

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO GAMA-POLIGLUTÂMICO ATRAVÉS DO
APROVEITAMENTO DE SORO DE LEITE E DE GLICEROL RESIDUAL DE
BIODISEL**

CAROLINA MONTAGNER SCHMAEDECKE

Porto Alegre

2010

CAROLINA MONTAGNER SCHMAEDECKE

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO GAMA-POLIGLUTÂMICO ATRAVÉS DO
APROVEITAMENTO DE SORO DE LEITE E DE GLICEROL RESIDUAL DE
BIODISEL**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal do Rio Grande do Sul –
UFRGS, como requisito parcial para a obtenção do
título de Engenheira de Alimentos.

Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub
Orientador

Prof^a. Dr^a. Suse Botelho da Silva
Co-orientadora

Porto Alegre
2010

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO GAMA-POLIGLUTÂMICO ATRAVÉS DO
APROVEITAMENTO DE SORO DE LEITE E DE GLICEROL RESIDUAL DE
BIODISEL**

CAROLINA MONTAGNER SCHMAEDECKE

Trabalho de Diplomação apresentado como pré-requisito para a obtenção do título de
ENGENHEIRA DE ALIMENTOS pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Marco Antonio Záchia Ayub (Orientador)

Dr. Biotechnology - University Of Manchester - Institute Of Science And Technology

Suse Botelho da Silva (Co-orientadora)

Dr^a. em Engenharia Química - UFRGS

Plinho Francisco Hertz

Dr. em Ciência dos Alimentos - UFRGS

Nicole Teixeira Sehnem

Me. em Microbiologia Industrial - UFRGS

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu noivo Carlos, pelo imenso carinho, amor e apoio durante esses seis anos de faculdade e de namoro. Ele foi provavelmente a pessoa que mais me deu forças e incentivos e que mais demonstrou orgulho por mim. Agradeço também pela compreensão nos momentos em que os estudos exigiram a minha total atenção.

Agradeço aos meus pais por terem me dado todas as condições necessárias para que eu me empenhasse nos meus estudos e por terem me ajudado a completar mais esta etapa da minha vida. Obrigada por sempre terem feito de tudo por mim, para que eu não precisasse me preocupar com outra coisa a não ser com me preparar bem para ter o melhor futuro profissional possível. Amo muito vocês!

Agradeço a Suse, que foi a pessoa que mais me ajudou na elaboração deste trabalho e que me ensinou muito sobre a rotina no laboratório. Foi um grande aprendizado pra mim ter sido sua bolsista de iniciação científica durante quase dois anos. E ao professor Ayub, por todo auxílio e dedicação desprendida na orientação desta monografia e por todos os conhecimentos transmitidos.

Agradeço a todos meus professores pela competência e pelo empenho em passar sempre os ensinamentos da maneira mais eficiente possível e por estarem sempre a disposição para esclarecerem dúvidas fora do horário de aula.

Agradeço aos meus colegas de aula e de laboratório que tornaram a universidade um lugar mais divertido.

Agradeço a banca, prof. Plinho e Nicole, que se dispuseram a ler o meu trabalho e a contribuir para a melhoria do mesmo.

Dedico este trabalho a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para o meu aprendizado e crescimento durante os anos da faculdade.

RESUMO

O ácido γ -poliglutâmico (γ -PGA) é um biopolímero aniônico produzido por microrganismos do gênero *Bacillus* em cultivo sólido ou submerso. Esse polímero é biodegradável, comestível, atóxico para humanos e para o ambiente e solúvel em água. Por estas e outras características ele pode ser aplicado nas indústrias de alimentos, química e farmacêutica e nas áreas médica e ambiental. Este trabalho teve como objetivo avaliar a utilização de soro de leite, de concentrado protéico de soro de leite e de glicerol residual de biodiesel na produção de γ -PGA por *Bacillus subtilis* BL53, a fim de reduzir os custos de produção e aproveitar alguns descartes da indústria. Após 96h de cultivo, foi obtido 2,8 g/L de γ -PGA quando utilizado um meio de cultivo contendo 3% (p/v) de concentrado protéico de soro e 97 g/L de glicerol residual de biodiesel. O custo deste meio foi 76% mais baixo do que o custo do Caldo E, geralmente utilizado para a produção de γ -PGA. Os resultados mostraram que existe potencial para o uso do soro de leite, do concentrado protéico de soro e do glicerol residual de biodiesel como componentes do meio de cultivo para a produção de γ -PGA.

Palavras-chave: Ácido γ -poliglutâmico. Soro de queijo. Glicerol residual. Resíduo industrial. Bioprocessos.

ABSTRACT

The poly- γ -glutamic acid (γ -PGA) is an anionic biopolymer produced by *Bacillus sp* in solid and submerged cultures. The γ -PGA has properties that allow it to be biodegradable, edible and nontoxic to humans and the environment and water soluble. For these and other features, it can be applied in food, chemical, pharmaceutical, medical and environmental areas. This study aimed to analyze the potential use of whey, whey protein concentrate and crude glycerol derived from biodiesel into the production of γ -PGA by *Bacillus subtilis* BL53 in order to reduce costs of the production and to use industrial residues. After 96h of culture, it was obtained 2.8 g/l of γ -PGA when it was used a culture medium containing 3% (w/v) whey protein concentrate and 97 g/l of crude glycerol. The cost of this medium was 76% lower than the cost of Broth E generally used for the production of γ -PGA. The results showed the potential for using these substrates in medium of culture in replacement of components of Broth E.

Keywords: Poly- γ -glutamic acid. Whey. Crude glycerol. Industrial residue. Bioprocesses.

SUMÁRIO

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1	ÁCIDO γ -POLIGLUTÂMICO (γ -PGA)	9
1.1	Aplicações do γ -PGA.....	12
1.2	Produção de γ -PGA.....	15
2	RESÍDUOS DA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS.....	18
2.1	Soro de leite.....	20
2.1.1	<i>Produção e capacidade poluente do soro de leite</i>	21
2.1.2	<i>Processamento do soro de leite em pó</i>	23
2.1.3	<i>Aplicações do soro de leite</i>	25
2.2	Glicerol e glicerina.....	26
2.2.1	<i>Glicerina oriunda do biodiesel</i>	26
2.2.2	<i>Aplicações do glicerol</i>	28

ARTIGO

1	INTRODUÇÃO.....	34
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
2.1	Microrganismos.....	36
2.2	Manutenção e reativação das culturas.....	36
2.3	Condições de cultivo.....	37
2.4	Hidrólise enzimática.....	38
2.5	Determinação do ácido γ -poliglutâmico.....	39
2.6	Determinação da pressão osmótica dos meios de cultivo.....	39
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
3.1	Produção de γ -PGA.....	39
3.2	Custos dos meios de cultivo.....	44
4	CONCLUSÕES.....	46
	REFERÊNCIAS.....	47

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 Ácido γ -poliglutâmico (γ -PGA)

O ácido poliglutâmico (PGA) é um polímero aniônico que pode ser utilizado em diversas aplicações. Esse polímero pode ser caracterizado por sua massa molecular, pela relação entre os monômeros D- e L-ácido glutâmico e pelo grupo carboxil (α ou γ) ligado ao peptídeo. (BUESCHER; MARGARITIS, 2007). O ácido γ -poliglutâmico (γ -PGA) é um γ -polipeptídeo que apresenta um grupo carboxílico no carbono quiral da cadeia principal. A Figura 1 mostra a sua estrutura química (ARPAL, 2004).

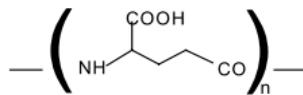


Figura 1 - Estrutura do ácido γ -poliglutâmico

Fonte: Arpal (2004)

Existem dois tipos de ácido poliglutâmico, o γ -PGA, que é composto por ácidos glutâmicos unidos por ligações γ , e o α -PGA, onde existem ligações α . O α -PGA pode ser obtido através de síntese química, enquanto que o γ -PGA é produzido somente por fermentação microbiana e ocorre naturalmente no *natto*, alimento japonês que consiste em soja fermentada. No *natto*, o γ -PGA é produzido pelo *Bacillus subtilis natto* (NOGUCHI et al., 2001).

O *natto* é um produto obtido pela fermentação de grãos de soja cozidos, consumido no Japão, porém, produtos parecidos são feitos na Tailândia e na China. Ele possui uma consistência viscosa característica, decorrente da presença de ácido γ -poliglutâmico (γ -PGA) e de levana (SCHALLMEY; SINGH; WARD, 2004). A levana é um polissacarídeo que representa aproximadamente 20% da mucilagem do *natto* (XU et al., 2006).

O *natto* apresenta propriedades antibióticas, provavelmente devido à atividade de lise bacteriana. Além disso, o consumo de *natto* durante a lactação mostrou ser responsável por um aumento no teor de vitamina K no leite materno. Culturas de *Bacillus subtilis (natto)* são capazes de eliminar bactérias patogênicas do intestino e, em ensaios de laboratório, o *natto* apresentou atividade anti carcinogênica e foi capaz de reduzir a pressão sanguínea (SCHALLMEY; SINGH; WARD, 2004).

Portanto, o ácido γ -poliglutâmico é uma macromolécula produzida por *Bacillus* sp, que produz soluções muito viscosas e que possui uma estrutura composta por 5.000 a 10.000 unidades de D- e L- ácido glutâmico conectadas por ligações γ -amida entre os grupos α -amino e γ -carboxílico. (TANIGUCHI et al., 2005). O γ -PGA pode conter apenas D-glutamato, apenas L-glutamato ou ambos os enantiômeros (CANDELA; FOUET, 2006). Provavelmente a concentração de D- e L-ácidos glutâmicos seja dependente dos cátions bivalentes presentes no meio de cultivo (LEONARD et al., apud CANDELA; FOUET, 2006).

Além do γ -PGA ser variável quanto à composição estereoquímica, ele também é variável quanto a massa molecular (ASHIUCHI; KAMEI; MISONO, 2003). Sua massa molecular geralmente varia de 100.000 a 1.000.000. (KUNIOKA, 2004). Essa variação ampla é devido às diferentes condições de cultivo e microrganismos utilizados na produção do polímero (BUESCHER; MARGARITIS, 2007). O tamanho dos filamentos de γ -PGA também varia dependendo do organismo produtor da molécula e dos métodos utilizados de análise e de purificação (CANDELA; FOUET, 2006).

O γ -PGA foi isolado pela primeira vez em 1913 por Sawamura, quando foi descoberto como componente da parede celular do *Bacillus anthracis* e passou a ser considerado um polímero tóxico e causador de doenças. Em 1942 Bovarnick o descobriu como componente extracelular produzido pela fermentação do *Bacillus licheniformis* e em 1963 foi descoberto por Fujii em um tradicional alimento japonês chamado de *natto* (ARPAL, 2004).

Diversas espécies de *Bacillus* são capazes de produzir γ -PGA no final da fase log e início da fase estacionária (MAKINO et al., 1988 apud BUECHER; MARGARITS, 2007). O polímero é secretado através da parede celular, forma cápsula durante o crescimento do microrganismo e também pode ser excretado no meio de cultivo como um produto da fermentação. Este meio se torna altamente viscoso, pois o γ -PGA possui alta massa molecular (DO; CHANG; LEE, 2001; XU et al., 2005; SHIH; VAN, 2001).

O γ -PGA pode ser útil como polímero de reserva, para a produção de biofilme e para proteger o microrganismo da fagocitose e de altas concentrações de sal (KOCIANOVA et al, 1995 apud BUECHER; MARGARITS, 2007).

As espécies de *Bacillus* são organismos atrativos para a indústria, pois possuem uma alta taxa de crescimento, o que permite curtos ciclos de fermentação, pela sua capacidade de secretar proteínas para o meio extracelular e por possuírem *status* de microrganismo GRAS (*generally regarded as safe*) pela Food and Drug Administration para espécies como *B. subtilis* e *B. licheniformis*. Sendo GRAS, os produtos obtidos dessas espécies são seguros para

serem utilizados em alimentos e medicamentos (SCHALLMEY; SINGH; WARD, 2004; BUESCHER; MARGARITIS, 2007; NOGUCHI et al., 2001).

Apenas algumas bactérias, a maioria do gênero *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. anthracis* e *S. epidermidis*) foram relatadas como possuidoras dos genes requeridos para a síntese do γ -PGA (CANDELA; FOUET, 2006). Se o γ -PGA é associado com a superfície da bactéria e forma cápsula, então os genes correspondentes são chamados de “cap” (de cápsula), porém, os genes são chamados de “pgs” (de poliglutamato-sintase) se o γ -PGA é liberado para o meio extracelular (URUSHIBATA et al., 2002 apud CANDELA; FOUET, 2006). Provavelmente o γ -PGA seja produzido no citoplasma e depois transportado até a superfície das bactérias. Os genes CapB/PgsB e CapC/PgsC parecem estar envolvidos na síntese do γ -PGA enquanto os genes CapA/PgsAA e CapE/PgsE são necessários para o transporte (CANDELA; FOUET, 2006).

O *Bacillus anthracis* produz apenas D- γ -PGA (MAKINO et al., 1989 apud ASHIUCHI et al., 2004) e a *Natrialba egyptiaca* produz apenas L- γ -PGA (HEZAYEN, 2001 apud ASHIUCHI et al., 2004). Porém, o *Bacillus anthracis* e a *Natrialba egyptiaca* não podem ser utilizados para a produção do γ -PGA devido a sua toxicidade/patogenicidade e a dificuldades no seu cultivo (ASHIUCHI et al., 2004; BUESCHER; MARGARITIS, 2007).

O γ -PGA também foi identificado no *Natronococcus occultus* (NIEMETZ et al., 1997 apud KING; BLACKER; BUGG, 2000) e no neumatóide *Hydra* (WEBER, 1990 apud KING; BLACKER; BUGG, 2000). O D- γ -PGA do *Bacillus anthracis* o ajuda a invadir o sistema imunológico de mamíferos e o L- γ -PGA da *Natrialba egyptiaca* protege as suas células da drástica desidratação que ocorre em condições extremamente salinas. Já o L- γ -PGA produzido pela *Hydra* ajuda a regular a sua pressão osmótica interna (ASHIUCHI; MISONO, 2002 apud ASHIUCHI et al., 2004).

Os *Bacillus licheniformis* (PÉREZ-CAMERO, 1999 apud ASHIUCHI et al., 2001), *B. megaterium* (TORII, 1959 apud ASHIUCHI; KAMEI; MISONO, 2003) e *B. subtilis* (TANAKA et al., 1997 apud ASHIUCHI et al., 2001) produzem um γ -PGA que contém ambos os enantiômeros (D- e L-ácidos glutâmicos). Já o *B. halodurans* produz apenas L- γ -PGA (AONO, 1987 apud ASHIUCHI, KAMEI; MISONO, 2003).

Tanto o γ -PGA do *B. anthracis* quanto o do *Staphylococcus epidermidis* permite que essas bactérias escapem da fagocitose e atua como um fator de virulência. O γ -PGA capsular também protege os microrganismos do ataque de anticorpos, de infecções e de peptídeos

antimicrobianos, possivelmente por atuar como barreira seletiva (KOCIANOVA et al., 2005 apud CANDELA; FOUET, 2006).

As bactérias do solo (a maioria *Bacillus*, mas excluindo o *B. anthracis*), liberam o γ -PGA para que ele seqüestre os íons metálicos tóxicos do ambiente, aumentando a sua resistência à ambientes adversos (MCLEAN et al., 1990 apud CANDELA; FOUET, 2006).

O γ -PGA pode ser quimicamente degradado pela exposição prolongada a um valor extremo de pH em altas temperaturas, fisicamente pela irradiação ultrassônica e enzimaticamente. Porém, o γ -PGA é estável a temperaturas menores do que 60°C e na presença da maioria das proteases (OPPERMANN-SANIO; STEINBUCHER, 2002 apud BUESCHER; MARGARITIS, 2007). O γ -PGA é resistente às proteases porque elas clivam apenas ligações α -amina (do α -PGA) e não γ -amina (CANDELA; FOUET, 2005 apud CANDELA; FOUET, 2006).

1.1 Aplicações do γ -PGA

O γ -PGA é um biopolímero que apresenta vantagens sobre as poliamidas convencionais: pode ser obtido mediante biosíntese e é biodegradável. Existe ainda o fato de apresentar propriedades como solubilidade em água e não toxicidade para humanos e para o meio ambiente, ser comestível e aniônico. Devido a essas vantagens ele tem apresentado um grande interesse quanto às suas possíveis aplicações nas indústrias de alimentos, plásticos e cosméticos e nas áreas ambiental e médica (ARPAL, 2004; SHIH; VAN, 2001; TANIGUCHI et al., 2005).

Esse biopolímero apresenta uma diversidade de aplicações que incluem o uso como espessante, umectante, melhorador de textura, crioprotetor, amenizador de sabores amargos, veículo para medicamentos, adesivo biológico, floculante, hidrogéis altamente absorvedores de água, quelante de metais pesados, fibras biodegradáveis e aditivo para alimentação animal (KUNIOKA, 2004; SHIH; VAN, 2001; CANDELA; FOUET, 2006).

Em tratamento de água o γ -PGA pode ser utilizado como floculante ou como quelante de metais, removendo os metais pesados e os radionucleotídeos. (SHIH; VAN, 2001). Devido a sua solubilidade em água, o γ -PGA é um forte candidato a substituir os atuais floculantes

que existem no mercado (poliacrilamida e ácidos poliacrílicos), que se caracterizam por se degradar lentamente na água e por gerar substâncias tóxicas (ARPAL, 2004).

Na indústria de alimentos, seu uso pode ser como espessante, aumentando a viscosidade de sucos, crioprotetor para alimentos congelados e amenizador de sabores amargos, aliviando a amargura de aminoácidos, peptídeos, cafeína, minerais e outros. Pode ainda ser utilizado como agente anti-envelhecimento ou potencializador da textura em produtos de padaria e em massas e como aditivo para a alimentação animal, pois promove a absorção dos minerais e fortalece as cascas de ovos. Pode também ser útil no processo de potabilidade da água (SHIH; VAN, 2001).

O γ -PGA é um crioprotetor muito eficaz, especialmente para alimentos congelados, pois possui um sabor fraco e não altera o sabor do alimento, diferentemente do que acontece com os sacarídeos, sais orgânicos e aminoácidos (MITSUIKI et al., 1998; SHIH; VAN, 2001). É sabido que o congelamento e o descongelamento frequentemente causam deterioração em células vivas, substâncias biologicamente ativas e alimentos (SHIH; VAN, 2001). Para protegê-los da deterioração são utilizados crioprotetores e congelamento e descongelamento ultra-rápidos. A teoria mais aceita para explicar o porquê da propriedade crioprotetora de alguns solutos é que a adição dos mesmos é capaz de diminuir o ponto de congelamento e a quantidade de gelo formado nos materiais congelados (MITSUIKI et al., 1998).

Na área médica, o γ -PGA pode ser utilizado como carreador de medicamentos ou material de liberação lenta para esses medicamentos, sendo utilizado para terapia gênica ou para drogas anti-câncer. Ele também pode ser utilizado como adesivo biológico, fio de sutura e hemostático, substituindo a fibrina. A sutura tem sido a técnica mais comum de adesão de tecidos, controle de sangramentos e fechamento de feridas em cirurgias. Porém ela não é muito efetiva para hemostasia, ou seja, para coibir hemorragias e não pode ser utilizada para controlar sangramentos de órgãos, selar fugas de ar e fluído corporal ou para reparar a dissecação aórtica. Nesses casos costumam ser utilizados os adesivos biológicos (SHIH; VAN, 2001).

Para as aplicações médicas, as propriedades do γ -PGA devem cumprir alguns requerimentos: tornar a droga solúvel em água, transportá-la até o tumor e controlar a liberação da droga enquanto o polímero se biodegrada (SOLIMAN; BEREKAA; ABDEL-FATTAH, 2005).

O γ -PGA é capaz de aumentar a absorção do cálcio pelo intestino delgado quando o mineral é administrado por via oral. Existem três explicações possíveis para esse fato: a

primeira é que o γ -PGA inibe a formação de um complexo insolúvel de cálcio com outras substâncias e assim aumenta a sua absorção pelo intestino; a segunda explicação possível é que o γ -PGA aumenta a solubilidade do cálcio e facilita seu transporte através das paredes do intestino; a última possibilidade é que o γ -PGA retarde o tempo de trânsito do alimento pelo intestino, e assim o cálcio teria mais tempo para ser absorvido. (NOGUCHI et al., 2001). Desta forma, o γ -PGA pode ser uma ferramenta importante no tratamento da osteoporose (ASHIUCHI; MISONO, 2002).

Em cosméticos ele pode ser adicionado como umectante e em membranas ele pode ser útil como absorvente, seqüestrador de metais pesados ou agente enantioseletivo, para selecionar e separar aminoácidos. A capacidade de sorção de metais por membranas de γ -PGA é muito superior a convencional resina de troca iônica (SHIH; VAN, 2001).

O γ -PGA também é usado em vacinas para produzir anticorpos contra o anthrax (WIMER-MACKIN, 2005 apud BUESCHER; MARGARITIS, 2007). Os hidrogéis feitos com o γ -PGA podem ser utilizados como absorvedores de água em diversas aplicações, incluindo na agricultura, horticultura e construção civil (BUESCHER; MARGARITIS, 2007). Outras aplicações do γ -PGA incluem o uso para absorção de água, em fraldas, por exemplo, e como dispersante de pigmentos e minerais em detergentes, cosméticos e na fabricação de papel (SHIH; VAN, 2001).

Os ésteres derivados do γ -PGA têm potencial como substitutos biodegradáveis dos materiais não biodegradáveis utilizados atualmente, como algumas fibras, filmes, membranas e termoplásticos (YAHATA; SADANOBU; ENDU, 1992 apud ASHIUCHI; KAMEI; MISONO, 2003). γ -PGA com massas moleculares acima de 10^6 Da são desejáveis para a maioria das aplicações, porém, cada aplicação requer uma característica diferente do γ -PGA. O fato de que para as aplicações não médicas o teor de D- e L-ácido glutâmico não é importante simplifica muito a produção (BUESCHER; MARGARITIS, 2007).

Variações nas propriedades dos bioplásticos podem ser alcançadas com a utilização de γ -PGA de diferentes massas moleculares. Porém, o custo o γ -PGA ainda é muito alto para que os biofilmes possam ser comercializados (BUESCHER; MARGARITIS, 2007).

As aplicações do γ -PGA são versáteis, seguras e não agredem o meio ambiente. Além disso, ele pode ser produzido a partir de recursos sustentáveis (SHIH; VAN, 2001). Entretanto, para a utilização deste promissor biopolímero em escalas industriais, dois problemas ainda precisam ser resolvidos: como produzi-lo em maiores quantidades e a um preço razoável e como controlar a sua diversidade estrutural (ASHIUCHI et al., 2004).

1.2 Produção de γ -PGA

Os nutrientes necessários para a produção do γ -PGA variam de acordo com a cepa utilizada (SHIH; VAN, 2001). Algumas cepas necessitam da adição de L-glutamato no meio de cultivo para o crescimento celular e para produzir o γ -PGA e outras não necessitam (KAMBOUROVA; TANGNEY; PRIEST, 2001). Além disso, o tipo de fonte de carbono e de nitrogênio, a aeração e o pH do meio de cultivo afetam a produtividade e a qualidade do γ -PGA (SHIH; VAN, 2001).

O Caldo E de Leonard, formulado em 1958, é o meio tradicionalmente utilizado para a produção do γ -PGA. São três as fontes de carbono adicionadas: ácido L-glutâmico, ácido cítrico e glicerina (ARPAL, 2004). A composição do Caldo E é dada na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição do caldo E de Leonard

Componente	Quantidade
Ácido L-glutâmico	20 g/L
Ácido cítrico	12 g/L
Glicerol	80 g/L
NH ₄ Cl	7 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g/L
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,04 g/L
K ₂ HPO ₄	0,5 g/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,15 g/L
MnSO ₄ .H ₂ O	0,04 g/L
ZnSO ₄ .H ₂ O	0,35 g/L
Água	1 L
pH	7

Fonte: Silva (2010b)

A síntese de γ -PGA pode ser um problema na indústria de fermentação, pois a sua acumulação no meio de cultivo causa um aumento na viscosidade do caldo de fermentação e formação de espuma. Isso resulta na redução da produção do γ -PGA devido a diminuição da transferência de oxigênio no meio pelo aumento da sua viscosidade. Essa viscosidade também gera dificuldades para recuperar o produto (KAMBOUROVA; TANGNEY; PRIEST, 2001).

Além disso, as células encapsuladas com γ -PGA possuem cargas negativas perto do pH neutro, devido a ionização de grupos carboxílicos na molécula de γ -PGA. Isso confere a essas células estabilidade no meio de cultivo e dificulta sua sedimentação durante os processos

de separação. (DO; CHANG; LEE, 2001). Portanto, Do, Chang e Lee (2001) propuseram a redução do valor de pH para valores próximos a 3, de forma a diminuir a viscosidade do meio e a carga das células e, conseqüentemente, tornar mais fácil a separação da biomassa a partir do caldo de cultivo.

Algumas bactérias necessitam da adição de ácido glutâmico no meio de cultivo para a produção de γ -PGA e outras não. O papel do ácido glutâmico também é diferente em cada cepa. Em alguns casos ele é convertido em γ -PGA e, em outros, é responsável por ativar as enzimas necessárias para a síntese do γ -PGA mas não é sintetizado. Portanto, as unidades de ácido glutâmico presentes no γ -PGA podem vir de duas origens: através do próprio ácido glutâmico ou podem ser sintetizadas a partir de precursores adicionados ao caldo de cultivo, como por exemplo a glicose (XU et al., 2005).

Quando a síntese de γ -PGA ocorre através da glicólise a glicose é metabolizada no ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo TCA) e resulta em ácido α -cetoglutárico, que é um precursor direto do ácido L-glutâmico. Porém, se as células estiverem supridas de ATP, ou seja, se houver excesso de fonte de carbono, parte deste carbono será convertido a polissacarídeos, também através do ciclo TCA e da gliconeogênese. O ácido L-glutâmico também pode ser produzido no ciclo TCA a partir do ácido cítrico, que é convertido a ácido isocítrico e depois a ácido α -cetoglutárico (SHIH; VAN, 2001; GOTO; KUNIOKA, 1992).

Portanto, para que ocorra a produção de γ -PGA é preciso haver ácido L-glutâmico e/ou uma fonte de carbono como a glicose ou ácido cítrico adicionados no meio de cultivo. A síntese de glicose também pode ser conduzida a partir de compostos como lactato, acetato, propionato, piruvato, glicerol, oxaloacetato e aminoácidos glicogênicos (ROCHA et al., 2005).

Existem basicamente três diferentes maneiras de fazer a recuperação do γ -PGA a partir do meio de cultivo: precipitação através da formação de um complexo, precipitação através da redução da atividade de água e separação por diferença de tamanho (filtração). Em todos os casos, é preciso previamente remover as células por centrifugação ou filtração através de membranas de 0,45 μ m. (YOON et al., 2000 apud BUESCHER; MARGARITS, 2007).

A técnica mais utilizada para precipitar o γ -PGA reduzindo a atividade de água é adicionando etanol ou outro álcool, como metanol ou 1-propanol (SHIH; VAN, 2001). Porém, este método é o menos seletivo, pois proteínas e polissacarídeos podem ser precipitados junto com o γ -PGA (GOTO; KUNIOKA, 1992). Logo, este procedimento consiste em adicionar uma quantidade suficiente de álcool de forma a provocar a precipitação do γ -PGA, que é

separado por centrifugação, sendo o precipitado re-dissolvido em água destilada e depois submetido a análises posteriores para quantificação ou caracterização do polímero (SILVA, 2010b).

A precipitação do γ -PGA através da formação de um complexo pode ser feita com Cu^{2+} , Al^{3+} , Cr^{3+} e Fe^{3+} . Porém, o Cu^{2+} precipita o γ -PGA de forma mais seletiva e eficiente, mesmo a baixas concentrações. (BOVARNICK, 1942 apud BUESCHER; MARGARITS, 2007). Neste caso, o γ -PGA pode ser recuperado a partir do meio de cultivo isento de células através da formação de complexo e posterior precipitação e separação por centrifugação (SILVA, 2010b).

Kanno e Takamatsu (1995, apud SILVA, 2010b) propuseram um método alternativo para a quantificação de γ -PGA produzido em cultivo submerso por *B. subtilis*. A metodologia consiste basicamente de três etapas. Na primeira etapa, é adicionada uma solução de ácido tricloroacético ao caldo de cultivo, sendo a mistura agitada por 30 min a 50°C para extração do γ -PGA. A seguir, a mistura é submetida a centrifugação.

Na segunda etapa, o sobrenadante da centrifugação tem o pH ajustado a 7,0 e são realizadas duas precipitações sucessivas com etanol absoluto, sendo o precipitado separado por centrifugação. Na última etapa, o precipitado é suspenso em solução tampão pH 7,0, sendo o γ -PGA, contido na solução, submetido a reação de complexação com Bromet 16 Cetiltrimetilamônio (CET). O complexo formado provoca uma turvação do meio, que é proporcional à concentração de γ -PGA presente, sendo possível a quantificação desse composto via espectrofotometria a 400nm, mediante utilização de um padrão analítico (KANNO; TAKAMATSU, 1995 apud SILVA, 2010b).

No Brasil existem poucos estudos e conhecimento sobre o γ -PGA apesar da abundância de resíduos industriais potenciais para a produção desse polímero existentes no país. Alguns destes resíduos são capazes de servir de substrato para a produção do γ -PGA por apresentarem na sua composição alguns nutrientes adicionados nos caldos tradicionalmente utilizados para a obtenção do biopolímero (SILVA, 2010b).

2 Resíduos da Indústria de Alimentos

A poluição do meio ambiente tornou-se assunto de interesse público em todas as partes do mundo. Tanto os países desenvolvidos quanto as nações em desenvolvimento vêm sendo afetados pelos graves impactos da poluição. Esses crescentes problemas provocados pela contaminação do meio ambiente decorrem dos processos de extração de matérias-primas e da transformação das mesmas em uma multiplicidade de produtos para fins de consumo em escala internacional (ARAGUAIA, 2010).

Os poluentes industriais que mais preocupam são os orgânicos, pois a poluição por estes compostos vem crescendo muito, principalmente a partir do fim da segunda guerra mundial, com a expansão acelerada da indústria petroquímica. Os compostos orgânicos são normalmente constituídos de uma combinação de carbono, hidrogênio e, em alguns casos, nitrogênio. Estes compostos estão presentes nas proteínas, gorduras, carboidratos e óleos dos resíduos das indústrias de alimentos (ARAGUAIA, 2010; BRAILE; CAVALCANTI, 1979).

Resíduos resultam de atividades produtivas e podem ser sólidos, líquidos ou gasosos. A indústria de alimentos está caracterizada pela emissão de resíduos líquidos e sólidos com elevada carga orgânica, com potencial composição visando a sua valorização, devido ao valor nutritivo e às propriedades funcionais. Na produção de uma tonelada de mandioca processada, por exemplo, são produzidos 400 litros de resíduos líquidos e 70 kg de sólidos (base peso seco) (AMANTE, 1999).

Estes resíduos, se descartados no meio ambiente sem um prévio tratamento de redução da sua carga poluente, são capazes de danificar ou levar a mortalidade da fauna e da flora locais. Portanto, é inegável a necessidade de adotar-se rígidas medidas de controle, a fim de assegurar a não ocorrência de prejuízos irreparáveis ao meio ambiente (SANTOS, 2004).

O lançamento nos rios de despejos industriais aquecidos, além de elevar a temperatura da água e causar a mortalidade da vida aquática, também pode causar o crescimento de fungos e plantas aquáticas indesejáveis. Além disso, o oxigênio é menos solúvel em água quente do que em água fria (a água a 0°C contém uma concentração de 14 mg/l de oxigênio; a 20°C contém 9 mg/l e a 35°C contém menos que 7 mg/l), restando menos oxigênio para as atividades biológicas (PESSON, 1979).

Outros pontos importantes são os maus odores provocados por esses despejos, que são devidos aos gases produzidos pela decomposição da matéria orgânica, e a variação do pH do corpo receptor. O fator que mais afeta o pH do efluente é o tipo de detergente e desinfetante

utilizado na limpeza da fábrica e a alteração do pH da água também coloca em risco o ecossistema aquático (BRAILE; CAVALCANTI, 1979).

A Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) é o parâmetro mais usual de medição de poluição orgânica aplicado às águas residuárias. A DBO corresponde à quantidade de oxigênio consumida pelos microrganismos aeróbicos para realizar a biodegradação de todas as substâncias biodegradáveis presentes na amostra, ou seja, para oxidar todas as substâncias orgânicas solúveis presentes. O período de incubação é, usualmente, de cinco dias a 20°C, porém, podem-se usar outros períodos e temperaturas (AYUB, 1999).

A Demanda Química de Oxigênio (DQO) corresponde à quantidade de oxigênio necessária para oxidar, quimicamente, uma dada substância. A DQO é medida utilizando um agente oxidante em meio ácido e em geral é mais alta do que a DBO, em virtude de que a maioria dos compostos é oxidada mais facilmente por via química do que por via biológica. A determinação da DQO leva três horas (AYUB, 1999).

Outros testes utilizados na caracterização de certos tipos de despejos industriais são a Demanda Teórica de Oxigênio (DTO), Carbono Orgânico Total (COT) e Demanda de Oxigênio Total (DOT) (BRAILE; CAVALCANTI, 1979).

Reduzir a poluição através do uso racional de matéria-prima, água e energia significa uma opção ambiental e econômica definitiva. Diminuir os desperdícios implica em maior eficiência no processo industrial e menores investimentos para soluções de problemas ambientais. A transformação de matérias-primas, água e energia em produtos, e não em resíduos, tornam uma empresa mais competitiva. Para tanto, as medidas que vêm sendo adotadas por algumas empresas são aumentar a eficiência no uso de matérias-primas, água e energia ou reciclar os resíduos gerados em um processo produtivo (CNTL, 2010).

As tecnologias limpas se caracterizam por voltar-se para as fontes de geração de resíduos visando aproximar o processo produtivo da condição de emissão zero. São priorizados os esforços pela eliminação da poluição a montante dos processos tentando se afastar da visão do binômio tratamento/disposição final como solução para os problemas ambientais gerados pela indústria. Trata-se de uma visão na qual reduzir impactos ambientais só faz agregar custos ao processo produtivo (KIPERSTOK, 1999).

A valorização dos resíduos consiste em reutilizar ou regenerar os mesmos, logo, tem caráter corretivo. Portanto, tanto a valorização dos resíduos quanto as tecnologias limpas têm vantagens sobre o tratamento de resíduos (chamados de tratamentos fim de tubo), pois ambas conduzem à minimização (AMANTE, 1999).

2.1 Soro de Leite

Quando a caseína é removida do leite para a produção de queijo, o líquido remanescente recebe o nome de soro de leite. Se a remoção da caseína é feita pela adição de ácido (pH 4,6) o soro se denomina “soro ácido”; se feita pela adição de enzima renina teremos o “soro doce”, que contém, em geral, maior quantidade de peptídeos e aminoácidos livres (SGARBIERI, 1996). O pH do soro de leite varia entre 4,5 e 6,7 (SOTTIEZ, 1993).

A composição do soro varia com a qualidade do leite utilizado e com o tipo de queijo a fabricar. Soros ácidos e doces diferem bastante no conteúdo de sais minerais, sendo que os mais importantes do soro são o cálcio, o magnésio e o fósforo (MADRID, 1996). A Tabela 2 faz uma comparação entre a composição dos dois tipos de soro de leite, o doce e o ácido.

O soro ácido provém, por exemplo, da fabricação de queijos tipo Cottage e ricota, enquanto que o soro doce é subproduto da fabricação de queijo tipo Cheddar, Queijo Suíço e Mozzarella (USDEC, 1997).

A lactose, solúvel em água, passa do leite para o soro junto com os sais minerais e com as proteínas solúveis. Este açúcar, em conjunto com as proteínas e outras substâncias sólidas, e ainda em presença da alta umidade faz do soro de leite um excelente caldo de cultivo para o desenvolvimento de todo o tipo de microrganismo (MADRID, 1996).

Tabela 2 - Composição dos soros doce e ácido

Composição	Soro doce (%)	Soro ácido (%)
Umidade	93-94	94-95
Gorduras	0,3-0,5	0,3-0,6
Proteínas	0,8-1,0	0,8-1,0
Lactose	4,5-5,0	3,8-4,2
Minerais	0,5-0,7	0,7-0,8
Ácido láctico e outros	0,1	0,1-0,8

Fonte: Madrid (1996)

De modo geral, o soro é rico em proteínas, lactose, minerais e vitaminas. As proteínas do leite e do soro são completas e de qualidade excepcional. Elas contêm – em quantidades variáveis e na proporção correta – todos os aminoácidos que o organismo humano necessita e se destacam também pela excelente digestibilidade e por serem completamente biodisponíveis (USDEC, 1997).

As proteínas do soro representam cerca de 20% das proteínas do leite. As duas principais são a α -lactoalbumina e a β -lactoglobulina que perfazem 70-80% das proteínas totais do soro. Além dessas são encontradas também a soralbumina, imunoglobinas, proteose-peptonas, lactoferrina, transferrina e enzimas (SGARBIERI, 1996). A composição média de aminoácidos do soro de leite é dada na Tabela 3.

Tabela 3 - Composição média de aminoácidos no soro de leite (g/100g de proteína)

Aminoácido	Etzel (2004)	Pacheco et. al. (2006)
Alanina	4,9	4,71
Arginina	2,4	1,86
Asparagina	3,8	-
Ácido aspártico	10,7	10,71
Cisteína	1,7	2,08
Glutamina	3,4	-
Ácido glutâmico	15,4	18,36
Glicina	1,7	1,76
Histidina	1,7	1,63
Isoleucina	4,7	5,31
Leucina	11,8	10,53
Lisina	9,5	9,82
Metionina	3,1	1,98
Fenilalanina	3,0	3,23
Prolina	4,2	5,95
Serina	3,9	5,48
Treonina	4,6	-
Triptofano	1,3	7,17
Irosina	3,4	2,98
Valina	4,7	5,07

Fonte: Etzel (2004); Pacheco et al. (2006)

2.1.1 Produção e capacidade poluente do soro de leite

Segundo dados da Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ), a produção brasileira de queijo chega a 700 mil toneladas (HEGG, 2005). De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (FAO, Food and Agriculture Organization), mais de 18 milhões de toneladas de queijo foram produzidos mundialmente em 2004, sendo que os maiores produtores são os Estados Unidos, que representam 30% da produção mundial, seguidos pela Alemanha e França (USDA, 2005).

Para cada 10 kg de leite integral são produzidos, em média, 1 kg de queijo e 9 kg de soro líquido (USDEC, 1997). Considerando que a produção brasileira de queijo é de 700 toneladas por ano, então são produzidas 6.300 toneladas de soro de leite por ano ou 17,5 toneladas por dia, e isso só no Brasil. E o grau de poluição do soro de leite é tão grande que uma tonelada de soro por dia despejado no meio ambiente corresponde a poluição de 400 a 500 pessoas (RODRIGUES, 2009).

A indústria de laticínios constitui uma parcela importante da indústria alimentícia, e sua contribuição material em termos de poluição de águas receptoras é significativa, sendo, portanto, necessário e obrigatório o tratamento prévio de seus despejos líquidos antes do lançamento (BRIÃO; TAVARES, 2005). O soro cria um grave problema de contaminação, já que muitas queijarias o lançam sem qualquer tratamento, dada a dificuldade encontrada para lucrar com o seu aproveitamento e aos custos que o tratamento representa às empresas (MADRID, 1996). Urge, assim, encontrar uma solução para a enorme quantidade de soro produzida pela indústria agro-alimentar (DOMINGUES; LIMA; TEIXEIRA, 1999).

A produção de queijo é responsável pela geração de grandes quantidades de soro de leite porque consiste em precipitar a caseína através da coagulação do leite. Este soro, se rejeitado como efluente, constitui um grave problema ambiental devido à sua elevada carga orgânica (Demanda Química de Oxigênio (DQO) de 50.000 a 80.000 mg/l e Demanda Biológica de Oxigênio (DBO) de 30.000 a 60.000 mg/l) de difícil degradabilidade e de grande volume gerado (DOMINGUES; LIMA; TEIXEIRA, 1999; ALMEIDA et al., 2003; SOTTIEZ, 1993).

Os níveis de DBO do soro de leite são de 50.000 mg/l, contra cerca de 500 mg/l do esgoto doméstico, ou seja, o soro de queijo apresenta um potencial poluidor cerca de 100 vezes maior que o esgoto doméstico (MIGLIORANZA, 2002).

Devido ao fato de as substâncias sólidas ainda contidas no soro (6-7%) representarem aproximadamente a metade daquelas originalmente contidas no leite, é um desperdício descartar essas proteínas, açúcares, vitaminas, etc., devido ao alto valor alimentício (MADRID, 1996).

2.1.2 Processamento do soro de leite em pó

O soro é, em geral, submetido a uma centrifugação para recuperar a gordura que ainda contém, restando apenas 0,03-0,05%. Este creme separado pode ser utilizado para a fabricação de manteiga, nata e outros produtos. Isso determina que a presença das vitaminas lipossolúveis (A, D e E) seja bastante baixa (MADRID, 1996).

Logo depois da separação de gorduras o soro é resfriado em um trocador de placas, até uma temperatura de 4°C. Se for previsto um armazenamento de mais de vinte e quatro horas, deve-se proceder também uma pasteurização, antes do resfriamento. Esta pasteurização não é indicada quando se pretende recuperar as proteínas do soro, já que elas são afetadas pelo aquecimento (MADRID, 1996). O resfriamento e a pasteurização do soro interrompem a conversão de lactose em ácido láctico, logo, impedem a acidificação do soro (USDEC, 1997).

O soro se valoriza quando seus diferentes constituintes são separados. A principal separação que é feita é a da água, pois 1 kg de extrato seco de soro contém de 15 a 20 kg de água. A segunda separação importante é a extração da lactose, pois ela constitui 75% do extrato seco do soro. As proteínas representam apenas 0,6 a 0,7% do extrato seco do soro, porém, sua extração se justifica devido ao seu alto valor biológico e nutritivo. Os minerais não representam interesse. Tratam-se principalmente de cloretos, lactatos e fosfatos de potássio, cálcio e sódio (SOTTIEZ, 1993). A Tabela 4 mostra a composição dos soros doce e ácido em pó.

Para a produção de soro em pó, a primeira etapa consiste na utilização da osmose inversa, que concentra o soro de 6 - 7% em extrato seco até 20% (o grau de concentração é limitado pelo aumento da viscosidade do concentrado), não aquece o produto e economiza mais energia do que a evaporação. A segunda etapa é o uso de um evaporador a vácuo, que permite alcançar um soro com 55% de extrato seco. É ainda necessário fazer uma cristalização, pois a lactose é muito higroscópica e deixaria o pó pegajoso. Para evitar esse fenômeno se utiliza a baixa solubilidade da lactose, que uma vez cristalizada em forma de α -lactose monohidratada, não é higroscópica. Após a cristalização o concentrado é atomizado para obter-se um produto com apenas 3% de umidade (SOTTIEZ, 1993; USDEC, 1997).

O produto assim obtido é o menos “sofisticado” que se pode obter a partir do soro, alcançando um preço baixo no mercado, porém, o soro em pó tem diversas aplicações, podendo ser utilizado em rações, produtos dietéticos, pães, sorvetes, queijos fundidos, recheios, doces, etc. (MADRID, 1996; ROLLAND, 1991).

O custo energético dos processos de evaporação e secagem é o mesmo que se paga para outros produtos derivados do leite, bem mais sofisticados (concentrados protéicos, lactose, etc.) e que alcançam preços mais elevados no mercado, além de aplicações mais interessantes (alimentação humana, indústria farmacêutica, etc.). É por isso que, embora seja melhor secá-lo do que descartá-lo com a finalidade de não contaminar o ambiente, pode ser antieconômico produzir soro em pó, devido aos altos custos energéticos e ao preço pouco atraente deste produto (MADRID, 1996).

Tabela 4 - Composição dos soros doce e ácido em pó

	Soro doce em pó (%)	Soro ácido em pó (%)
Proteína	11 -14,5	11 -13,5
Lactose	63 - 75	61 - 70
Gordura	1 - 1,5	0,5 - 1,5
Cinzas	8,2 - 8,8	9,8 - 12,3
Minerais	3,5 - 5	3,5 - 5

Fonte: USDEC (1997)

O soro líquido pode ser transformado não só em soro em pó, mas também em soro com teor de lactose reduzido, soro desmineralizado ou parcialmente desmineralizado, concentrados de proteína de soro, isolado de proteína de soro ou lactose. Para tal, são utilizadas técnicas de ultrafiltração, cristalização, precipitação, osmose reversa, concentração a vácuo, secagem por atomização, tecnologia de membrana, microfiltração, eletrodialise, troca iônica e outros métodos de separação física (USDEC, 1997).

Os concentrados protéicos de soro podem variar sua composição de proteínas de 29% a 89% e os isolados protéicos de soro devem apresentar valor superior a 90% de proteínas. Quando a concentração de proteínas é de 80%, o conteúdo de lactose fica em média 7% e gordura e cinzas entre 4% e 7% (WHEY, 2008).

A produção do concentrado protéico de soro de leite inclui pelo menos as etapas de clarificação, ultrafiltração, filtração e secagem. Para promover uma maior concentração das proteínas, geralmente, é necessária a combinação da ultrafiltração com a diafiltração. Esta consiste em se fazer passar, após ter atingido a concentração desejada, um elevado volume de água deionizada através do concentrado para se retirar o máximo de lactose e outros compostos de baixo peso molecular, ao mesmo tempo concentrando e purificando ainda mais as proteínas (BORGES et al., 2001 apud SILVA, 2010).

2.1.3 Aplicações do Soro de Leite

Além da grande importância na alimentação (pela boa composição em aminoácidos essenciais e elevada digestibilidade) as proteínas do leite encontram inúmeras aplicações industriais. As proteínas do soro são altamente solúveis, e, portanto, na indústria de alimentos são muito utilizadas na formulação de produtos devido às suas propriedades funcionais, tais como espumante, emulsificante, geleificante e formação de fibras de proteínas (SGARBIERI, 1996).

O soro de leite pode melhorar a qualidade de diversos produtos, pois ele é capaz de melhorar a textura, realçar o sabor e a cor, aumentar a viscosidade por meio de sua capacidade de reter a água, estabilizar no congelamento e descongelamento, incorporar e reter gordura, melhorar a dispersibilidade em misturas secas e ao mesmo tempo atuar como agente antiaglutinante, facilitar o batimento e aumentar a vida de prateleira. Ele não confere doçura excessiva aos produtos e é indicado para ser usado como veículo, devido ao seu baixo custo e alta disponibilidade (USDEC, 1997).

O soro de leite é utilizado em misturas prontas para bolos e sobremesas devido as suas propriedades de retenção de água, aeração, formação de espuma, emulsificação e potencialização de sabor. É utilizado no pão, pois acrescenta cálcio à formulação e permite obter uma casca com coloração castanho-avermelhada brilhosa, devido ao teor de lactose adicionado que pode sofrer reações de Maillard e de caramelização. Ele fornece uma sensação cremosa em molhos e de amaciamento nos biscoitos e é também utilizado em coberturas para bolos e sorvetes, doces, bebidas infantis, dietéticas e para esportistas, condimentos para salgadinhos e snacks, waffles, sorvetes, confeitos, embutidos, margarina, entre outros (USDEC, 1997). Porém, o principal destino do soro de leite é como ingrediente de bebidas lácteas (ALMEIDA; BONASSI; ROÇA, 2001).

As propriedades funcionais das proteínas do soro são influenciadas por variáveis de composição e de processamento, incluindo o pH, a concentração de íons de cálcio e de sal, os tratamentos térmicos anteriores, o teor residual de lipídios e de proteínas (USDEC, 1997).

Além da aplicação em alimentos, diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas na área de bioprocessos com a utilização do soro de leite como substrato para a produção de diversas substâncias. Podemos citar, por exemplo, a produção de lactase (RECH, 1998), etanol (LEITE et al, 2000), β -galactosidase (SANTIAGO, 2004), goma xantana (FORNALI, 2006) e

bioplásticos (LADISLAU, 2009). Assim, o soro pode ser utilizado como um substrato alternativo de baixo custo e rico em nutrientes para a produção de meios de cultivo.

2.2 Glicerol e glicerina

O glicerol é um composto orgânico, líquido à temperatura ambiente e pertencente à função álcool. Ele está presente nas células vivas, onde se combina com os ácidos graxos presentes na maioria dos óleos e gorduras de animais e vegetais para formar os triglicerídeos. Ele é um componente natural de vinhos, cervejas, pães e outros produtos da fermentação de grãos e açúcares. Portanto, o glicerol pode ser extraído de óleos vegetais e gordura animal (SDA, 1990).

O termo glicerol aplica-se somente ao componente químico puro 1,2,3-propanotriol ($C_3H_8O_3$) ou ao teor de anidro presente em um produto de glicerina ou em uma formulação. O termo glicerina aplica-se aos produtos comerciais purificados, normalmente contendo pelo menos 95% de glicerol. As glicerinas disponíveis comercialmente diferem um pouco em seu conteúdo de glicerol e em outras características, tais como cor, odor e impurezas (MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009; SDA, 1990).

A glicerina é um co-produto das indústrias baseadas em oleoquímica e é produzida por via química ou fermentativa. Desde 1950 ela é bastante produzida, pois é subproduto do propileno, porém, sua oferta tem aumentado significativamente desde a década de 90 devido a fabricação do biodiesel. Com a produção do biodiesel seu preço caiu 50% (MENEGUETTI, 2006; GLICERINA, 2010). A glicerina pode ser obtida também pela saponificação, hidrólise ou transesterificação de óleos e gorduras e posterior purificação por destilação ou por troca de íons (SDA, 1990).

2.2.1 Glicerina oriunda do biodiesel

Os combustíveis fósseis são grandes poluidores do ambiente, seja pela emissão de gases de efeito estufa durante a combustão, seja pelo descarte de resíduos ou pelos derramamentos que eventualmente ocorrem no mar ou solo. Além disso, a disputa pelo

petróleo vem causando guerras entre países. Logo, consolida-se a necessidade de algum combustível alternativo que reduza o consumo de petróleo. A menor emissão de gases poluentes é uma das vantagens do biodiesel (SILVA; FREITAS, 2008).

Biodiesel é o nome dado a ésteres alquílicos de ácidos graxos desde que atendam certos parâmetros de qualidade. Além de esses ésteres serem derivados de fontes biológicas como plantas e animais, atuam como combustível substituto do diesel de petróleo, com desempenho muito próximo, não exigindo modificação nos motores dos automóveis (DABDOUB; BRONZEL; RAMPIN, 2009).

O biodiesel é um combustível biodegradável que pode ser utilizado puro ou em misturas com óleo diesel, em diferentes proporções. Ele pode ser obtido por craqueamento, esterificação ou transesterificação. O principal processo de produção é a transesterificação, em que óleos ou gorduras reagem com metanol ou etanol sobre ação de um catalisador ácido, básico ou enzimático. O resultado desta reação é a produção do biodiesel, que são ésteres graxos metílicos ou etílicos e glicerina, sendo que para cada litro de biodiesel da transesterificação são gerados 100 mililitros de glicerina (MOTA, 2010).

O tipo de catalisador depende, entre outras coisas, das características da matéria-prima utilizada e do grau de pureza desejado para o produto final. Além disso, existem catalisadores mais eficientes do que outros em termos de tempo e rendimento da reação. Na reação de transesterificação ocorre a transformação de um éster carboxílico em outro, através da troca do grupo RO⁻ presente no éster original, por outro grupo semelhante proveniente de um álcool. Além de resultar em biodiesel e glicerina, certa quantidade de álcool, água, sais e resíduos de óleo também restam no final do processo (DABDOUB; BRONZEL; RAMPIN, 2009).

A qualidade (características físico-químicas) do biodiesel e da glicerina depende da composição química do óleo ou gordura utilizado como partida e do tipo de catálise empregada. Para diminuir o teor de impurezas da glicerina, esta deve ser submetida a destilação, mas sob custo elevado (RIVALDI et al., 2007, 2008).

Para tornar a matéria-prima mais adequada, ácidos graxos livres, água, cera e fosfolipídeos podem ser removidos ainda antes da reação de transesterificação. Além disso, para alcançar as especificações mínimas de qualidade, o biodiesel precisa sofrer etapas de remoção dos resíduos de catalisador, glicerina residual, sabões e outros contaminantes (DABDOUB; BRONZEL; RAMPIN, 2009).

Em 2004, o Governo Federal instituiu o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel, que prevê que este biocombustível seja adicionado ao diesel fóssil. Em janeiro de

2008, o diesel comercializado em todo o território nacional passou a conter, obrigatoriamente, 2% de biodiesel. Até 2013 está previsto o aumento deste percentual para 5%. Assim, a produção de glicerina pode chegar a 80 mil toneladas/ano a partir de 2008 e 250 mil toneladas/ano a partir de 2013, o que causará um impacto ambiental no país se não for encontrada uma destinação correta para o excedente de glicerina gerado (MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009).

Se descartado em rios, a glicerina provoca um consumo excessivo de oxigênio, podendo matar a população aquática. Se queimado, libera cloreína na atmosfera, e esta é uma substância carcinogênica. (BATISTA, 2007).

O Brasil vai se tornar um grande produtor e consumidor de biodiesel por duas razões: primeira, o uso do álcool como combustível para automóveis tem uma longa tradição no país; segunda, as condições de cultivo de plantas oleaginosas são extremamente favoráveis em muitas áreas brasileiras (SILVA; MACK; CONTIERO, 2009).

Em 2007 eram produzidas 30 mil toneladas de glicerina no Brasil. Porém, a glicerina resultante da produção do biodiesel tem características diferentes da que é utilizada na indústria de higiene, pois possui impurezas e coloração diferente e isso dificulta seu uso (BATISTA, 2007).

Na indústria de alimentos, ela pode apresentar riscos à saúde humana e animal caso não venha de uma oleaginosa adequada ou não sofra um tratamento adequado. O ideal seria utilizar apenas a glicerina oriunda do óleo de soja, que é um alimento. A glicerina oriunda da mamona e do pinhão manso, por exemplo, apresenta ácido ricinoleico, que vêm do que sobra dos mono e triglicérides e esta substância causa diarreia em pessoas e animais (AMSTALDEN, 2009).

No Brasil, atualmente o preço da glicerina bruta varia de 200 a 400 R\$/tonelada, sendo o valor da glicerina loira (parcialmente tratada para a remoção de impurezas) de 600 a 800 R\$/tonelada (RIVALDI et al., 2007, 2008).

2.2.2 Aplicações do Glicerol

Devido a sua combinação de propriedades químicas e físicas, o glicerol possui mais de 1500 aplicações conhecidas. Ele é de fácil manuseio, compatível com diversas outras

substâncias, estável em uma ampla faixa de temperatura e pressão e não tóxico para a saúde humana e para o meio ambiente (a não ser em quantidades muito elevadas) (SDA, 1990).

Desde 1959 o glicerol é reconhecido como GRAS (*generally recognized as safe*) pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos (SDA, 1990). No Brasil, seu uso em produtos alimentícios é assegurado pela Resolução de número 386, de 5 de agosto de 1999 (ANVISA, 1999).

O glicerol na sua forma pura apresenta-se como um líquido de alto ponto de ebulição, viscoso, incolor, inodoro e higroscópico, com sabor doce, solúvel em água e álcool e insolúvel em éter e clorofórmio (RIVALDI et al., 2007, 2008). O glicerol é lembrado por compor sabonetes e dinamite, porém, por não ser tóxico nem irritante, pode ser utilizado em diversos produtos. Suas principais aplicações são na síntese de resinas e nas indústrias farmacêuticas, de cosméticos e de alimentos. Porém, se buscam novas aplicações para o excedente de glicerina gerado (GLICERINA, 2010).

Na indústria farmacêutica, o glicerol é utilizado como solvente, umectante e agente de corpo em tinturas, remédios, pastilhas, cápsulas, supositórios, anestésicos, xaropes, cremes, pomadas, antibióticos e anti-sépticos. Pelo seu poder edulcorante, torna preparações medicinais mais palatáveis (SDA, 1990).

Na indústria de cosméticos ele é utilizado como emoliente e umectante em cremes para a pele, loções pós-barba, desodorantes e maquiagens, podendo ser utilizado nas mais sensíveis áreas do corpo. O glicerol é muito importante nas pastas de dente, onde evita o ressecamento e endurecimento (SDA, 1990).

Nas indústrias de alimentos, o glicerol é utilizado como umectante e para conservar bebidas e alimentos, tais como refrigerantes, bolos, barras de cereal, balas, pastas de queijo e carne e ração animal seca, onde melhora a palatabilidade e retém a umidade da ração. O glicerol pode substituir o sorbitol na grande maioria de suas aplicações nos alimentos, tais como solvente para aromas e corantes, emulsificante, edulcorante, umectante, sequestrante e espessante (GLICERINA, 2010).

Por ser um componente estrutural de lipídios, ele tem sido utilizado em preparações de molhos para saladas e coberturas de doces e sobremesas geladas. Sob a forma de monoglicerídeos, ele é utilizado para aumentar a vida de prateleira de alguns produtos e, na margarina, para auxiliar na dispersão da gordura (SDA, 1990).

O glicerol não cristaliza a baixas temperaturas, e por isso é utilizado em soluções anti-congelantes. Essa propriedade ajuda a aumentar a vida de prateleira dos produtos, pois os protege durante o armazenamento e estocagem. Devido a sua viscosidade, ele é um bom

agente de corpo. Devido a sua higroscopicidade e a baixa pressão de vapor (ele não volatiliza em temperaturas entre 0°C e 70°C) ele é umectante e maleável, gerando produtos suaves, cremosos e flexíveis (SDA, 1990).

Demais usos do glicerol se dão em cimentos, ceras, balas, chicletes, cortiças, colas, géis, borrachas, fotografias, preservação de células. É aplicado no processamento de tabaco a fim de tornar as fibras do fumo mais úmidas, macias e resistentes, evitando quebras. Outras funções no tabaco são ser veículo de aromas, adicionar sabor e revestir o cigarro. Espumas de poliuretano feitas com glicerol são mais resistentes e flexíveis. O glicerol pode ser nitrificado para a produção de nitroglicerina e posterior produção de dinamite (SDA, 1990).

O glicerol bruto contém elementos nutricionais, como fósforo, enxofre, magnésio, cálcio, nitrogênio e sódio, que são factíveis de serem utilizados por microrganismos para o seu crescimento durante processos fermentativos (THOMPSON; HE, 2006). Desta forma, existem bioprodutos obtidos por fermentação microbiana do glicerol, tais como o 1,3-propanodiol, utilizado na produção de polímeros, tintas, resinas de poliésteres, lubrificantes, anti-congelantes e cosméticos. Outros exemplos são etanol, hidrogênio, ácido cítrico, ácido succínico, polihidroxialcanoatos, ácido graxo poliinsaturado ômega 3, dihidroxiacetona, biosurfactantes, corantes naturais e ácido clavulânico, este último utilizado contra infecções bacterianas (RIVALDI et al., 2007, 2008).

O glicerol é um álcool que possui três grupamentos OH e, como os outros álcoois, pode formar ésteres, éteres, aminas, aldeídos e componentes análogos aos alcoolatos metálicos. E devido aos seus múltiplos grupos hidroxilas, ele pode reagir para formar um grande número de derivados (SDA, 1990).

Através de reações se obtém produtos derivados do glicerol, tais como os acetais e cetais, utilizados como aditivos em combustíveis, surfactantes, flavorizantes e solventes para uso em medicina. O diacetato de glicerol é utilizado como lubrificante, agente amaciante, solvente, fixador de perfumes e como veículo na fabricação de fungicidas. A acroleína é utilizada na produção do aminoácido metionina e para a produção de ácido acrílico, que por sua vez é utilizado na fabricação de polímeros super absorventes para uso em fraldas descartáveis, tintas e adesivos (MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009).

O glicerol é estável a oxidação atmosférica, mas pode ser oxidado por outros oxidantes (SDA, 1990). A oxidação do glicerol gera, entre outros compostos, o 1,3-di-hidróxi-acetona (DHA), utilizada em bronzeadores e na produção de polímeros. O glicerol também pode ser convertido em gás síntese, aplicado na produção de metanol, hidrogênio, amônia e

hidrocarbonetos. Além disso, ele pode ser utilizado para fabricar papéis, ésteres, policerina, filmes de celulose e resinas alquídicas (MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009).

A biotecnologia apresenta alternativas para a obtenção de produtos de alto valor agregado como bio-pesticidas, pigmentos, aromas, polímeros, antibióticos e proteínas recombinantes. No entanto, é preciso estudar com maior detalhe aspectos de engenharia bioquímica como agitação, aeração, cinética de crescimento e obtenção de produtos, e transferência de massa e energia. Esses parâmetros são considerados essenciais para entender os mecanismos de utilização dos microorganismos, assim como para a otimização de processos, objetivando a futura ampliação de escala. Estratégias mais detalhadas para a utilização biotecnológica do glicerol são esperadas em poucos anos, de forma a reduzir os impactos ambientais e tornar o biodiesel um produto altamente competitivo no mercado mundial de combustíveis (RIVALDI et al., 2007, 2008).

ARTIGO

PRODUÇÃO DE ÁCIDO GAMA-POLIGLUTÂMICO ATRAVÉS DO APROVEITAMENTO DE SORO DE LEITE E DE GLICEROL RESIDUAL DE BIODIESEL

Carolina Montagner Schmaedecke¹

RESUMO

O ácido γ -poliglutâmico é um polímero biodegradável, comestível, atóxico para humanos e para o ambiente e solúvel em água. Por estas e outras características, ele pode ser aplicado na indústria de alimentos, química e farmacêutica e nas áreas médica e ambiental. Este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade da utilização do soro de leite, do concentrado protéico de soro de leite e do glicerol residual oriundo da produção de biodiesel na produção de γ -PGA por *Bacillus subtilis* BL53, a fim de reduzir os custos de produção e aproveitar alguns descartes da indústria. Após 96h de cultivo, foi obtido 2,8 g/l de γ -PGA quando utilizado um meio de cultivo contendo 3% (p/v) de concentrado protéico de soro e 97 g/l de glicerol residual de biodiesel. O custo deste meio foi 76% mais baixo do que o custo do Caldo E, geralmente utilizado para a produção de γ -PGA. Os resultados mostraram que existe potencial para o uso do soro de leite, do concentrado protéico de soro e do glicerol residual de biodiesel como componentes de meio de cultivo para produção de γ -PGA.

PALAVRAS-CHAVES: Ácido γ -poliglutâmico; Soro de queijo; Glicerol residual; Resíduo industrial; Bioprocessos.

ABSTRACT

The poly- γ -glutamic acid (γ -PGA) is a biodegradable, edible, nontoxic and water soluble polymer. For these and others features, it can be applied in food, chemical,

¹ Acadêmica do curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

pharmaceutical and medical areas. This study aimed to analyze the potential use of whey, whey protein concentrate and crude glycerol from biodiesel into the production of γ -PGA by *Bacillus subtilis* BL53 in order to reduce costs of the production and to use industrial residues. After 96h of culture, it was obtained 2.8 g/L of γ -PGA when used in a culture medium containing 3% (w/v) whey protein concentrate and 97 g/l of crude glycerol. The cost of this medium was 76% lower than the cost of Broth E, generally used for the production of γ -PGA. The results showed that there is potential for using these substrates in replacement of components of Broth E.

1. INTRODUÇÃO

O ácido poliglutâmico (PGA) é um polímero aniônico que pode ser caracterizado por sua massa molecular, pela relação entre os monômeros D- e L-ácido glutâmico e pelo grupo carboxil (α ou γ) ligado ao peptídeo. (BUESCHER; MARGARITIS, 2007). O ácido γ -poliglutâmico (γ -PGA) é um γ -polipeptídeo que apresenta um grupo carboxílico no carbono quiral da cadeia principal (ARPAL, 2004).

O γ -PGA é um biopolímero que apresenta vantagens sobre as poliamidas convencionais: pode ser obtido mediante biosíntese e ser biodegradável. Existe ainda o fato desse polímero apresentar propriedades como solubilidade em água e não toxicidade para humanos e para o meio ambiente e ser comestível. Devido a essas vantagens existe um grande interesse quanto às suas possíveis aplicações nas indústrias de alimentos, plásticos e cosméticos e também nas áreas ambiental e médica (SHIH; VAN, 2001; TANIGUCHI et al., 2005).

Esse biopolímero apresenta uma diversidade de aplicações que incluem o uso como espessante, umectante, crioprotetor, amenizador de sabores amargos, veículo para medicamentos, adesivo biológico, flocculante, hidrogéis altamente absorvedores de água, quelante de metais pesados, fibras biodegradáveis e aditivo para alimentação animal (KUNIOKA, 2004; CANDELA; FOUET, 2006).

Algumas bactérias necessitam da adição de ácido glutâmico no meio de cultivo para a produção de γ -PGA e outras não. O papel do ácido glutâmico também é diferente em cada cepa. Em alguns casos ele é convertido em γ -PGA e, em outros, é responsável por ativar as

enzimas necessárias para a síntese do γ -PGA mas não é sintetizado. Portanto, as unidades de ácido glutâmico presentes no γ -PGA podem vir de duas origens: através do próprio ácido glutâmico ou podem ser sintetizadas a partir de precursores adicionados ao caldo de cultivo, como por exemplo a glicose (XU et al., 2005).

Quando a síntese de γ -PGA ocorre através da glicólise a glicose é metabolizada no ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo TCA) e resulta em ácido α -cetoglutárico, que é um precursor direto do ácido L-glutâmico. Porém, se as células estiverem supridas de ATP, ou seja, se houver excesso de fonte de carbono, parte deste carbono será convertido a polissacarídeos, também através do ciclo TCA e da gliconeogênese. O ácido L-glutâmico também pode ser produzido no ciclo TCA a partir do ácido cítrico, que é convertido a ácido isocítrico e depois a ácido α -cetoglutárico (SHIH; VAN, 2001; GOTO; KUNIOKA, 1992).

Portanto, para que ocorra a produção de γ -PGA é preciso haver ácido L-glutâmico e/ou uma fonte de carbono como a glicose ou ácido cítrico adicionados no meio de cultivo. A síntese de glicose também pode ser conduzida a partir de compostos como lactato, acetato, propionato, piruvato, glicerol, oxaloacetato e aminoácidos glicogênicos (ROCHA et al., 2005).

No Brasil existem poucos estudos e conhecimento sobre o γ -PGA apesar da abundância de resíduos industriais potenciais para a produção deste polímero existentes no país. Alguns destes resíduos são capazes de servir de substrato para a produção do γ -PGA por apresentarem na sua composição alguns nutrientes adicionados tradicionalmente aos caldos utilizados para a obtenção deste biopolímero (SILVA, 2010b).

A poluição do meio ambiente tornou-se assunto de interesse público em todas as partes do mundo. Os resíduos produzidos pelas indústrias de alimentos são ricos em proteínas, gorduras, carboidratos e fibras. Estes resíduos, se descartados no meio ambiente sem um prévio tratamento de redução da sua carga poluente, são capazes de danificar ou levar a mortalidade da fauna e da flora locais (BRAILE; CAVALCANTI, 1979; SANTOS, 2004).

Segundo dados da Associação Brasileira das Indústrias de queijo (ABIQ), a produção de queijo no Brasil chega a 700 mil toneladas (HEGG, 2005). Para cada 10 kg de leite integral são produzidos, em média, 1 kg de queijo e 9 kg de soro líquido (USDEC, 1997). A geração de grandes volumes de soro de leite apresenta importante impacto ambiental devido a sua elevada demanda bioquímica de oxigênio. Segundo Domingues, Lima e Teixeira (1999), a demanda química de oxigênio do soro varia de 50.000 a 80.000 mg/L e a demanda bioquímica varia de 30.000 a 60.000 mg/L. Existe uma enorme quantidade de soro produzida pela indústria agro-alimentar possível de ser utilizada em bioprocessos.

A produção de biodiesel gera ésteres graxos metílicos ou etílicos e glicerina, sendo que para cada litro de biodiesel são gerados 100 mililitros de glicerina (MOTA, 2010). Em 2004, o Governo Federal instituiu o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel, que prevê que este biocombustível seja adicionado ao diesel fóssil. Em janeiro de 2008, o diesel comercializado em todo o território nacional passou a conter, obrigatoriamente, 2% de biodiesel. Até 2013 está previsto o aumento deste percentual para 5%. Assim, a produção de glicerina pode chegar a 80 mil toneladas/ano a partir de 2008 e 250 mil toneladas/ano a partir de 2013, o que causará um impacto ambiental no país se não for encontrada uma destinação correta o excedente de glicerina gerado (MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009).

Neste contexto, este trabalho tem como objetivo avaliar a utilização de soro de leite, de concentrado protéico de soro de leite e de glicerol residual de biodiesel sobre a produção de γ -PGA via cultivo submerso de *Bacillus subtilis* BL53, bem como avaliar a redução do custo do meio de cultivo quando comparado a meio convencional para a produção de γ -PGA.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Microrganismos

A linhagem de *Bacillus subtilis* utilizada neste trabalho foi a BL53, que pertence à coleção de microrganismos do Laboratório de Biotecnologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS.

2.2 Manutenção e reativação das culturas

As culturas microbianas foram mantidas em glicerol a -18°C e reativadas em caldo Luria Bertani (LB) com posterior esgotamento em placas contendo ágar LB para obtenção de colônias isoladas. As colônias isoladas foram repicadas para tubos com ágar inclinado (LB) e mantidas sob refrigeração até o momento do cultivo. A composição do caldo LB é dada na

Tabela 1, a composição do Agar LB é semelhante, sendo adicionado de 15 g/L de ágar bacteriológico.

Tabela 1 - Composição do Caldo Luria Bertani (LB)

Componente	Quantidade (g/L)
Peptona Bacteriológica	10
Extrato de Levedura	5
NaCl	10

Fonte: Silva (2010b)

2.3 Condições de cultivo

Os inóculos foram produzidos em Caldo Lúria-Bertani (LB) suplementado com 2 mM de $MgSO_4$ e 0,25 mM de $MnSO_4$.

Nos cultivos foi utilizado como meio base o Caldo E de Leonard (LEONARD; HOUSEWRIGHT; THORNE, 1958), porém, com a substituição do glicerol P. A. por glicerol residual de biodiesel (pureza: 82,6%) e com a substituição do ácido glutâmico pelo soro de leite em pó ou pelo concentrado protéico de soro de leite a 80%. Foi considerado o grau de pureza do glicerol residual e utilizada uma quantidade equivalente a quantidade de glicerol P. A. contida no Caldo E.

Além disso, o meio de cultivo foi suplementado com 1,22 mM de $ZnSO_4$, conforme otimizado por Silva, 2010b. Foram utilizados dois meios de cultivo com soro de leite em pó (7% (peso/volume) e 21% (p/v)) e dois com concentrado protéico (3% (p/v) e 9% (p/v)). As composições dos quatro meios de cultivo avaliados são apresentadas na Tabela 2.

Os cultivos foram conduzidos com 25 mL de meio com 4% de inóculo em frascos de 125 mL, incubados em agitador orbital (shaker) a 180 rpm, 37 °C, pH inicial de 7,0, durante 96 horas.

Tabela 2 - Composição dos meios de cultivo

Componente	Quantidade (g/L)				
	Caldo E modificado	Meio S7	Meio S21	Meio C3	Meio C9
	(Silva, 2010b)	Soro 7% (p/v)	Soro 21% (p/v)	Concentrado protéico 3% (p/v)	Concentrado protéico 9% (p/v)
Ácido L-glutâmico	20	-	-	-	-
Ácido cítrico	12	12	12	12	12
Glicerina	80	-	-	-	-
NH ₄ Cl	7	7	7	7	7
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
K ₂ HPO ₄	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
CaCl ₃ .2H ₂ O	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
MnSO ₄ .H ₂ O	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
Glicerol residual de biodiesel	-	97	97	97	97
Enzima alcalase	-	0,5	1,5	1	3
Soro ácido de leite em pó	-	70	210	-	-
Concent. protéico de soro 80%	-	-	-	30	90

2.4 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática do soro e do concentrado protéico de soro de leite foi feita a fim de aumentar a disponibilidades das proteínas e evitar que elas precipitassem durante o processo de esterilização. Foi utilizado 0,5 mL de protease comercial (Alcalase, Novo Nordisk A/S, Copenhagen, Denmark) para 7% (p/v) de soro, 1,5 mL para 21% (p/v) de soro, 1 mL para 3% (p/v) de concentrado protéico e 3 mL de protease para 9% (p/v) de concentrado protéico. Essas quantidades foram adicionadas ao volume de 1 litro de suspensão de soro e de concentrado protéico de soro, sendo o sistema mantido a 55°C durante 3 horas em pH 8,5, conforme Rech et al. (1999).

2.5 Determinação do ácido γ -poliglutâmico

A quantificação do ácido γ -poliglutâmico foi realizada segundo o método espectrofotométrico de complexação com o brometo de cetiltrimetilamônio, de acordo Kanno e Takamaisu (1995). Foi utilizado ácido γ -poliglutâmico (PM: 70 – 100 kDa, da Sigma-Aldrich) como padrão espectrofotométrico para a construção de uma curva padrão. A absorvância do complexo foi lida a 400 nm em espectrofotômetro (Ultrospec 3100, Amersham Biosciences).

2.6 Determinação da pressão osmótica dos meios de cultivo

A pressão osmótica dos meios de cultivo foi determinada com osmômetro Wescor 5520 calibrado com padrões de 100, 290 e 1000 mOsm/kg.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Produção de γ -PGA

Foi avaliada a produção de γ -PGA ao substituir o ácido glutâmico do meio de cultivo pelo soro de leite e pelo concentrado protéico de soro de leite. Foram testadas duas concentrações de soro de leite em pó, 7% (S7) e 21% (S21), e duas de concentrações de concentrado protéico, 3% (C3) e 9% (C9).

O soro de leite em pó na concentração de 7% (p/v) representa o soro de leite líquido reconstituído. Os 3% (p/v) de concentrado protéico de soro de leite (80% de proteínas) equivalem aproximadamente aos 21% (p/v) de soro de leite em termos de quantidade de ácido glutâmico. A concentração de 9% (p/v) de concentrado protéico foi escolhida como a concentração máxima desse componente; maiores quantidades provocariam aumento excessivo na viscosidade do meio. O teor de 21% (p/v) de soro de leite foi utilizado por

representar uma quantidade três vezes superior a original, assim como utilizado para o concentrado protéico.

Conforme pode ser visto na Figura 1, em 96 horas a produção de γ -PGA foi superior quando foi utilizado o concentrado protéico no meio de cultivo ao invés do soro de leite. Após 96h de cultivo, obteve-se 1,0 g/L de γ -PGA quando utilizado 7% de soro de leite contrastando com 2,8 g/L produzido a partir de meio com 3% de concentrado protéico.

As quantidades de γ -PGA obtidas neste trabalho são consideradas baixas se comparadas com as relatadas na literatura. Xu et al. (2005) isolaram 60 cepas capazes de produzir γ -PGA e destas, oito produziram mais de 10 g/L em 24 horas de cultivo. Cromwick, Birrer e Gross (1996) conseguiram produzir 15 g/L de γ -PGA em 96 horas de cultivo com *Bacillus licheniformis* ATCC 9945A em um caldo semelhante ao Caldo E com pH 6,5. Silva (2010b) avaliou diferentes condições de cultivo com o auxílio de um delineamento composto central rotacional e obteve no ponto ótimo de produção de γ -PGA 10,4 g/L.

Todos esses trabalhos utilizaram meios de cultivo convencionais contendo concentrações relativamente elevadas de ácido glutâmico. No presente trabalho, resíduos foram utilizados como substratos alternativos, havendo a possibilidade de carência de nutrientes importantes para a produção de γ -PGA nos meios de cultivo testados. Logo, produções de γ -PGA relativamente menores poderiam ser esperadas.

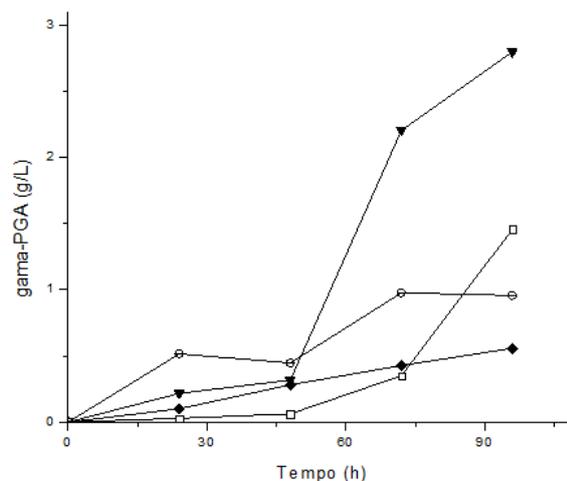


Figura 1 - Produção de γ -PGA em meios com diferentes concentrações de soro de leite e concentrado protéico de leite a 80%

—▲— C3 (3% de concentrado protéico de soro) —□— C9 (9% de concentrado protéico de soro) —◇— S7 (7% de soro de leite) —◆— S21 (21% de soro de leite)

A caracterização morfológica e bioquímica realizada por Silva (2010b) revelou que a linhagem BL53 é capaz de produzir ácido a partir de glicose, mas não de lactose. Portanto, a bactéria em estudo é incapaz de utilizar o único açúcar presente no meio de cultivo, a lactose. Ito et al. (1996) também não conseguiram produzir γ -PGA quando utilizaram lactose como única fonte de carbono, numa concentração de 7,5% em um cultivo com *Bacillus subtilis* TAM-4.

Com exceção da leucina e da lisina, os demais aminoácidos podem ser glicogênicos, ou seja, o álcool resultante da sua lise vai para a via glicolítica. Estes aminoácidos são degradados a piruvato, ácido α -cetoglutárico, succinil-coA, fumarato ou oxaloacetato, sendo possível, portanto, fazer a síntese da glicose, pois esses intermediários podem ser convertidos em fosfoenol-piruvato e depois em glicose (CAMPBELL, 2006). Desta maneira, a maioria dos aminoácidos contidos no soro de leite e no concentrado protéico de soro de leite podem participar da produção de γ -PGA.

De acordo com Ashiuchi et al. (2001), além do ácido glutâmico, outros aminoácidos da sua família podem ser convertidos a ácido glutâmico para a produção de γ -PGA. Esses aminoácidos são a glutamina e a arginina, presentes originalmente no soro de leite nas quantidades 3,4% e 2,4% (p/p), respectivamente. De acordo com Fust, Alteheld e Stehle (2004), a glutamina é facilmente convertida a ácido glutâmico.

Considerando apenas os aminoácidos da família do ácido glutâmico relatados por Ashiuchi et al. (2001) como precursores do γ -PGA (o ácido glutâmico, a arginina e a glutamina), tem-se no meio de cultivo S7 aproximadamente 1,8 g/L desses aminoácidos, nos meios S21 e C3 tem-se aproximadamente 5,2 g/L e no C9 15,3 g/L. Esses valores são inferiores a quantidade de ácido glutâmico contida no Caldo E, que é 20 g/L, o que poderia justificar a baixa produção obtida do polímero. Além disso, não se sabe se a conversão dos aminoácidos em glicose e ácido L-glutâmico realmente aconteceu e em quais proporções.

Outro aspecto a ser destacado neste trabalho é o fato de que foram obtidas maiores produções de γ -PGA quando foram utilizadas menores concentrações de soro de leite (meio S7) e de concentrado protéico (meio C3). Esses resultados provavelmente sejam decorrentes das diferenças de pressão osmótica dos meios de cultivo. Conforme pode ser visto na Tabela 3, a produção de γ -PGA tende a aumentar com a diminuição da pressão osmótica do meio de cultivo. Este resultado indica que a produção de γ -PGA se torna cada vez mais difícil conforme o meio se aproxima da saturação.

Tabela 3 - Pressão osmótica dos meios de cultivo

Meio	Pressão osmótica (mOsm/kg)	Produção de γ -PGA em 96 horas (g/L)
S7	1859	1,0
S21	2528	0,6
C3	1605	2,8
C9	1743	1,5

Quando uma célula microbiana se encontra em solução contendo uma concentração de sais superior àquela do interior da célula, pode ocorrer o transporte de água do seu interior para o meio extracelular, até que se atinja o equilíbrio osmótico. A perda de água por osmose causa a plasmólise e conseqüente morte da célula por desidratação. Este fenômeno pode acontecer quando houver alta concentração de sais ou de açúcares no meio de cultivo (TORTORA; FUNKE; CASE, 2003).

Foram reportadas diversas alterações que podem ocorrer em células que são submetidas a diferentes osmolaridades, tais como: mudanças na composição e funcionalidade das membranas fosfolipídicas, nos teores de proteínas e enzimas e nos sistemas de transporte (GOWRISHANKAR, 1985). Porém, os efeitos sofridos dependem de cada tipo de célula e da osmolaridade a qual ela é submetida.

Koujima et al. (1978) mostrou que, conforme aumenta a concentração de sais no meio de cultivo, o crescimento de *Staphylococcus aureus* se torna mais lento, assim como diminui a produção de aminoácidos pela bactéria. Porém, esta bactéria pode ser capaz de se readaptar a certos níveis de condições salinas.

Um mecanismo utilizado por algumas bactérias para sobreviver ao estresse osmótico é a acumulação intracelular de compostos orgânicos chamados de osmólitos ou osmoprotetores, que contrabalançam a pressão osmótica externa. Os osmólitos são chamados de solutos compatíveis, pois não produzem efeitos adversos sobre a estrutura, interação e solubilidade das proteínas, enzimas e DNA. A glicina betaina, a prolina e o glutamato são os osmólitos mais efetivos encontrados na natureza e os mais comumente encontrados nas bactérias (SLEATOR; HILL, 2001). Ko, Smith e Smith (1994) comprovaram que estes osmólitos podem ser retirados do meio ou sintetizados por *Listeria monocytogenes*. Existe na literatura relatos da ação desses osmólitos para uma diversidade de bactérias (MEURY, 1988; BALDWIN; KIRKISH; KOCH, 1994; OBIS et al, 1999; PRASAD; MCJARROW; GOPAL, 2003).

Conforme documentado por Kempf e Bremer (1998), um aumento repentino na salinidade do meio desencadeia uma imediata absorção de íons K^+ por *Bacillus subtilis*, a fim

de conter a perda de água pela célula. Subseqüentemente a importação de K^+ , o *Bacillus subtilis* começa a sintetizar grandes quantidades de prolina, que age como um osmólito. Conforme a síntese de prolina vai sendo feita, a quantidade de K^+ nas células se reduz, pois este íon é prejudicial a diversos processos celulares.

Hoffmann et al. (2008) submeteram *Bacillus subtilis* JH642 em um meio contendo 1900 mOsm/kg, a fim de estudar o mecanismo de acionamento da glicina betaina e os genes envolvidos. Eles concluíram que a bactéria suportou essa osmolaridade com muito pouca perda de viabilidade celular. No presente trabalho, o *Bacillus subtilis* BL53 pode estar utilizando o glutamato como osmólito para se proteger da alta pressão osmótica dos meios de cultivo e o desviando da via de produção de γ -PGA.

Este mecanismo de defesa utilizado por diversas bactérias é essencial para proteger a célula em casos de perturbações rápidas na osmolalidade do meio, porém, não é suficiente para causar uma adaptação desta célula quando houver exposição prolongada a meios hiperosmóticos. Além disso, os osmólitos podem não acompanhar o repentino aumento da pressão osmótica do meio e a célula romper imediatamente (KEMPF; BREMER, 1998).

Nos meios de cultivo estudados, os que foram acrescentados de soro de leite tiveram as maiores pressões osmóticas, pois o soro de leite pode conter até 5% de sais minerais e 75% de lactose, enquanto o concentrado protéico de soro de leite não possui praticamente quantidade nenhuma de sais e no máximo 9% de lactose. Além disso, no caso do meio com 21% (p/v) de soro de leite (S21), a elevada osmolaridade (2528 mOsm/kg) foi conseqüência da grande quantidade de soro adicionada ao meio (210 g/L).

É provável que a osmolaridade tenha interferido no crescimento microbiano e, conseqüentemente, na produção de γ -PGA. O comportamento do *Bacillus subtilis* BL53 frente a diferentes osmolaridades não é conhecido, portanto, não se sabe o quanto prejudicial a osmolaridade é para esta cepa e nem quais os níveis de osmolaridade tolerados por ela. É provável também que a osmolaridade não seja o único fator que esteja interferindo na produtividade do polímero. A composição diferenciada do soro e do concentrado protéico também pode ter influenciado o resultado, visto que os meios que continham concentrado protéico de soro de leite produziram mais γ -PGA do que os que continham soro de leite.

A fim de reduzir os custos de fabricação do γ -PGA, glicerol residual de biodiesel com 82,6% de pureza também foi adicionado aos meios de cultivo, sendo utilizado como alternativa ao glicerol P. A, já que este é o componente majoritário dos meios de cultivo para produção de γ -PGA em cultivo submerso. Em trabalho realizado por Silva (2010b) a adição de

glicerol residual de biodiesel em substituição ao glicerol P. A. teve pouco impacto sobre a produção de γ -PGA, havendo uma redução de apenas 10% no teor de γ -PGA produzido.

A autora sugere que a menor produção obtida na utilização do glicerol residual resulte da presença de compostos inibidores de microrganismos, geralmente presentes no glicerol residual obtido a partir da síntese química de biodiesel. Porém, conclui que o efeito inibitório é pouco deletério para a produção de γ -PGA por *Bacillus subtilis* BL53. Portanto, a substituição de glicerol P.A. por glicerol residual é uma alternativa viável tecnicamente.

3.2 Custos dos meios de cultivo

A fim de avaliar a viabilidade econômica dos meios de cultivo utilizados, foi feita uma análise a partir do custo de mercado dos componentes de cada meio. Os preços dos reagentes foram cotados para escala laboratorial (frascos de no máximo 1 kg), porém, preços muito menores podem ser encontrados para escala industrial, ou seja, a nível de toneladas de reagentes. O concentrado protéico de soro de leite a 80% e a enzima alcalase foram cotados em dólares, sendo a conversão para reais realizada com base na taxa do dólar do dia 29 de outubro de 2010 de R\$ 1,73. Por estarem sujeitos às oscilações do câmbio, estes dois substratos podem apresentar ampla variação de preço.

A Tabela 4 mostra o preço por quilograma de cada componente utilizado nos meios de cultivo e por 1000 litros do Caldo E de Leonard modificado (SILVA, 2010b) e dos meios de cultivo a base de glicerol residual de biodiesel, soro de leite e concentrado protéico de soro de leite a 80%. Conforme pode ser observado, o custo dos meios de cultivo foi drasticamente reduzido com a substituição do ácido L-glutâmico por substratos alternativos nos quatro meios testados. Portanto, o uso de glicerol residual de biodiesel e de soro de leite ou concentrado protéico de soro de leite, além de ser um destino para os excedentes de glicerol gerados com a produção de biodiesel e de soro produzido pelos laticínios, ainda é uma maneira eficiente de diminuir o custo do meio de cultivo do γ -PGA. Os outros custos envolvidos na produção deste biopolímero, tais como energia elétrica e manutenção dos microrganismos, não foram analisados.

A redução de preço variou de 47% com o uso do meio C9 (9% de concentrado protéico de soro de leite em pó a 80%) a 83% com o uso do meio S7 (7% de soro de leite em pó). Porém, analisando os resultados de produção de γ -PGA e os custos calculados para cada meio

de cultivo, conclui-se que o meio que justificaria inicialmente ser utilizado como opção ao Caldo E é o C3, que contém 3% de concentrado protéico de soro de leite em pó a 80% e 97 g/L de glicerol residual de biodiesel.

Os custos dos demais meios utilizados, embora menores do que o custo do Caldo E modificado, não compensam a baixa produção de γ -PGA obtida. Utilizando cultivo com *Bacillus subtilis* BL53 em Caldo E nas mesmas condições operacionais utilizadas no presente trabalho, Silva (2010b) obteve uma produção de γ -PGA de 10,4 g/L. Portanto, no meio C3 (3% de concentrado protéico de soro de leite em pó a 80%) a produção obtida foi 73% menor do que a encontrada por Silva (2010b), porém, o custo deste meio foi 76% menor do que o custo do meio utilizado pela autora. Logo, este resultado sugere que o meio C3 possui potencial para ser utilizado como substituto ao Caldo E.

Tabela 4 - Custo dos componentes utilizados nos meios de cultivo

Componente	Preço/ kg (R\$)	Caldo E modificado (SILVA, 2010b)		Meio S7		Meio S21		Meio C3		Meio C9	
		Quant. (g/1000L)	Preço (R\$/ 1000L)	Quant. (g/1000L)	Preço (R\$/ 1000L)	Quant. (g/1000L)	Preço (R\$/ 1000L)	Quant. (g/1000L)	Preço (R\$/ 1000L)	Quant. (g/1000L)	Preço (R\$/ 1000L)
Ácido L-glutâmico	160,00	20.000	3200,00	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido cítrico	24,00	12.000	288,00	12.000	288,00	12.000	288,00	12.000	288,00	12.000	288,00
Glicerol	23,00	80.000	1840,00	-	-	-	-	-	-	-	-
NH ₄ Cl	16,00	7.000	112,00	7.000	112,00	7.000	112,00	7.000	112,00	7.000	112,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	82,00	500	41,00	500	41,00	500	41,00	500	41,00	500	41,00
FeCl ₃ .6H ₂ O	82,00	40	3,28	40	3,28	40	3,28	40	3,28	40	3,28
K ₂ HPO ₄	48,00	500	24,00	500	24,00	500	24,00	500	24,00	500	24,00
CaCl ₂ .2H ₂ O	17,00	150	2,55	150	2,55	150	2,55	150	2,55	150	2,55
MnSO ₄ .H ₂ O	30,00	40	1,20	40	1,20	40	1,20	40	1,20	40	1,20
ZnSO ₄ .7H ₂ O	39,80	350	13,93	350	13,93	350	13,93	350	13,93	350	13,93
Glicerol residual de biodiesel	0,50	-	-	97.000	48,50	97.000	48,50	97.000	48,50	97.000	48,50
Enzima alcalase	250,00	-	-	460	115,00	1.400	350,00	1.000	250,00	3.000	750,00
Soro ácido de leite em pó	3,50	-	-	70.000	245,00	210.000	735,00	-	-	-	-
Concent. protéico de soro 80%	18,00	-	-	-	-	-	-	30.000	540,00	90.000	1620,00
Total (R\$/1000L)			5525,96		894,46		1619,46		1324,46		2904,46

Meio S7: 7% (p/v) de soro de leite em pó; Meio S21: 21% (p/v) de soro de leite em pó; Meio C3: 3% de concentrado protéico de soro de leite; Meio C9: 9% de concentrado protéico de soro de leite

As produções obtidas no presente trabalho foram comparadas com a produção obtida por Suse (2010b) devido ao fato de os cultivos terem sido realizados nas mesmas condições operacionais e utilizando o mesmo microrganismo utilizado pela autora.

Apesar de o concentrado protéico ser um substrato mais barato do que o ácido L-glutâmico P. A., é consideravelmente mais caro do que o soro de leite e requer alguns processos específicos para sua elaboração. Desta forma, em termos de benefícios para o meio ambiente e reforçando a idéia de aproveitamento de resíduos agroindustriais, a utilização de meio com soro de leite *in natura* (meio S7) ou com a reconstituição do soro em pó poderia ainda ser melhor estudado, com o objetivo de encontrar o ponto ótimo de concentração de soro de leite para a obtenção da máxima produção de γ -PGA.

4. CONCLUSÕES

Foram testados para produção de γ -PGA quatro meios de cultivo, dois contendo soro de leite em pó e dois contendo concentrado protéico de soro de leite a 80%. As melhores produções foram obtidas nos meios de cultivo menos concentrados, o que é vantajoso em termos de redução de custos. A máxima produção alcançada foi de 2,8 g/L de γ -PGA, utilizando um meio de cultivo com 3% de concentrado protéico de soro e 97 g/L de glicerol residual de biodiesel.

Os experimentos realizados mostraram que a produção de γ -PGA a partir de resíduos industriais é viável técnica e economicamente, porém maiores estudos são requeridos a fim de aumentar a produção do polímero nestas condições. Além de contribuir para a viabilidade econômica do processo de obtenção de γ -PGA, a utilização do glicerol residual de biodiesel e do soro de leite podem também auxiliar na redução do impacto ambiental provocado pela geração desses resíduos.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, E. S. et al. **Remediação do efluente da indústria de queijos combinando processo biológico (produção de proteínas celulares) e processo químico (ozônio)**. Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental. Saneamento Ambiental: Ética e Responsabilidade Social. Joinville, ABES, p. 3, set. 2003.
- ALMEIDA, K. E.; BONASSI, I. A.; ROÇA, R. O. Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijo minas frescal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 21, n. 2, p. 187 – 192, 2001.
- AMANTE, E, R.; CASTILHOS, A.B.; KANZAWA, A.; ENSSLIN, L.; MURAKI, M. Um panorama da tecnologia limpa na indústria de alimentos. **Boletim SBCTA**, v. 33, n. 1, p. 16-21, 1999.
- AMSTALDEN, N. **Com mais biodiesel, sobra glicerina e crescem risos de diarreia**. Com Ciência, 2009. Disponível em: < <http://www.comciencia.br/comciencia/?section=3¬icia=598> >. Acesso em: 28 de fevereiro de 2010.
- ANVISA. **Resolução nº 386 de 5 de Agosto de 1999**. Disponível em: < <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php> >. Acesso em: 6 de março de 2010.
- ARAGUAIA, M. Poluição. **Brasil Escola**. 2010. Disponível em: < <http://www.brasilecola.com/biologia/poluicao.htm> >. Acesso em: 22 de novembro de 2010.
- ARPAL, J. A. A. **Compuestos estequiométricos del ácido poli(γ -glutámico) con tensoactivos catiónicos**. Abril, 2004. Dissertação (graduação em engenharia química) – Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Industrial de Barcelona (UPC).
- ASHIUCHI, M. et al. Physiological and biochemical characteristics of poly- γ -glutamate synthetase complex of *Bacillus subtilis*. **European Journal Biochemical**, v. 268, p. 5321–5328, 2001.
- ASHIUCHI, M. et al. Enzymatic synthesis of high-molecular-mass poly- γ –glutamate and regulation of its stereochemistry. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 70, n. 7, p. 4249-4255, July 2004.
- ASHIUCHI, M.; KAMEI, T.; MISONO, H. Poly- γ -glutamate synthetase of *Bacillus subtilis*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 23, p. 101-106, 2003.

ASHIUCHI, M.; MISONO, H. Biochemistry and molecular genetics of poly- γ -glutamate synthesis. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 59, p. 9-14, 2002.

AYUB, M. A. Z. **Técnicas de controle ambiental em efluentes líquidos**. Porto Alegre, UFRGS, ICTA, p. 4-8, 1999. Apostila de aula.

BALDWIN, W. W.; KIRKISH, M. A.; KOCH, A, L. A change in a single gene of *Salmonella typhimurium* can dramatically change its buoyant density. **Journal of Bacteriology**, n. 16, v. 176, p. 5001 – 5004, 1994.

BATISTA, F. Brasil não tem destino certo para glicerina gerada por biodiesel. **Gazeta Mercantil**. Disponível em: < <http://www.biodieselbr.com/noticias/biodiesel/brasil-destino-certo-glicerina-gerada-biodiesel-05-06-07.htm> >. Acesso em: 28 de fevereiro de 2010.

BRAILE, P. M.; CAVALCANTI, J. E. W. A. **Manual de tratamento de águas residuárias industriais**. São Paulo: Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, 1979. 764 p.

BRDE investe em fábrica de soro de leite em pó no PR. **A solução em alimentos**. 2010. Disponível em: < <http://blog.totalfood.com.br/2010/06/21/brde-investe-em-fabrica-de-soro-de-leite-em-po-no-pr/> >. Acesso em: 22 de novembro de 2010.

BRIÃO, V. B.; TAVARES, G. C. R. **Geração de efluentes na indústria de laticínios: atitudes preventivas e oportunidades**. In: 23º. Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Campo Grande/MS, 2005.

BUESCHER, J. M.; MARGARITIS, A. Microbial biosynthesis of polyglutamic acid biopolymer and applications in the biopharmaceutical, biomedical and food industries. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 1-19, 2007.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3ª. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 752 p.

CANDELA, T.; FOUET, A. Poly-gamma-glutamate in bacteria. **Molecular Microbiology**, v. 60, n. 5, p. 1091-1098, 2006.

CENTRO NACIONAL DE TECNOLOGIAS LIMPAS (CNTL) – SENAI. **O que é produção mais limpa (PmaisL)?** Porto Alegre. Disponível em: < <http://64.233.163.132/search?q=cache:Riyc0IAfq8YJ:www.senairs.org.br/cntl/+tecnologia+limpa&cd=2&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br> >. Acesso em: 21 de fevereiro de 2010.

CROMWICK, A. M.; BIRRER, G. A.; GROSS, R. A. Effects of pH and aeration on poly(glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* in controlled batch fermentor cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 50, p. 222-227, 1996.

DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L.; RAMPIN, M. A. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 776 – 792, 2009. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000300021&lng=pt&nrm=iso&tng=pt >. Acesso em: 3 de março de 2010.

DO, J. H.; CHANG, H. N.; LEE, S. Y. Efficient recovery of γ -poly (glutamic acid) from highly viscous culture broth. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 76, n. 3, nov. 2001.

DOMINGUES, L; LIMA, N.; TEIXEIRA, J.A. Novas metodologias para a fermentação alcoólica de soro de queijo. **In: Actas da 6ª Conferência Nacional sobre a qualidade do ambiente**, Lisboa, v. 3, p. 271-280, 1999.

DU, G. et al. Effects of glycerol on the production of poly(γ -glutamic acid) by *Bacillus licheniformis*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 6, p. 2143-2147, 2005.

ETZEL, M. R. Manufacture and use of dairy protein fractions. **The Journal of Nutrition**, Madison, v. 134, n. 4, p. 996 - 1002, 2004. Disponível em: < <http://jn.nutrition.org/cgi/content/full/134/4/996S> >. Acesso em: 6 de fevereiro de 2010.

FORNARI, R.C.G. **Aproveitamento de soro de queijo para produção de goma xantana**. Dissertação de mestrado. Mestrado em Engenharia de Alimentos. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões (URI). Erechim, 2006. 80 p.

FÜRST, P.; ALTEHELD, B.; STEHLE, P. Why should a single nutrient – glutamine - improve outcome? The remarkable story of glutamine dipeptides. **Clinical Nutrition Supplements**,. v.1, p.3-15, 2004.

GEERLINGS, S. E. et al. Effect of glucose and pH on uropathogenic and non-uropathogenic *Escherichia coli*: studies with urine from diabetic and non-diabetic individuals. **Journal of Medical Microbiology**, v. 48, p. 535 – 539, 1999.

Glicerina – Sub-produto do biodiesel. 2010. Disponível em: < <http://www.biodieselbr.com/biodiesel/glicerina/biodiesel-glicerina.htm> >. Acesso em: 28 de fevereiro de 2010.

GOTO, A.; KUNIOKA, M. Biosynthesis and hydrolysis of poly (γ -glutamic acid) from *Bacillus subtilis* IFO 3335. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 56, n. 7, p. 1031-1035, 1992.

GOWRISHANKAR, J. Identification os osmoreponsive genes in *Escherichia coli*: Evidence for participation and proline transport system in osmoregulation. **Journal of Bacteriology**, v. 164, n. 1, p. 434 – 445, oct. 1985.

HEGG, C. De ânimo revigorado. **Revista Leite e Derivados**, n. 84, 2005. Entrevista. Disponível em: < http://64.233.163.132/search?q=cache:eLLmgjc8fMoJ:www.abiq.com.br/imprensa/artigos_de_talhes.asp%3Fid%3D18+produ%C3%A7%C3%A3o+brasileira+queijo&cd=1&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br >. Acesso em: 11 de fevereiro de 2010.

HOFFMANN, T. et al. Responses of *Bacillus subtilis* to hypotonic challenges: physiological contributions of mechanosensitive channels to cellular survival. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, p. 2454 – 2460, 2008.

ITO, Y. et al. Glutamic Acid Independent Production of Poly(γ -glutamic acid) by *Bacillus subtilis* TAM-4. **Bioscience, Biotechnology, and biochemistry**, v. 60, n. 8, 1239-1242, 1996.

KAMBOUROVA, M.; TANGNEY, M.; PRIEST, F. Regulation of polyglutamic acid synthesis by glutamate in *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 1004-1007, feb. 2001.

KANNO, A.; TAKAMATSU, H. Determination of polyglutamic acid in “Natto” using cetyltrimethylammonium bromide (Studies on “Natto” part V). **Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi**, v. 42, p. 878–886, 1995.

KEMPF, B.; BREMER, E. Stress response of *Bacillus subtilis* to high osmolarity environments: uptake and syntesis on osmoprtectants. **Journal Bioscience**. n. 4, v. 23, p. 447-455, october 1998.

KING, E. C.; BLACKER, A. J.; BUGG, T. D. H. Enzymatic breakdown of poly- γ -D-glutamic acid in *Bacillus licheniformis*: identification of a polyglutamyl γ -hydrolase enzyme. **Biomacromolecules**, v. 1, p. 75-83, 2000.

KIPERSTOK, A. Tecnologias limpas. **Porque não fazer já o que certamente virá amanhã**. Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade de Manchester (RU). Disponível em: < http://www.teclim.ufba.br/site/material_online/publicacoes/pub_art69.pdf >. Acesso em: 5 de fevereiro de 2010.

KLAPPER, M. H. The independent distribution of amino acid near neighbor pairs into polypeptides. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 78, p.1018 - 1024, 1977.

KO, R.; SMITH, L. T.; SMITH, G. M. Glicyne betaine confers enhanced osmotolerance and cryotolerance on *Listeria monocytogenes*. **Journal of Bacteriology**, n. 2, v. 176, p. 426-431, nov. 1994.

KOUJIMA, I. et al. Adaptational change in proline and water content of *Staphylococcus aureus* after alteration of environmental salt concentration. **Applied and environmental microbiology**, n. 3, v. 35, p. 467-470, mar. 1978.

KUNIOKA, M. Biodegradable water absorbent synthesized from bacterial poly-amino acids. **Macromolecular Bioscience**, v. 4, p. 324-329, 2004.

LADISLAU, D. E. O. **Bioplásticos a base de soro de leite**. Bioplastic News, 2009. Disponível em: < http://64.233.163.132/search?q=cache:cpDzI_IC6fYJ:bioplasticnews.blogspot.com/2009/07/bioplasticos-base-de-soro-de-leite.html+%22soro+de+leite%22+biopl%C3%A1stico&cd=1&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br >. Acesso em: 17 de fevereiro de 2010.

LATICINIOS Porto Alegre terá nova fábrica em MG. **Milk World**. 2010. Disponível em: < <http://milkworld.com.br/noticias/post/laticinios-porto-alegre-tera-nova-fabrica-em-mg> >. Acesso em: 22 de novembro de 2010.

LEITE, A. R.; GUIMARAES, W. V.; ARAUJO, E. F.; SILVA, D. O. **Fermentação de soro de leite por *Escherichia coli* KO11 recombinante**. Brazilian Journal of Microbiology, v. 31, n. 3, p. 211-214, 2000.

LEONARD, C. G.; HOUSEWRIGHT, R. D.; THORNE, C. B. **Effects of some metallic ions on glutamyl polypeptide synthesis by *Bacillus subtilis***. The Journal of Bacteriology, v. 76, n. 5, p. 499 – 503, 1958.

MADRID, A.; CENZANO, I.; VICENTE, J. M. **Manual de indústrias dos alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, p.147-168, 1995.

MENEGUETTI, S. P. Alternativas para ampliar os usos e o mercado da glicerina. **BiodieselBR.com**. 2006. Disponível em: < <http://www.biodieselbr.com/colunistas/meneghetti/alternativas-ampliar-usos-mercado-glicerina.htm> >. Acesso em: 28 de fevereiro de 2010.

MEURY, J. Glycine betaine reverses the effects of osmotic stress on DNA replication and cellular division in *Escherichia coli*. **Archives of Microbiology**, v.149, p. 232 – 239, 1988.

MIGLIORANZA, L. H. S. Soro como solução e não como problema. **Food Ingredients**, v. 3, n. 17, p.32, 2002.

MITSUIKI, M. et al. Relationship between the antifreeze activities and the chemical structures of oligo- and poly(glutamic acid)s. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 3, p. 891-895, feb. 1998.

MOTA, C. J. A. Novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Biodieselbr.com**. Disponível em: < <http://www.biodieselbr.com/revista/011/direto-do-laboratorio-11.htm> >. Acesso em: 28 de fevereiro de 2010.

MOTA, C. J. A.; SILVA, C. X. A.; GONÇALVES, V. L. C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 639-648, 2009. Disponível em: < <http://quimicanova.sbq.org.br/qn/qnol/2009/vol32n3/07-QN09048.pdf> >. Acesso em: 4 de março de 2010.

NOGUCHI, T. et al. Natto Mucilage Containing Poly- γ -glutamic Acid Increases Soluble Calcium in the Rat Small Intestine. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 65, n. 3, p. 516-521, 2001.

OBIS, D. Genetic and biochemical characterization of a high-affinity betaine uptake system (BusA) in *Lactococcus lactis* reveals a new functional organization within bacterial ABC transporters. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 20, p. 6238 – 6246, oct. 1999.

PACHECO, M. T. B. et al. Efeito de um hidrolisado de proteínas de soro de leite e de seus peptídeos na proteção de lesões ulcerativas da mucosa gástrica de ratos. **Revista de Nutrição**, n. 19, v. 1, p. 47 – 55, jan./fev. 2006.

PESSON, P. **La contaminación de las aguas continentales: incidencias sobre las biocenosis acuáticas**. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 1979.

PRASAD, J.; MCJARROW, P.; GOPAL, P. Heat and Osmotic Stress Responses of Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) in Relation to Viability after Drying. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 2, v. 69, p. 917-925, fev. 2003.

ROCHA, C. R. C. et al. **Portal da bioquímica 04**. Universidade Federal de Pernambuco, 2005. Disponível em: <

http://www.ufpe.br/dbioq/portalbq04/metabolismo_de_carboidratos.htm#3 - Gliconeogênese >. Acesso em: 28 de outubro de 2010.

RECH, R. **Aproveitamento do soro de queijo para a produção de lactase por *Kluyveromyces marxianus***. Dissertação de mestrado. Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Porto Alegre, 1998, 65 p.

RECH, R.; CASSINI, C. F.; SECCHI, A.; AYUB, M. A. Z. Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, n. 23, p. 91 - 96, 1999.

RIVALDI, J. D. et al. Glicerol de biodiesel: Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 37, 2007/2008. Disponível em: < http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio37/bio_37_7b.pdf >. Acesso em: 5 de março de 2010.

RODRIGUES, F. Aproveitamento de soro de queijo. **Queijos no Brasil**. Minas Gerais, 2009. Disponível em: < http://64.233.163.132/search?q=cache:5WGjzwdW-NMJ:www.queijosnobrasil.com.br/portal/index.php%3Fcod_tipo%3D2%26cod_dados%3D172+polui%C3%A7%C3%A3o+do+soro&cd=17&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br > Acesso em: 13 de fevereiro de 2010.

ROLLAND, J. Subproductos lácteos. **Ciencia e tecnologia de la leche**. Zaragoza: Acribia, 1991. Cap. 13.

SANTIAGO, P. A et al. Estudo da produção da β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 567-572, 2004.

SANTOS, Fabiano Pereira dos. **Meio ambiente e poluição**. Jus Navigandi, Teresina, ano 9, n. 201, 23 jan. 2004. Disponível em: < <http://jus.uol.com.br/revista/texto/4753> >. Acesso em: 22 nov. 2010.

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O. P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Canadian Journal Microbiology**, v. 50, p. 1-17, 2004.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações e modificações**. São Paulo: Livraria Varela, 1996. 517 p.

SHIH, I. L.; VAN, Y. T. The production of poly-(γ -glutamic acid) from microorganisms and its various applications. **Bioresource Technology**, v. 79, n. 3, p. 207-225, 2001.

SILVA, P. R. F.; FREITAS, T. F. E. Biodiesel: o ônus e o bônus de produzir combustível. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 843-851, mai-jun, 2008. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000300044&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt >. Acesso em: 4 de março de 2010.

SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, n. 27, p. 30-39, 2009.

SILVA, M. R. **Obtenção de hidrolisados enzimáticos do concentrado protéico do soro de leite com alto teor de oligopeptídeos e elevada atividade inibitória sobre a enzima conversora de angiotensina, utilizando a pancreatina e a papaína**. 2010. 86 p. Trabalho de conclusão de curso - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010. Disponível em: < http://dspace.lcc.ufmg.br/dspace/bitstream/1843/URMR-87LMYM/1/dissertacao_mauro_ramalho_silva.pdf >. Acesso em: 26 de setembro de 2010a.

SILVA, S. B. **Produção e otimização do processo de obtenção de Ácido γ -Poliglutâmico através de cultivo de *Bacillus subtilis* BL53**. Porto Alegre: UFRGS, 2009. 114 p. Tese de doutorado – Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010b.

SLEATOR, R. D.; HILL, C. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 49 – 71, 2001.

SOLIMAN, N. A.; BEREKAA, M. M.; ABDEL-FATTAH, Y. R. Polyglutamic acid (PGA) production by *Bacillus* sp. SAB-26: application of Plackett-Burman experimental design to evaluate culture requirements. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, n. 3, p. 259-267, 2005.

SOTTIEZ, P. Subproductos derivados de la elaboración de los quesos. **Leche y productos lácteos**. Zaragoza: Acribia, 1993.

TANIGUCHI, M. et al. Physicochemical properties of cross-linked poly- γ -glutamic acid and its flocculating activity against kaolin suspension. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, n. 2, p. 130-135, 2005.

The Soap and Detergent Association (SDA). Glycerine: an overview. 1990. Disponível em: < http://www.sdascience.org/docs/Glycerine_-_an_overview.pdf >. Acesso em: 6 de março de 2010.

THOMPSON, J. C.; HE, B. B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. **Applied Engineering in Agriculture**, v. 22, p. 261-265, 2006. Disponível em: < <http://www.webpages.uidaho.edu/~bhe/pdfs/Glycerol.pdf> >. Acesso em: 5 de março de 2010.

TORTORA, G.; FUNKE, B.; CASE, C. **Microbiologia**. 6ª. Ed. São Paulo: Artmed, 2003. p. 154-171

USDA – United States Department of Agriculture. **Dairy: World Markets and Trade**. 2005. Disponível em: < <http://www.fas.usda.gov/dlp/circular/2005/05-12Dairy/toc.htm> >. Acesso em: 28 de outubro de 2010.

USDEC. **Manual de referência para produtos de soro dos EUA**. São Paulo, 1997.

WHEY Protein Institute. **Whey Protein FAQ's**. 2008. Disponível em: < <http://www.wheyoflife.org/faq.cfm#3> >. Acesso em: 26 de setembro de 2010.

WILSON, M. **Microbial inhabitants of humans: Their ecology and role health and disease**. Cambridge: Cambridge University Press, 2005. 409 p.

WU, Q. et al. Improvement of poly(γ -glutamic acid) biosynthesis and redistribution of metabolic flux with the presence of different additives in *Bacillus subtilis* CGMCC 0833. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, p. 527-535, 2008.

XU, H. et al. Efficient production of poly(γ -glutamic acid) by newly isolated *Bacillus subtilis* NX-2. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 519-523, 2005.

XU, Q. et al. Levan (β -2, 6-fructan), a major fraction of fermented soybean mucilage, displays immunostimulating properties via Toll-like receptor 4 signalling: induction of interleukin-12 production and suppression of T-helper type 2 response and immunoglobulin E production. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 36, p. 94-101, 2006.