alternative sources for culture means of the microorganisms, reducing production costs. To application of these biocompounds is necessary its recuperation, like the separation using the membranes. This way, the objective is recovery the biosurfactant produced by *Bacillus pumilus* in culture means composed with permeated of ultrafiltration of milk serum, through the process of separation using microfiltration membranes. The permeated of ultrafiltration was characterized and used in the culture means to submerge fermentation for 5 days. After that, was done the recovery through the process of separation of the membranes with pore 0,4  $\mu\text{m}$ , being analyzed the superficial tension and emulsifying activity to the fraction of brute, retained and permeated. The fraction of retained presented reduction of superficial tension from 33,39 mN/m to 27,79 mN/m, emulsifying activity oil in water 1,83 UE and water in oil 41,40 UE, both to organic phase of diesel. Therefore, the membrane of microfiltration with pore 0,4  $\mu\text{m}$  proved it was efficient to recovery the biosurfactant.

**Palavras-chave:** *Biosurfactantes, permeado da ultrafiltração, membranas.*

## 1. INTRODUÇÃO

Os biossurfactantes são compostos de origem microbiana, com alta capacidade emulsificante e de redução da tensão superficial, além de apresentarem características de biodegradabilidade, baixa toxicidade e estabilidade em valores extremos de pH, temperatura e salinidade [1], o que contribui para o seu uso em processos de biorremediação, atuando como bioestimulante no meio. Devido aos altos custos de produção, busca-se estudar alternativas economicamente viáveis que viabilizem a produção em larga escala, como por exemplo, o uso de substratos de origem agroindustrial.

O Brasil é considerado um dos maiores produtores mundiais de leite, gerando resíduos com alto potencial poluidor, dentre eles o soro de leite. O soro de leite pode ser utilizado para a fabricação de produtos secundários, como o concentrado proteico, que mesmo após a ultrafiltração, apresenta elevados teores de sais e lactose [2], que podem ser utilizados como fontes alternativas de nutrientes em processos biotecnológicos.

A recuperação do biossurfactante é outra etapa que possui elevados custos, sendo esta responsável por cerca de 60% do custo total de produção [3]. O processo de separação por membranas pode ser utilizado para esta recuperação, pois conforme Strathmann et al. [4], este método apresenta simplicidade de operação e economia de

energia, viabilizando o uso em escala industrial.

Desta maneira, objetivou-se recuperar o biossurfactante no meio de cultivo composto de permeado da ultrafiltração do soro de leite por processo de separação por membranas.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Caracterização do permeado**

O permeado da ultrafiltração do soro de leite foi caracterizado através das análises físico-químicas de nitrogênio livre, lactose, proteína, cinzas, sólidos totais e pH.

### **2.2 Produção do biossurfactante**

Em erlenmeyers foram adicionados 50 mL de meio PC (*Plate Count*), juntamente com duas alçadas do microrganismo *Bacillus pumilus*, previamente isolado de uma amostra de solo contaminado por hidrocarbonetos, incubados a 30 °C por 48 h, para ativação da bactéria.

Para a fermentação, o permeado da ultrafiltração passou por um pré-tratamento, sendo acidificado até pH 4, aquecido a 100 °C e ajustado o pH em 7, para precipitação das proteínas. Após, foi filtrado em algodão e o sobrenadante foi autoclavado e adicionado aos demais componentes do meio de cultivo. Os componentes no meio de cultivo foram estudados anteriormente [5], determinando-se a melhor condição de cultivo, sendo estas: 1% de sulfato de amônio, 2% de óleo de soja e adição de solução de micronutrientes (composto de Br, Cu, Mn e Zn), conforme Praveesh et al.[6] . A fermentação submersa ocorreu com a adição de 50 mL do permeado da ultrafiltração, adicionados dos demais nutrientes, e 2 mL de inóculo, com incubação em agitador orbital a 30 °C durante 5 dias.

### **2.3 Recuperação do biossurfactante**

Após a fermentação, o meio fermentado foi autoclavado, para destruição térmica dos microrganismos presentes, e retirada amostra para determinação da tensão superficial do extrato bruto. A recuperação do biossurfactante foi realizada através de processos de separação com membranas.

As filtrações ocorreram tangencialmente e foram realizadas em temperatura ambiente, sendo a vazão de alimentação constante e a pressão medida por um manômetro. Foram utilizadas duas membranas planas: a primeira para retirada de partículas grosseiras, de acetato de celulose e de poro 20 µm; e a segunda para a recuperação com membrana hidrofílica e constituída de fluoreto de polivinilideno (PVDF) com poro de 0,4 µm. Ao final da sequência de filtrações, foram determinadas a tensão superficial e atividade emulsificante para as frações de permeado e retido obtidas na microfiltração.

### **2.4 Determinação da tensão superficial**

A determinação de tensão superficial foi realizada pelo método do anel *Du-Nuoy's ring method*, em amostras centrifugadas a 5000 rpm por 20 min, para obter-se o meio livre de células.

### **2.5 Determinação da atividade emulsificante**

De acordo com os métodos propostos por Martins et al. [7] e Decesaro et al. [8], a produção de biossurfactante foi determinada através da atividade emulsificante (AE) água em óleo (A/O) e óleo em água (O/A), realizadas para os extratos bruto, retido e permeado, resultantes da filtração. Em tubos de ensaio, foram adicionados 3,5 mL do extrato e 2 mL da fase orgânica da emulsão (diesel ou gasolina), sendo agitado por 1 min e deixadas em repouso por 1h para leitura de absorbância da emulsão O/A em espectrofotômetro a 610 nm, obtida pela Eq. (2). A leitura da altura da emulsão A/O foi medida após 24h, e calculada pelas Eq. (3) e Eq. (4). As amostras de branco foram

obtidas com água destilada em substituição dos extratos.

$$AE_{O/A} = (ABS_{amostra} - ABS_{branco}) \quad (1)$$

$$E = (h_{emulsão} / h_{total}) \times 100 \quad (2)$$

$$AE_{A/O} = (E_{amostra} - E_{branco}) \quad (3)$$

Sendo:

E = Relação centesimal entre a altura da emulsão A/O e a altura total;

ABS = Absorbância.

## 2.6 Tratamento dos dados

O tratamento dos dados foi realizado através da análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias de Tukey, com nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 3.1 Caracterização do resíduo

Os resultados das análises físico-químicas do permeado da ultrafiltração do soro de leite utilizado no meio de cultivo são apresentados na Tabela 1. Pode-se verificar a alta concentração de lactose e sólidos totais (açúcares), e pouca proteína, havendo a necessidade de adição de outra fonte de nitrogênio ao meio, como o sulfato de amônio.

Tabela 1. Caracterização do permeado da ultrafiltração do soro de leite

Parâmetro	Permeado da ultrafiltração
Nitrogênio livre (g/100g)	0,03±0,01
Lactose (g/100g)	3,93±0,38
Proteína (g/100g)	0,28±0,04
Cinzas (g/100g)	0,38±0,08
Sólidos totais (g/100g)	4,31±0,35
pH	6,50±0,04

### 3.2 Avaliação da tensão superficial

Os resultados de tensão superficial obtidos no processo de recuperação do

biossurfactante são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Recuperação do biossurfactante através da tensão superficial das frações do processo de separação por membranas

Extrato da microfiltração	Tensão superficial (mN/m)
Bruto	33,39±0,33 <sup>b</sup>
Permeado	39,22±0,59 <sup>c</sup>
Retido	27,79±0,86 <sup>a</sup>

Letras iguais indicam que não apresentaram diferença significativa ao nível de 95% de confiança.

Observa-se que a menor tensão superficial foi obtida na fração de retido (27,79 mN/m), demonstrando que a membrana de microfiltração teve capacidade de separar o biossurfactante do meio. Em estudos semelhantes, Mano [9] determinou tensão superficial para o retido de cerca de 27 mN/m utilizando ultrafiltração com membrana de 30 kDa para *Bacillus subtilis*, confirmando a eficiência do processo de separação por membranas na purificação do biossurfactante.

### 3.3 Avaliação da atividade emulsificante

Na determinação da atividade emulsificante em fases orgânicas de diesel e gasolina, destacam-se os resultados de diesel, demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3. Recuperação do biossurfactante através da atividade emulsificante na amostra bruta e frações do processo de separação por membranas

Parâmetro	Amostra	AE (UE)
AE O/A gasolina	Bruto	0,26±0,01 <sup>b</sup>
	Permeado	0,09±0,05 <sup>a</sup>
	Retido	1,01±0,01 <sup>c</sup>
AE O/A diesel	Bruto	0,75±0,05 <sup>a</sup>
	Permeado	0,52±0,08 <sup>a</sup>
	Retido	1,83±0,24 <sup>b</sup>
AE A/O gasolina	Bruto	ND
	Permeado	ND
	Retido	33,42±2,34 <sup>a</sup>
	Bruto	ND

AE A/O diesel	Permeado	ND
	Retido	41,40±0,26 <sup>a</sup>

Letras iguais na mesma coluna para cada parâmetro indicam que não apresentaram diferença significativa ao nível de 95% de confiança. ND: não detectado

Destacam-se os resultados obtidos para a atividade emulsificante O/A para a fração do retido, com a utilização de ambas fases orgânicas. Da mesma forma, para a atividade A/O os resultados do retido para gasolina e diesel tiveram maior formação de emulsão, visto que nos extratos bruto e permeado não houve esta formação.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pode-se perceber que o processo de separação por membranas utilizando membrana de poro 0,4 µm mostrou-se eficiente na recuperação de biossurfactante do meio, pois as frações de retido apresentaram redução da tensão superficial em comparação aos extratos brutos. Portanto, o meio composto pelo permeado da ultrafiltração do soro de leite foi eficiente na produção de biocompostos.

#### Agradecimentos

À Universidade de Passo Fundo - UPF e a todos que contribuíram para realização deste trabalho.

#### REFERÊNCIAS

- [1] PINTO, Marta H.; MARTINS, Roberta G.; COSTA, Jorge A. V. “Avaliação cinética da produção de biossurfactantes bacterianos.” *Química Nova*, vol. 32, no. 8, p. 2104-2108, 2009.
- [2] PEREIRA, Ivan O. “Análise e otimização do processo de ultrafiltração do soro de leite para produção de concentrado protéico.” Tese de mestrado em engenharia de alimentos – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Bahia, 2009.
- [3] SILVA, S. N. R. L.; FARIAS, C. B. B.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SARUBBO, L. A. “Colloids and Surfaces B: Biointerfaces”, 2010.

[4] STRATHMANN, H.; GIORNO, L.; DRIOLI, E. “An introduction to membrane science and technology.” *Consiglio Nazionale delle Ricerche*, Roma, p. 394, 2006.

[5] MACHADO, Thaís S. “Produção de biossurfactantes bacterianos utilizando permeado da ultrafiltração de soro de leite.” *Pesquisa aplicada*, Curso de Engenharia Ambiental – Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, 2015.

[6] PRAVEESH B. V.; SONIYAMBY A.R.; MARIAPPAN C.; KAVITHAKUMARI P.; PALANISWAMY M.; LALITHA S. “Biosurfactant Production by *Pseudomonas* Sp from Soil Using Whey as Carbon Source.” *New York Science Journal*, v. 4, n. 4, p. 99-103, 2011.

[7] MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; BERTOLI, T. E.; COSTA, J. A. “Solid state biosurfactant production in a fixed-bed column bioreactor.” *Zeitschrift für Naturforschung*, v. 61c, p. 721 – 726, 2006.

[8] DECESARO, A.; RIGON, M. R.; THOMÉ, A.; COLLA, L. M. “Produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de solo contaminado com óleo diesel.” *Quim. Nova*, vol. 36, n. 7, pg. 947-954, 2013.

[9] MANO, Mario C. R. “Estudo da recuperação, concentração e purificação de biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis*.” Tese de mestrado – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas – SP, 2008.