



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
ALIMENTOS**

**USO DE MEMBRANAS NO TRATAMENTO DO SORO
LÁCTEO E SEU APROVEITAMENTO PARA PRODUÇÃO DE
POLI-HIDROXIALCANOATOS (PHAs)**

LÉO SERPA

FLORIANÓPOLIS

2012

Léo Serpa

**USO DE MEMBRANAS NO TRATAMENTO DO SORO
LÁCTEO E SEU APROVEITAMENTO PARA PRODUÇÃO DE
POLI-HIDROXIALCANOATOS (PHAs)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em **Engenharia de Alimentos**, como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Engenharia de Alimentos**.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Cunha Petrus

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Regina Vasconcellos Antônio

Florianópolis, SC

Setembro, 2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Serpa, Léo

Uso de membranas no tratamento do soro lácteo e seu aproveitamento para produção de poli-hidroxialcanoatos (PHAs) [tese] / Léo Serpa ; orientador, José Carlos Cunha Petrus ; co-orientadora, Regina Vasconcellos Antônio. - Florianópolis, SC, 2012.

158 p. ; 21cm

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Inclui referências

1. Engenharia de Alimentos. 2. Processos de separação com membranas. 3. Produção de PHAs. 4. E. coli recombinante. 5. Soro de queijo. I. Petrus, José Carlos Cunha. II. Antônio, Regina Vasconcellos. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação Em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

**USO DE MEMBRANAS NO TRATAMENTO DO SORO
LÁCTEO E SEU APROVEITAMENTO PARA PRODUÇÃO DE
POLI-HIDROXIALCANOATOS (PHAs)**

Léo Serpa

Tese de Doutorado julgada para obtenção do título de **Doutor em Engenharia de Alimentos**, área de concentração Engenharia de Alimentos, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC.

Prof. Dr. José Carlos Cunha Petrus
Orientador

Prof^a. Dr^a. Regina Vasconcellos Antônio
Co-orientadora

Prof. Dr. João Borges Laurindo
Coordenador do PGEAL

Banca examinadora:

Prof. Dr. José Carlos Cunha Petrus
Orientador

Prof^a. Dr^a. Gláucia Maria Falcão do Aragão
Membro(a) - Comissão Julgadora

Prof^a. Dr^a. Camila Baldasso
Membro(a) externo - UCS

Prof. Dr. Nei Fronza
Membro externo – IFC/Concórdia

Prof. Dr. Claudimir Antonio Carminatti
Membro externo – UFC/Joinville

Prof. Dr. Marco Di Luccio
Membro interno – PGEAL/UFSC

Florianópolis, 10 de setembro de 2012.

“O homem que venceu na vida é aquele que viveu bem, riu muitas vezes e amou muito; que conquistou o respeito de homens inteligentes e o amor das crianças; que preencheu um lugar e cumpriu uma missão; que deixa o mundo melhor do que o encontrou, seja com uma flor, um poema perfeito ou o salvamento de uma alma; que procurou o melhor nos outros e deu o melhor de si.”

(Robert Louis Stevenson)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida...

Ao professor José Carlos Cunha Petrus, pelo aceite na orientação do trabalho, que permitiu meu ingresso como doutorando, pelo estímulo, incentivo e apoio durante o desenvolvimento da pesquisa, pelos momentos dedicados à leitura cuidadosa do texto e trabalhos submetidos a eventos e periódicos, e pela confiança em mim depositada.

À professora Regina Vasconcellos Antônio, pelas sugestões e incentivo durante a realização do trabalho, pelos cafezinhos no laboratório, quando discussões técnicas eram intercaladas com momentos descontraídos, pela amizade, e pela confiança, que além de fomentar minha iniciação na área biotecnológica, também contribuiu decisivamente para a conclusão deste estudo.

Ao professor Marco Di Luccio, pela amizade, pela leitura do trabalho e incentivo ao meu ingresso na área de pesquisa.

Aos professores que compuseram a banca de qualificação, Gláucia Maria Falcão do Aragão, Andrea Lima dos Santos Schneider, Márcio José Rossi e José Miguel Muller, pelas sugestões e críticas ao projeto de Tese.

Aos professores da banca de defesa de doutorado, pelas sugestões e críticas, que me auxiliaram na melhoria da versão final. Ao professor José Alexandre pelo relato da tese.

Aos colegas Claudimir, Katia e Silvia, parceiros no Laboratório de Processos de Separação com Membranas (LABSEM), pelo companheirismo e apoio durante as atividades experimentais com membranas. Ao colega Américo, pelos momentos descontraídos, e demais colegas dos Laboratórios do Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, sempre disponíveis para auxiliar nos momentos necessários.

Às colegas Karina, Raquel, Malu, e ao colega Diego, parceiros no Laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular de Micro-organismos (LBBMM), pelos momentos descontraídos, trabalhosos e estressantes, que contribuíram para os ajustes e sucesso

das atividades experimentais. À Mara e aos professores Danilo e Ariane, pelo convívio nos momentos de laboratório. Aos professores Paulo Ogliari e Pedro Barbeta, pela disposição em fornecer suporte estatístico. Às estagiárias Mariane, Lizandra, Gabriela e Jenniffer, pelo suporte na realização dos experimentos.

Ao Instituto Federal Catarinense (IFC), Campus de Camboriú, na pessoa do Professor Augusto Servelin, pela dispensa e apoio durante a realização do doutorado. Aos colegas Tcheco e Sirlei pelo incentivo. Aos colegas Luis Álvaro e Lairton, pelo apoio na preparação da matéria-prima do estudo. Às colegas Mercedes e Sônia, pelo apoio no momento da defesa. Aos demais colegas do IFC, pelo companheirismo.

À Universidade Federal de Santa Catarina, pela disponibilidade dos recursos e laboratórios para realização das atividades experimentais. À Capes, pelo apoio financeiro.

Ao amigo Juarez, pela amizade, apoio e incentivo nos momentos mais difíceis e aos amigos Mathias Schramm, Jolcemar Ferro, Agostinho, Sheila e Nei pela amizade e incentivo ao ingresso no doutorado.

À minha esposa Valdirene, companheira inseparável, pela compreensão, carinho, amor, pelas leituras e correções nas diversas versões do documento, incentivo ao meu crescimento pessoal e principalmente, pela força e apoio a todos os momentos em que a Tese foi prioritária aos momentos de convívio familiar. Ao meu filho Bruno, pelo carinho, amor e compreensão durante as ausências necessárias à realização dos trabalhos. Ao meu filho Lorenzo, nascido na fase final da Tese, por ser “a cara do papai”! A meus pais, Alivino e Ilvani, aos meus irmãos Mauro e Letícia e à minha sogra Vitória, pela força e torcida durante a realização do doutorado.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Empregando processos com membranas, isolados ou conjugados, é possível concentrar e fracionar proteínas e eliminar gordura do soro de queijo, reduzindo sua carga poluente e permitindo utilizar as correntes concentradas em produtos alimentícios, agregando-lhes valor econômico e nutricional. Através da ultrafiltração, por exemplo, é possível concentrar as principais proteínas do soro lácteo (albuminas e globulinas), enquanto a nanofiltração permite concentrar a lactose e parte dos sais minerais, especialmente os bi e tri-valentes. Considerando-se, ainda, o teor de matéria orgânica presente na corrente permeada da ultrafiltração do soro lácteo, principalmente a lactose, abre-se a possibilidade de utilizá-la como matéria-prima para a produção de compostos de interesse tecnológico, como biopolímeros, através de bioprocessos. Podem ser citados como exemplos os poli-hidroxicanoatos (PHAs), que são poliésteres sintetizados por bactérias a partir de substratos carbônicos. Por serem biodegradáveis e produzidos a partir de fontes renováveis de carbono, os PHAs são considerados uma alternativa aos materiais plásticos convencionais. Comercialmente, há interesse em reduzir custos na produção destes biopolímeros, buscando-se substratos de baixo valor comercial. Neste caso, o permeado do soro de queijo, obtido por ultrafiltração, se apresenta como fonte de carbono para esta finalidade, já que é um subproduto de baixo custo. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o emprego de processos de separação com membranas no tratamento do soro de queijo, propondo-se a produção biotecnológica do polímero biodegradável - PHA - utilizando-se a bactéria *E. coli* recombinante, a partir do permeado obtido da concentração das proteínas do soro. Foram utilizadas membranas de ultra e nanofiltração com massa molar de corte de 50.000 e de 150 a 300 g·mol⁻¹, respectivamente. Buscando-se estabelecer as melhores condições operacionais durante o processamento do soro lácteo, em unidade piloto, variou-se a temperatura, a pressão transmembrana e a vazão de alimentação. Foram avaliados os fatores de concentração dos componentes presentes no soro de queijo, o fluxo permeado e as resistências ao fluxo permeado que se estabelecem durante o processo. Para a produção de PHAs, utilizou-se *E. coli* recombinante linhagens JM 101 e ATCC 25922, contendo o plasmídeo pRLC2, ancorando genes responsáveis pela resistência a ampicilina e biossíntese de PHAs, obtidas através de técnicas de engenharia genética. As condições de cultivo da *E. coli* foram avaliadas em relação à produção de massa celular seca (MCS) (g·L⁻¹) e do percentual de

acúmulo intracelular de PHAs ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Durante a ultrafiltração do soro de queijo, observou-se que o *fouling* e a formação de camada gel alteraram particularmente a seletividade da membrana em algumas condições experimentais, retendo compostos com massa molar inferior ao ponto de corte da membrana, levando a uma redução do fluxo permeado. Em relação aos cultivos, observou-se um efeito significativo ($p < 0,05$) da utilização da lactose presente no soro de queijo sobre a produção de MCS. Observou-se, também, acúmulo intracelular de PHAs em *E. coli* recombinante linhagem JM 101 com o plasmídeo pRLC2, não sendo necessária a utilização do promotor de expressão gênica IPTG, apresentando acúmulo intracelular de PHAs de até 11,0% ($\pm 0,6$). A utilização do permeado do soro de queijo obtido por ultrafiltração, como substrato para a produção de PHAs em *E. coli* recombinante linhagem ATCC 25922 (pRLC2), levou à produção de até $3,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de MCS e acúmulo intracelular de PHAs de até 86,5%, evidenciando a possibilidade de se utilizar o soro de queijo ultrafiltrado na produção de PHAs, dando um destino biotecnológico ao tratamento deste resíduo originado das queijarias.

Palavras-chave: soro de queijo, processos de separação com membranas, lactose, biopolímeros, *E. coli* recombinante.

ABSTRACT

Membrane separation processes can be used for defatting, concentrate and to fractionate proteins of cheese whey. The fraction obtained this way can be used in formulation of different food products, thus adding value to this byproduct of dairy industries. The major whey proteins (albumins and globulins) can be concentrated by ultrafiltration, while nanofiltration can concentrate part of the lactose and minerals, particularly the bi- and trivalent salts. The permeate stream obtained in the ultrafiltration of the cheese whey still holds a large organic load due to the high content of lactose. Hence, it might be used as raw material for the production of compounds of technological interest, like the biopolymers as polyhydroxyalkanoates (PHAs). PHA is a class of polyesters synthesized by bacteria. Since PHAs are biodegradable and produced from renewable carbon, they are considered as an alternative to conventional plastics. Commercially, there is an interest in reducing costs in the production of these biopolymers, using low cost substrates. In this context, the cheese whey permeate obtained by ultrafiltration is a potential carbon source for PHAs production. The aim of this study was to evaluate the use of membrane separation processes in the treatment of cheese whey, proposing the use of the permeate fraction for the production of biodegradable biopolymer - PHAs by recombinant *E. coli* strain. The whey was permeated through ultra and nanofiltration membranes with molecular weight cut off of 50.000 and 150-300 g·mol⁻¹, respectively. The best operating conditions for membrane processing of the whey were determined in a pilot unit, varying temperature, transmembrane pressure and flow rate. The concentration factors of the constituents present in cheese whey were assessed, as well as the permeate flow and the resistance to the permeate flow during the process. Recombinant *E. coli* strains JM 101, and ATCC 25922 containing the plasmid pRLC2 anchoring genes encoding enzymes needed to PHAs biosynthesis were used in PHAs production assays. In the ultrafiltration of cheese whey, it was found that the fouling and formation of gel layer changed the selectivity of the membrane in some experimental conditions; causing the retention of compounds with lower molecular mass than the membrane nominal molecular mass cut-off, leading to a reduction in permeate flow. There was a significant effect ($p < 0.05$) of lactose present in cheese whey on the bacterial dry cell weight (DCW) yield. The intracellular accumulation of PHAs in *E. coli* strain JM 101 was up to 11.0% (± 0.6). The use of the permeate from cheese whey ultrafiltration as substrate for the production of PHAs

by recombinant *E. coli* ATCC 25922 (pRLC2) led to a cell production up to $3.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ DCW and intracellular accumulation of PHAs up to 86.5%. These results suggest the possibility of using the permeate of cheese whey ultrafiltration for production of PHAs, adding value to this dairy byproduct through a biotechnological application.

Keywords: cheese whey, membrane separation processes, lactose, biopolymers, polyhydroxyalkanoates, recombinant *E. coli*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ação da enzima β -galactosidase (lactase) na reação de hidrólise da lactose.....	36
Figura 2 - Esquema ilustrativo dos passos envolvidos na clonagem de DNA plasmidial (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).....	39
Figura 3 - Mecanismo molecular proposto para explicar a transformação de <i>E. coli</i> utilizando molécula de DNA exógeno (NASCIMENTO <i>et al.</i> 2003).....	41
Figura 4 - Fluxograma das atividades experimentais realizadas neste estudo.....	47
Figura 5 - Fotografia da unidade piloto de filtração utilizada no estudo - 1) tanque de alimentação encamisado; 2) motor; 3) bomba de pressão positiva; 4) dreno; 5) termômetro; 6) módulo de membranas (UF ou NF); 7) manômetro; 8) válvula de contra-pressão; 9) banho-maria para circulação de água; 10) filtro para água de limpeza.....	48
Figura 6 - Fluxograma dos experimentos de ultra e nanofiltração..	53
Figura 7 - Fluxograma de obtenção do plasmídeo pRLC2 (BRESSAN, 2007).....	56
Figura 8 - Sequência das transformações microbianas realizadas para obtenção das células recombinantes de <i>E. coli</i> JM 101 e ATCC 25922 com plasmídeo pRLC2.....	59
Figura 9 - Frasco de Duran, capacidade volumétrica útil de 0,5 L, composto por: a) bomba de aeração, b) filtro de ar na linha de alimentação, c) tubulação para descarga de pressão, e d) coletor de amostras.....	62
Figura 10 - Fluxo permeado de ultrafiltração utilizando água pura em diferentes pressões por período de 10 min.....	73
Figura 11 - Fluxo de água utilizando-se a membrana de ultrafiltração em diferentes pressões.....	75
Figura 12 - Fluxos permeados do soro nas condições experimentais determinadas pela matriz experimental do primeiro DCCR 2 ³	77
Figura 13 - Gráfico de Pareto com análise dos efeitos absolutos das variáveis temperatura, pressão e vazão de alimentação, e suas relações com o fluxo permeado final.....	81

Figura 14 - Superfície de resposta do fluxo permeado final obtido na ultrafiltração do soro de queijo.....	82
Figura 15 - Fluxo permeado de nanofiltração utilizando água pura em diferentes pressões por período de 10 min.....	90
Figura 16 - Fluxo de permeação de água em membrana de nanofiltração.....	90
Figura 17 - Fluxos de permeação das condições experimentais determinadas pela matriz do segundo DCCR 2 ³ – Nanofiltração....	93
Figura 18 - Gráfico de Pareto dos efeitos absolutos das variáveis no fluxo permeado de nanofiltração.....	95
Figura 19 - Retorno de fluxo permeado através do processo de limpeza <i>CIP</i> da membrana de ultrafiltração. As colunas escuras mostram os resultados de fluxo permeado obtidos com sistema <i>CIP</i> , utilizando limpeza alcalina e ácida e as colunas vazadas mostram os resultados obtidos sem a utilização da limpeza ácida.....	102
Figura 20 - Células recombinantes de <i>E. coli</i> ATCC 25922 ancorando plasmídeo pRLC2 obtidas por técnicas de DNA recombinante.....	105
Figura 21 - Regulação negativa. Ligação da lactose à proteína repressora <i>LacI</i> , permitindo a livre passagem da DNA polimerase e a transcrição dos genes (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995)..	107
Figura 22 - Resultado de cultivo da <i>E. coli</i> ATCC 25922 em meio mineral M9 com lactose monohidratada e glicose, com e sem a presença de ampicilina (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), conforme segue: (A) M9+lactose+amp, (B) M9+lactose, (C) M9+glicose+amp e (D) M9+glicose.....	110
Figura 23 - Comportamento cinético da linhagem recombinante ATCC 25922 na produção de MCS ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), PHAs ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), Xr (MCS residual)($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e consumo de substrato (lactose)($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) utilizando frascos de <i>Erlenmeyer</i> (frascos de sacrifício) durante 24 h de cultivo, temperatura de 37 °C e agitação de 200 rpm.....	121
Figura 24 - Comportamento cinético da linhagem recombinante ATCC 25922 na produção de MCS ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), PHAs ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), Xr (MCS residual)($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e consumo de substrato ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) utilizando frasco de Duran aerado durante 24 h de cultivo à temperatura de 37 °C.....	122

Figura 25 - Modelagem preditiva da linhagem recombinante ATCC 25922 realizada com modelo de Gompertz modificado - cultivo em frascos de <i>Erlenmeyer</i>	124
Figura 26 - Modelagem preditiva da linhagem recombinante ATCC 25922 realizada com modelo de Gompertz modificado – cultivo em frascos aerados.....	124
Figura 27 - Dados médios de pH em ambas as modalidades de cultivo da <i>E. coli</i> recombinante ATCC 25922 (pRLC2), durante 24 horas em temperatura de 37 °C.....	128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Níveis das variáveis estudadas no DCCR 2 ³ utilizado nos experimentos de ultrafiltração do soro de queijo.....	50
Tabela 2 - Níveis das variáveis estudadas no DCCR 2 ³ utilizado nos experimentos de nanofiltração do soro de queijo.....	51
Tabela 3 - Ferramentas estatísticas utilizadas no estudo.....	66
Tabela 4 - Composição centesimal e contagem microbiana do soro utilizado neste estudo e composição centesimal do soro doce e ácido.....	69
Tabela 5 - Matriz experimental do DCCR 2 ³ com valores reais para temperatura, pressão e vazão de alimentação. Como resposta: os fluxos permeados (J) e o percentual de redução de fluxo dos ensaios experimentais de ultrafiltração do soro.....	76
Tabela 6 - Análise de variância (ANOVA). Fluxo permeado final dos ensaios experimentais de ultrafiltração (DCCR 2 ³). Sendo L: linear e Q: quadrática.....	80
Tabela 7 - Percentual de sólidos totais, proteína e lactose das correntes de alimentação, concentradas e permeadas obtidas por ultrafiltração do soro.....	83
Tabela 8 - Relação proteína/lactose ($R_{P/L}$) das correntes de alimentação, permeada e concentrada. Percentual de redução da relação proteína/lactose calculados pela Equação 4.....	85
Tabela 9 - Coeficientes de rejeição (CR) de sólidos totais, proteínas e lactose presentes no soro utilizando membrana de ultrafiltração até FC= 3.....	87
Tabela 10 - Composição e coeficiente de rejeição na CCS·mL ⁻¹ em permeado do soro ultrafiltrado.....	88
Tabela 11 - Matriz experimental do DCCR 2 ³ com valores reais para temperatura, pressão e vazão de alimentação. Como resposta: os fluxos permeados (J) e o percentual de redução de fluxo dos ensaios experimentais de nanofiltração do soro.....	92
Tabela 12 - Análise de variância (ANOVA). Fluxo permeado final dos ensaios experimentais de nanofiltração (DCCR 2 ³). Sendo L: linear e Q: quadrática.....	95

Tabela 13 - Percentual (m/v) de sólidos totais, proteína e lactose das correntes de alimentação, concentrada e permeada obtidas por nanofiltração do soro.....	98
Tabela 14 - Relação proteína/lactose das correntes de alimentação, permeada e concentrada. Percentual de redução da relação proteína/lactose calculados pela Equação 4.....	99
Tabela 15 - Coeficientes de rejeição (CR) de sólidos totais, proteínas e lactose presentes no soro utilizando membrana de nanofiltração.	100
Tabela 16 - Produção de MCS ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e percentual de acúmulo intracelular de PHAs em <i>E. coli</i> recombinante linhagem JM 101.	109
Tabela 17 - Cultivos de <i>E. coli</i> recombinante ATCC 25922 (pRLC2) cultivada em meio LB. Resultados de MCS ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), PHAs (%) e PHV (%) presente no biopolímero.....	112
Tabela 18 - Resultados de MCS ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), PHAs ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e percentual de acúmulo de PHAs (p/v) dos cultivos da linhagem recombinante ATCC 25922 utilizando meio LB, soro e permeados de ultrafiltração em frascos de Duran.....	114
Tabela 19 - Tabela comparativa de produção de MCS ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e percentual de acúmulo de PHAs (p/v) utilizando diferentes linhagens de <i>E. coli</i> recombinante com diferentes plasmídeos.....	118
Tabela 20 - Dados referentes à velocidade específica máxima na fase de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$), duração da fase lag (h) e coeficiente de correlação (R^2) do modelo de Gompertz modificado aos dados experimentais.....	123
Tabela 21 - Produtividade de PHAs ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) e conversão de substrato em MCS ($Y_{x/s}$) (g/g) e em PHAs ($Y_{p/s}$) (g/g) da <i>E. coli</i> recombinante ATCC 25922 (pRLC2) em cultivos de 24 horas.....	126

LISTA DE ABREVIATURAS E UNIDADES

ABIQ: Associação Brasileira das Indústrias de Queijo

BSA: Albumina de soro bovino

$C_{lactose}$: concentração de lactose

CCS: contagem de células somáticas

CIP: *cleaning in place* (limpeza no local)

cut off: massa molar de corte

Da: dalton, $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (dalton), $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

DBO: demanda bioquímica de oxigênio

DQO: demanda química de oxigênio

DNA: ácido desoxirribonucleico

FC: fator de concentração volumétrica

g: grama

$\cdot g$: força centrífuga, força “g”

MHz: Megahertz (unidade de frequência)

kDa: kilodaltons

K_{La} : coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio

L: litro

M: molaridade

MM: meio mineral

MCS: massa celular seca

min: minuto

μL : microlitro

μg : micrograma

Outliers: elementos com comportamento diferente dos demais

pb: pares de bases

PEBD: polietileno de baixa densidade

PES: poli(éter-sulfona)

PHAs: poli-hidroxiálcanoatos

P(3HB): poli(3-hidroxi-butirato), PHB

P(3HB-co-3HV): poli (3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato)

pRLC2: plasmídeo com genes *phbA*, *phbB* e *phbC* (*LBBMM/UFSC*)

m/v: massa/volume

rpm: rotações por minuto

t_g: tempo de geração

X_r: Massa celular residual

$Y_{x/s}$; $Y_{p/s}$: fatores de conversão de substrato em célula e de substrato em PHAs

$\mu_{máx}$: velocidade máxima de crescimento celular na fase exponencial

LISTA DE SÍMBOLOS

Q_{o_2}	Velocidade específica de respiração celular
Q_p	Vazão de permeação
n	Número de células
n_c	Número de células no tempo zero
R_g	Resistência da camada gel
$S(\pm)$	Desvio padrão amostral
σ	Desvio padrão populacional
λ	Tempo de permanência na fase <i>Lag</i>
ϕ	Vazão de alimentação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
1.1 OBJETIVO GERAL	28
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	29
2.1 O SETOR AGROINDUSTRIAL LÁCTEO	29
2.2 LEITE E SORO DE QUEIJO	29
2.3 EFLUENTES DE LATICÍNIOS.....	30
2.4 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO COM MEMBRANAS.....	31
2.4.1 Ultrafiltração	32
2.4.2 Nanofiltração	33
2.4.3 Ultra e nanofiltração no tratamento de leite e/ou soro de queijo.....	33
2.5 LACTOSE.....	36
2.6 A BACTÉRIA <i>E. COLI</i>	38
2.7 PLASMÍDEOS - VETORES DE CLONAGEM.....	38
2.8 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA	40
2.9 O OPERON <i>LAC</i> (<i>LACZ</i> E <i>IPTG</i>).....	41
2.10 PRODUÇÃO DE PHAS	43
2.10.1 Micro-organismos produtores de PHAs.....	44
3 METODOLOGIA	47
3.1 UTILIZAÇÃO DE PROCESSOS DE SEPARAÇÃO COM MEMBRANAS NO TRATAMENTO DO SORO DE QUEIJO.....	47
3.1.1 Ultrafiltração e nanofiltração.....	47
3.1.2 Caracterização do soro de queijo, correntes de alimentação, concentrada e permeada	54
3.2 CULTIVO DE <i>E. COLI</i> E PRODUÇÃO DE PHAS.....	55
3.2.1 Micro-organismo, plasmídeo e armazenamento.....	55
3.2.2 Meios de cultivo	57
3.2.3 Soluções	58
3.2.4 Obtenção de <i>E.coli</i> recombinante	59
3.2.5 Avaliação de cultivo da <i>E. coli</i> na produção de PHAs	61

3.2.6 Determinações analíticas	64
3.2.7 Extração do DNA plasmidial.....	66
3.3 FERRAMENTAS ESTATÍSTICAS EMPREGADAS NO ESTUDO.....	66
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4.1 UTILIZAÇÃO DE PROCESSOS DE SEPARAÇÃO COM MEMBRANAS NO TRATAMENTO DO SORO DE QUEIJO	69
4.1.1 Caracterização do soro de queijo.....	69
4.1.2 Ensaios de ultrafiltração.....	73
4.1.3 Ensaios de nanofiltração.....	89
4.1.4 Limpeza do módulo de ultrafiltração e nanofiltração	101
4.2 APROVEITAMENTO DO SORO TRATADO POR PROCESSOS DE SEPARAÇÃO COM MEMBRANAS NA PRODUÇÃO DE PHAS	104
4.2.1 Obtenção de células recombinantes (transformação) e características relevantes.....	104
4.2.2 Avaliação de cultivo da E. coli recombinante linhagem JM 101	105
4.2.3 Avaliação de cultivo da E. coli recombinante linhagem ATCC 25922	110
5 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	131
5.1 CONCLUSÕES DO TRABALHO	131
5.2 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	132
REFERÊNCIAS.....	133
ANEXOS.....	151

1 INTRODUÇÃO

O leite é uma matéria-prima composta principalmente por proteínas, gordura, minerais, vitaminas e lactose, sendo essa última de reduzido interesse tecnológico e comercial. Se destinado à fabricação de queijos, o leite gera um subproduto denominado soro de queijo, reconhecido, segundo Hosseini, Shojaosadati e Towfighi (2003), como um dos principais contaminantes ambientais gerados por laticínios. Segundo Lira *et al.* (2009), a carga poluente do soro de queijo é dezenas de vezes maior que a do esgoto doméstico.

Na fabricação dos queijos mais tradicionais, como minas frescal, meia cura, mussarela e parmesão, 90% do volume de leite utilizado é descartado sob a forma de soro. Este soro contém aproximadamente 93,70% de água, 0,84% de proteínas, 4,99% de lactose e 0,47% de sais minerais, com demanda bioquímica de oxigênio (DBO) entre 30 e 60 mg·L⁻¹ e demanda química de oxigênio (DQO) entre 50 e 80 mg·L⁻¹ (CORDI *et al.*, 2007).

Em 2000, o Brasil já produzia 3,15 bilhões de litros de soro de queijo ao ano (ARAÚJO, 2001), e estimativas dão conta de que em 2011 o volume foi de 6,02 bilhões de litros (LENCASTRE *et al.*, 2011). Considerando-se cálculos efetuados por Homem (2004), se o volume de soro estimado para 2011 fosse lançado ao ambiente, equivaleria à poluição anual produzida por aproximadamente 6 milhões de pessoas.

Apesar da produção mundial de soro de queijo ter aumentando nos últimos anos e a legislação ambiental que trata do tema ter se tornado mais rigorosa, até 2004, 50% do soro produzido no Brasil era descartado no meio ambiente (LIRA *et al.*, 2009). Da parcela restante, parte era direcionada ao tratamento de efluentes e outra destinada às diversas aplicações industriais.

Para descarte ambientalmente correto do soro de queijo é necessária a remoção de gordura, proteínas e lactose, reduzindo-se, desta forma, sua DBO e DQO. Proteínas e gordura podem ser removidas por precipitação e flotação, respectivamente, porém, a remoção da lactose, um dissacarídeo oriundo exclusivamente do leite e derivados, com baixo poder adoçante e baixa massa molar (342,3 g·mol⁻¹), dificilmente pode ser realizada através de processos físicos tradicionais como centrifugação, evaporação ou precipitação.

O fracionamento dos componentes presentes no soro de queijo com a utilização de processos de separação com membranas reduz sua carga orgânica, bem como os impactos ambientais por ele gerados, mas não soluciona a questão relativa ao destino da lactose, que segundo Rice

et al. (2009), quando presente no efluente industrial, eleva significativamente os custos para tratamento.

Enquanto se buscam formas de reduzir impactos ambientais causados pelo soro de queijo lançado diretamente na natureza, o setor biotecnológico busca matérias-primas de baixo custo para serem utilizadas como fontes de carbono na produção de hidrogênio, etanol, antibióticos e biopolímeros. Os poli-hidroxicarboxilatos (PHAs), que são biopolímeros plásticos biodegradáveis, poderiam ser produzidos biotecnologicamente utilizando-se como substrato carbônico a lactose presente no soro de queijo ou nos permeados obtidos por processos de separação com membranas, se fossem utilizados micro-organismos capazes de aproveitá-la como fonte de energia.

Desta forma, a hipótese do presente estudo é de que o tratamento do soro de queijo através de processos com membranas pode contribuir significativamente para que ele se torne um meio adequado à produção de PHAs a partir de *Escherichia coli* (*E. coli*) recombinante.

1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a utilização de processos de separação com membranas no tratamento do soro de queijo para a produção biotecnológica dos polímeros biodegradáveis - PHAs - por *E. coli* recombinante com o plasmídeo pRLC2, como alternativa ao aproveitamento de lactose.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os principais parâmetros operacionais que influenciam a ultrafiltração e a nanofiltração do soro de queijo.
- Caracterizar quimicamente as correntes do soro de queijo obtidas nos tratamentos por ultra e nanofiltração.
- Obter isolados recombinantes de *E. coli* com plasmídeo pRLC2.
- Avaliar o potencial de utilização das correntes obtidas por ultra e nanofiltração do soro de queijo como substratos únicos e também suplementados em meio aerado e não aerado, para a produção de PHAs em isolados de *E. coli* recombinante com o plasmídeo pRLC2.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo é apresentada a base conceitual que fundamenta a pesquisa: setor agroindustrial lácteo e a produção do soro de queijo, utilização de processos de separação com membranas no tratamento do soro de queijo, além da transformação e cultivo de *E. coli* recombinante e sua utilização na produção de PHAs.

2.1 O SETOR AGROINDUSTRIAL LÁCTEO

O setor lácteo brasileiro, no ano de 2009, já tinha participação de 9,3% no PIB nacional, com faturamento de 291,6 bilhões de reais. Finalizou o ano de 2008 com 38.500 indústrias formais, destas, 81,7% consideradas microindústrias, gerando 1.437.800 empregos diretos (ABIA, 2011; EMBRAPA, 2012).

Com 32,3 bilhões de litros de leite produzidos no ano de 2011 (66,8% inspecionados) e um plantel com mais de 23 milhões de vacas em lactação, o segmento lácteo é o quarto mais expressivo da indústria alimentícia brasileira (EMBRAPA, 2012). É considerado uma das cadeias mais importantes sob os pontos de vista econômico e social, com perspectivas positivas de crescimento, geradas pelo déficit da balança comercial (ABIQ, 2011). Corroborando com este cenário, o estado de Santa Catarina (SC) passou de um bilhão de litros produzidos no ano de 2000 para 2,18 bilhões em 2008. Com apenas 1,12% da extensão territorial do país, no ano de 2007, o estado de SC era o quinto maior produtor nacional de leite (MILKPOINT, 2009).

2.2 LEITE E SORO DE QUEIJO

Segundo o Decreto 30.691/52 - RIISPOA (Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal), Art. 475, “entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas”. Considerado somente de origem bovina pela legislação brasileira, o leite sem outra denominação representa 82,9% dos mais de 735 bilhões de litros mundialmente produzidos e comercializados no ano de 2011 pelas diferentes espécies de animais (EMBRAPA, 2012).

O leite integral é um produto complexo composto por aproximadamente 12,7% de sólidos, contendo 3,6% de gordura, 3,3% de proteínas e 4,9% de lactose (TRONCO, 2010), além de vitaminas e

minerais, sendo que a lactose é um dissacarídeo altamente poluente (YANG; TANG; OKOS, 1998) e com menor poder adoçante que seus produtos de hidrólise - glicose e galactose (KLEIN; JONG; REVILLION, 2010).

Na utilização do leite para fabricação dos queijos mais tradicionais, podem-se utilizar enzimas para insolubilizar e/ou precipitar a fração da caseína presente (BEHMER, 1987). Quando essa proteína é precipitada, o soro de queijo é extraído por técnicas de dessoragem, carreando muitos dos componentes hidrossolúveis do leite, dentre eles, vitaminas, proteínas e aproximadamente 94% da lactose presente.

O soro de queijo é um subproduto da indústria láctea e apresenta em média 93,7% (m/v) de água, 0,8% (m/v) de proteínas e 4,8% (m/v) de lactose, além de gordura, sais minerais e vitaminas. O soro é considerado pela legislação brasileira (Decreto 30.691/52, Art. 694) como sendo o “líquido residual obtido a partir da coagulação do leite, destinado à fabricação de queijos e caseína”. Das possíveis rotas para seu aproveitamento, citam-se, retenção parcial no fabrico dos queijos, direcionamento para o processamento de subprodutos alimentares como bebidas lácteas, ricota, doces e probióticos, produção de petroquímicos como o etanol, produção de ácido láctico, antibióticos, biopolímeros, e/ou tratamento como efluente industrial (BUTYLINA; LUQUE; NYSTROM, 2006; SOARES *et al.*, 2011).

2.3 EFLUENTES DE LATICÍNIOS

Nos laticínios que industrializam leite para o fabrico dos queijos mais tradicionais, como o queijo minas frescal, minas meia cura, mussarela e parmesão, 90% do volume de leite é descartado sob a forma de soro de queijo (EMBRAPA, 2012).

Segundo Penna, Almeida e Oliveira (2009), 40% das indústrias brasileiras produtoras de queijos são microindústrias, muitas sem vínculo com órgãos de inspeção, o que dificulta o levantamento de dados atualizados de produção. Desta forma, estimou-se para 2011 a produção de 241 milhões de kg de lactose presentes em 6,02 bilhões de litros de soro de queijo, sendo parte deste volume destinado às unidades de tratamento de efluentes (LENCASTRE *et al.*, 2011).

Minhalma *et al.* (2007) observaram que grande parte das unidades processadoras de leite descartam o soro de queijo juntamente com o esgoto doméstico. Contrapondo-se a esta realidade, em 2010 o Brasil importou aproximadamente 28.000 toneladas de soro de queijo em pó, sendo destinado às indústrias farmacêutica, alimentícia e de nutrição

animal, totalizando mais de US\$36 milhões (MILKPOINT, 2011). Dados como estes justificam a realização de estudos voltados ao melhor aproveitamento e valorização do soro de queijo.

Segundo Saraiva (2008), o setor lácteo durante muitas décadas desconsiderou os impactos ambientais gerados por seus efluentes, mesmo tendo participação poluidora expressiva. Em seus estudos sobre o potencial poluidor dos laticínios de pequeno porte, esta autora constatou que no estado de Minas Gerais, um dos maiores pólos produtores de derivados lácteos brasileiro, das 1,3 mil cooperativas leiteiras e indústrias de laticínios existentes, somente 69 possuíam sistemas de tratamento de efluentes líquidos operando de forma eficiente.

Silva (2006), em estudo sobre o consumo de água e a geração de efluentes em laticínios, constatou a utilização de 7,03 litros de água para cada litro de leite processado, identificando grande volume de efluente gerado, com DQO entre 55 a 61 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ em soro oriundo da fabricação de queijo minas frescal e de 53 a 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ em soro oriundo da fabricação de queijo mussarela, dados também confirmados por outros autores. Machado *et al.* (2002) relatam valores de DQO de 75 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ em soro de queijo e Cordi *et al.* (2007) relatam DBO em efluente de queijaria variando entre 30 a 60 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e DQO entre 50 e 80 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Dentre os sistemas utilizados no tratamento de efluentes de laticínio pode-se citar o lodo ativado (CORDI *et al.*, 2007) e os processos de separação com membranas (GHALY; KAMAL, 2004), sendo esse descrito a seguir.

2.4 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO COM MEMBRANAS

Movimentando bilhões de dólares anualmente em nível mundial e com crescimento de 8% ao ano, o processo de separação com membranas foi evidenciado pela primeira vez pelo francês Abbé Nollet em 1748. Melhor entendido e mais utilizado após a década de 1970, o processo com membranas apresenta-se cada vez mais como alternativa e com vantagens econômicas e ambientais, na separação, purificação e concentração de componentes de interesse da indústria química e de alimentos. Dentre as técnicas mais utilizadas, citam-se a microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração e osmose inversa (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006).

Utilizando-se os processos de separação com membranas, obtêm-se duas correntes de soluções com composições distintas. De maneira geral e simplificada, pode-se afirmar que as moléculas de

tamanho inferior aos poros da membrana passam através dela formando a corrente de filtrado ou permeado, e as moléculas de tamanho superior aos seus poros são retidas, formando a corrente denominada retentado ou concentrado (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006).

As técnicas de separação com membranas vêm sendo utilizadas para concentrar e/ou fracionar a lactose presente no leite e/ou soro de queijo, impulsionadas pela intolerância à lactose de grande parte dos consumidores adultos ($\pm 70\%$ da população mundial) (MAHAN; SCOTT-STUMP, 1998) e/ou pela necessidade de redução da DBO de efluentes industriais (ATRA *et al.*, 2005).

O processo de separação realizado com membranas porosas (micro e ultrafiltração) utiliza o princípio da exclusão por tamanho dos componentes que se deseja separar, enquanto a nanofiltração envolve, além do tamanho molecular, a carga da molécula. No caso do soro de queijo, gordura, proteínas e/ou lactose podem ser separadas por micro, ultra e/ou nanofiltração (MULDER, 2000; SCHNEIDER; TSUTIYA, 2001; HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006), sendo as duas últimas discutidas nos tópicos seguintes.

2.4.1 Ultrafiltração

A ultrafiltração permite concentrar e/ou reter compostos com massas molares entre 1.000 e 500.000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ e permear compostos como os sais minerais e a lactose (MULDER, 2000; HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006).

O desempenho da ultrafiltração é afetado principalmente pelos fatores que levam a uma redução do fluxo permeado. Dentre eles citam-se a polarização por concentração, formação de camada gel e *fouling*.

O aumento da concentração de sólidos próximos à superfície da membrana é citado por Constenla e Lozano (1997) como polarização por concentração, ou seja, um aumento localizado da concentração de solutos rejeitados na superfície da membrana devido a seu transporte convectivo. Os autores afirmam que este fenômeno pode ser minimizado com o aumento da velocidade de escoamento na superfície da membrana. A polarização por concentração é conhecida como um fenômeno de redução imediata de fluxo.

No escoamento tangencial, a polarização por concentração é minimizada (SCHNEIDER; TSUTIYA, 2001), pois como citado por Bassetti (2002), a polarização por concentração depende das condições hidrodinâmicas do escoamento da solução a ser filtrada. Quanto maior a

velocidade de escoamento tangencial, menor tende a ser a intensidade da polarização por concentração.

A formação de uma camada gel ocorre quando o aumento da concentração de sólidos na superfície da membrana excede seu limite de solubilidade. A camada gel consiste em uma torta delgada na superfície da membrana que forma uma membrana dinâmica secundária, criando resistência adicional, conhecida como resistência da camada gel (R_g) (BASSETTI, 2002).

O *fouling* é um fenômeno geralmente irreversível e redutor da permeabilidade hidráulica da membrana. Quando a membrana apresenta tamanhos de poros muito próximos aos dos diâmetros dos solutos, a colmatação é favorecida, bloqueando os poros ou interagindo química ou fisicamente com eles, reduzindo-os parcialmente e/ou alterando a seletividade da membrana. O acúmulo de partículas coloidais ou macromoléculas nos poros ou superfície da membrana, e a possível cristalização e/ou precipitação de solutos que atravessam os poros, geram o *fouling*. Fatores como velocidade tangencial, pressão, temperatura, turbulência, tamanho das partículas, condições do meio e características da membrana afetam diretamente o seu desempenho em processos de separação (BRONSTEIN; MONTE ALEGRE, 1998).

2.4.2 Nanofiltração

A nanofiltração é um processo de separação que utiliza membranas com massa molar de corte (*cut off*) normalmente entre 200 e 1.000 g·mol⁻¹ (PRUKSASRI, 2007). É utilizada para separar compostos com massas molares menores, como por exemplo, na desmineralização de soluções e/ou na concentração de lactose do soro de queijo (CUARTAS-URIBE *et al.*, 2007).

Maiores pressões são necessárias no processo de nanofiltração em função do seu maior poder de retenção de moléculas de baixa massa molar, apresentando baixa permeabilidade com água, quando se compara com a ultra e, principalmente, com a microfiltração.

2.4.3 Ultra e nanofiltração no tratamento de leite e/ou soro de queijo

A ultrafiltração é o processo de separação com membranas mais utilizado na área de laticínios, sendo empregada para concentrar e/ou fracionar proteínas do leite e/ou soro de queijo.

Bronstein e Monte Alegre (1998), utilizando membrana de ultrafiltração em temperatura de 20 a 50 °C, obtiveram fluxo permeado

de água da ordem de $200 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$. Quando a membrana foi utilizada com soro de queijo, apresentou fluxo permeado inicial de $46,4 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ com queda lenta para $34,4 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$, redução de 25,86% causada provavelmente pela polarização por concentração ou outro fator de redução de fluxo. É importante salientar a diferença de fluxo permeado de soro de queijo em relação à água pura, pois os autores observaram redução de 76,8% em função da presença de sólidos e queda de pH em todos os ensaios experimentais. Os maiores fluxos permeados foram obtidos com soro de queijo em pH mais elevado do que o seu valor natural.

A relação do aumento da pressão com o fluxo permeado é objeto de estudo de diversos autores. Atra *et al.* (2005), por exemplo, constataram que pressões acima de $2 \text{ kgf}\cdot\text{cm}^{-2}$ não apresentam aumento linear de fluxo. Os autores concentraram leite para a fabricação de queijos por ultrafiltração utilizando temperaturas de 30 a $50 \text{ }^\circ\text{C}$, pressão entre 1 e $5 \text{ kgf}\cdot\text{cm}^{-2}$, vazão de 100 a $400 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ e velocidade tangencial com membrana plana de 0,43 a $1,74 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$, alcançando 98% de retenção de proteínas com $3 \text{ kgf}\cdot\text{cm}^{-2}$ de pressão. O permeado rico em lactose posteriormente foi submetido à nanofiltração até um fator de concentração 5 ($\text{FC} = 5$), obtendo-se corrente concentrada com até $250 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de lactose.

Kazemimoghdam e Mohammadi (2007), considerando o *fouling* um dos fatores que contribuem significativamente para o declínio no fluxo permeado, afirmam que é possível reverter o processo utilizando um sistema de limpeza *CIP* (*cleaning in place*) adequado. Porém, são necessárias, além da utilização de compostos químicos estáveis, seguros e de baixo custo, condições operacionais adequadas (temperatura, pressão e vazão), pH, tempo de limpeza, e concentração do produto químico. Os autores estudaram diferentes métodos de limpeza de membranas de polissulfona com massa molar de corte de $30.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ utilizadas para ultrafiltrar leite com 12% de sólidos totais, sendo 3,4% de proteína, 3% de gordura, 4,9% de lactose e 0,7% de minerais. Através dos estudos, obtiveram 100% de recuperação de fluxo permeado com a utilização de sistema *CIP* composto por enxágue, limpeza alcalina, neutralização, limpeza ácida e enxágue final.

O processo de separação com membranas apresenta-se igualmente eficiente na separação de lactose e minerais das proteínas e gordura do soro de queijo. Cunha *et al.* (2003) obtiveram 100% de retenção de gordura em concentrado de soro de queijo utilizando membranas de ultrafiltração com massa molar de corte de $10.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ e pressão de $1,5 \text{ kgf}\cdot\text{cm}^{-2}$. O uso de condições mais amenas de

processo, principalmente pressão e temperatura, minimizam os riscos operacionais e permitem redução nos gastos energéticos.

Na separação com membranas pode-se utilizar tratamentos térmicos prévios para reduzir a carga microbiana inicial do soro de queijo, juntamente com a padronização de pH, evitando assim a precipitação de proteínas presentes. Farro e Viotto (2003) utilizaram, em seus estudos, tratamento térmico de 15 min a 50 °C e correção de pH para 7,3 em soro de queijo antes dos processos de micro e ultrafiltração. Este procedimento, segundo os autores, reduz o efeito de minerais sobre o *fouling* das membranas, precipitando o excesso de sais de fosfato de cálcio e reduzindo o cálcio iônico no líquido de alimentação.

Porém, tratamentos térmicos em soro de queijo devem ser utilizados com cautela, pois Simmons e Fryer (2007), avaliando o efeito da temperatura na desnaturação de proteínas do soro de queijo, concluíram que a 70 °C, após 20 min de exposição, o soro apresenta 20% das proteínas desnaturadas, e a 75 °C, em mesmo período de exposição, 30 a 40% de desnaturação. Estes dados limitam o uso da temperatura em tratamento térmico prévio à ultrafiltração.

Veiga e Viotto (2001) também alertam para a formação de micelas de caseínas residuais em soro de queijo quando submetido a altas temperaturas. Os autores verificaram, através de dados experimentais, uma redução de 76% no tempo de concentração quando utilizaram temperaturas em tratamento térmico de 72 °C por 15 min, em substituição a tratamentos anteriores com temperaturas de 82 °C por 30 min.

Estudos vêm sendo realizados utilizando-se a nanofiltração para a separação da lactose do soro de queijo. Atra *et al.* (2005) submeteram permeado de soro de queijo ultrafiltrado à nanofiltração, utilizando temperaturas de 30 a 50 °C, pressão de 10 a 20 kgf·cm⁻² até FC= 5, obtendo concentrados com 20 a 25% de lactose, resultando em um permeado final com 0,1 a 0,2% de lactose (m/v). Os autores sugerem a utilização de temperatura de 30 °C, pressão de 20 kgf·cm⁻² até FC= 5.

Cuartas-Uribe *et al.* (2007), realizando estudos sobre modelagem de sistemas de separação com membranas, observaram que altas pressões osmóticas da solução influenciaram na redução do fluxo permeado em membranas de nanofiltração. Utilizaram módulo de membranas com configuração espiral e com controle de pressão transmembrana para controle dos parâmetros durante o processo.

Outros autores vêm estudando a concentração da lactose presente no soro de queijo submetido inicialmente a ultrafiltração para retenção de proteínas e gordura. Nestes estudos, o permeado de soro de

queijo obtido por ultrafiltração é enviado à nanofiltração para concentração de seus componentes sólidos, no caso, a lactose. Minhalma *et al.* (2007), em um sistema conjugado de ultra e nanofiltração, concentraram lactose presente no permeado de soro de queijo obtido por ultrafiltração, com pH 6 e 50,6 g·L⁻¹ de lactose. No estudo, os autores obtiveram taxa de permeação de 9,2 L·min⁻¹, à temperatura constante de 25 °C e pressão de 1,5, 2,5 e 3 MPa, com recirculação de concentrado. Foi observado um aumento linear do fluxo permeado em função do aumento da pressão de 1,5 para 2,5 MPa. Os autores concentraram 5 vezes o teor de lactose, sugerindo seu uso na indústria alimentícia, produção de fármacos e/ou enriquecimento de queijos, utilizando o permeado de nanofiltração para limpeza *CIP* e/ou envio a tratamento de efluentes com impacto ambiental reduzido (baixa DBO e DQO).

A lactose concentrada tem sido aplicada como substrato para produção de etanol (CHERYAN, 1998b), obtenção de glicose e galactose por hidrólise (CARMINATTI; PETRUS; PORTO, 2003), produção de ácido láctico, ou concentrada para minimizar os impactos ambientais de efluentes industriais (BRONSTEIN; MONTE ALEGRE, 1998).

2.5 LACTOSE

A lactose presente no leite e/ou no soro de queijo é um dissacarídeo redutor constituído por *D-glicose* e *D-galactose* unidas por uma ligação glicosídica $\beta 1 \rightarrow 4$, conforme Figura 1.

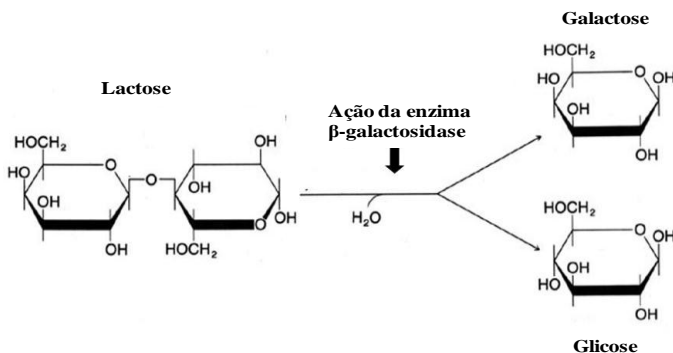


Figura 1 - Ação da enzima β -galactosidase (lactase) na reação de hidrólise da lactose.

Com massa molar de $342,3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (MAIA, 2001), a lactose é um dissacarídeo encontrado principalmente no leite e derivados (RODRIGUES; OLIVEIRA, 2009), sendo que no processo de fabricação de queijos, aproximadamente 94% migra com o soro, restando apenas 6% nos queijos produzidos.

A lactose possui baixa solubilidade em água ($216 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ a $20 \text{ }^\circ\text{C}$) e baixo poder adoçante (KLEIN; JONG; REVILLION, 2010). Soluções de sacarose de 1, 5, 10 e 20% têm o mesmo poder edulcorante que soluções de lactose com 3,5, 15, 30 e 33%, respectivamente (WALSTRA; JENNESS, 1987). A molécula de lactose pode ser clivada em glicose e galactose, através de hidrólise ácida e/ou enzimática. Essa última é realizada por ação da enzima lactase, também conhecida por β -galactosidase ou β -D-galactosidase (SOUSA; ANDRADE; ARAÚJO, 2005). A lactase pode ser obtida a partir de plantas, leveduras, bactérias e/ou fungos. Suas propriedades e massa molar dependem de sua origem.

Os produtos da hidrólise da lactose podem ser utilizados como substrato em processos biotecnológicos. Bakken, Hill e Amundon (1989) alcançaram até 80% de conversão de lactose em glicose e galactose durante 7 min a $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Os autores utilizaram lactase extraída de *Aspergillus oryzae* em reator de fluxo espiral, demonstrando facilidade nos processos de hidrólise. Carminatti, Petrus e Porto (2003), utilizando reator a membranas operando a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH 6,0, conseguiram hidrolisar praticamente 100% da lactose em 60 min de processo.

A primeira fase do metabolismo da lactose em processos fermentativos é a clivagem em unidades monossacarídicas, realizada pela enzima β -galactosidase. Porém, com o objetivo de economizar energia, algumas bactérias somente sintetizam esta enzima quando a lactose encontra-se presente no meio, como é o caso da bactéria *E. coli* (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

Os genes das enzimas β -galactosidase, lactose permease e β -galactosidase transacetilase fazem parte de um grupo de três genes que compõem o operon *Lac* presente em algumas bactérias. Neste caso, a lactose presente é considerada um indutor do operon *Lac*, impedindo a ligação do repressor ao DNA celular, que possui a função de inibir a transcrição genética em micro-organismos com regulação gênica dependentes do operon *Lac* (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995). Com base nesta análise, a lactose presente em meio de crescimento para micro-organismos, segundo Harvey, Champe e Fischer (2008), é considerada também um indutor de expressão gênica, sendo que o operon *Lac* é um modelo de regulação gênica da bactéria *E. coli*.

2.6 A BACTÉRIA *E. coli*

Descrita no ano de 1885, em Munique, pelo médico e professor Theodor Escherich (HAUSMANN, 1997), a *Escherichia coli* (*E. coli*) foi o primeiro organismo utilizado para estudos do DNA recombinante (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995; HAUSMANN, 1997). É uma bactéria Gram-negativa com mais de 6.000 diferentes tipos de compostos orgânicos em sua constituição, incluindo 3.000 proteínas.

Considerada a célula procarionte mais bem estudada por sua simplicidade estrutural e rapidez de duplicação (± 20 min em condições ótimas de cultivo), a *E. coli* se revelou adequada para estudos de biologia molecular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1997). Além do DNA cromossômico, muitas espécies de bactérias, como a *E. coli*, possuem uma ou mais unidades de DNA circulares livres no citoplasma, que são denominados de plasmídeos.

2.7 PLASMÍDEOS - VETORES DE CLONAGEM

Utilizando a tecnologia do DNA recombinante, é possível clonar e transferir genes entre organismos da mesma ou de diferentes espécies. Normalmente, fragmentos de DNA não contêm uma origem de replicação, podendo ser transferidos para gerações sucessivas somente integrando-se ao cromossomo da célula bacteriana receptora (DE ROBERTIS; DE ROBERTIS, 1986). Para que um gene seja transferido a outra célula, usualmente deverá estar ligado a um vetor de clonagem.

Podem-se citar três tipos de vetores de clonagem: plasmídeo, bacteriófago e cosmídeo, sendo o primeiro mais usado na tecnologia do DNA recombinante. A Figura 2 ilustra um processo de clonagem, que se resume na clivagem de segmento de DNA de interesse ou gene, realizado com auxílio da enzima endonuclease de restrição, uma espécie de tesoura molecular, capaz de cortar a fita de DNA num determinado sítio de clivagem (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

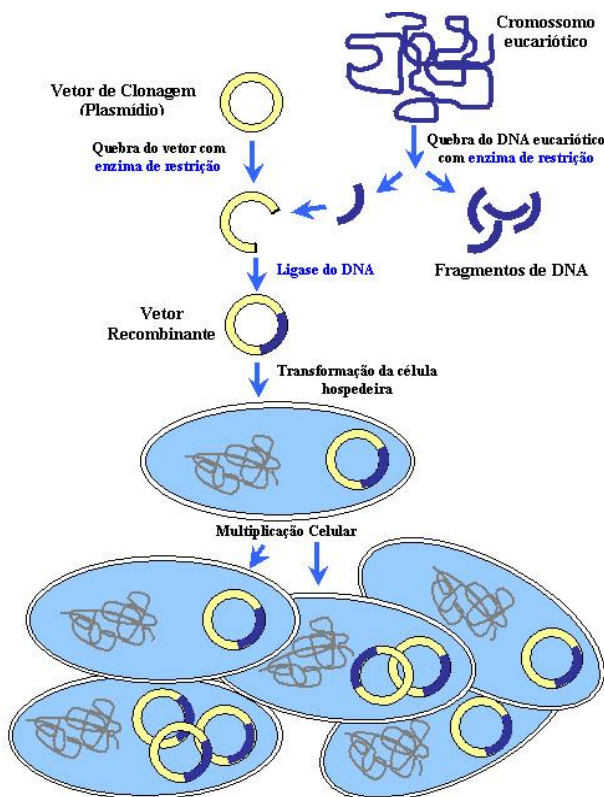


Figura 2 - Esquema ilustrativo dos passos envolvidos na clonagem de DNA plasmidial (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

Plasmídeos são moléculas de DNA de dupla fita, contendo os elementos de replicação e pelo menos um gene com capacidade de conferir resistência a antimicrobianos. Com tamanhos entre 5 a 400 kb (kilobases), encontram-se normalmente mais de duas cópias por célula (NASCIMENTO *et al.*, 2003). Nos plasmídeos que transportam genes de resistência a agentes antibacterianos, pode-se encontrar o gene para a enzima β -lactamase que confere resistência aos antibióticos β -lactâmicos, como a penicilina e a amoxicilina (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995; PELCZAR Jr.; CHAN; KRIEG, 1996).

Segundo Nascimento *et al.* (2003), algumas características são desejáveis em um plasmídeo para ser considerado bom vetor de clonagem, dentre elas:

- possuir sequência de DNA que permita ao vetor ser replicado na célula hospedeira;
- apresentar dois ou mais sítios únicos de clivagem para endonucleases de restrição; e
- possuir algum gene capaz de codificar características na célula transformada que a torne distinta da célula não transformada, como por exemplo, resistência a ampicilina (Amp^r).

Os genes podem ser transferidos de uma bactéria para outra através de três mecanismos: conjugação, transdução e transformação. Descrita em 1928, a transformação permitiu a identificação do DNA como material genético. Porém, para que a transformação bacteriana tenha êxito, são necessárias células aptas a receber os plasmídeos, denominadas células competentes, sendo esta capacidade denominada, simplesmente, competência (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

2.8 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

Segundo Nascimento *et al.* (2003), a transformação bacteriana de ocorrência natural é um evento raro. A eficiência da transformação bacteriana de ocorrência natural é afetada pela repulsão eletrostática existente entre as cargas negativas da camada de fosfolipídios e o grupo fosfato da molécula de DNA. Mandel e Higa (1970) concluíram que a *E. coli*, quando suspensa em cloreto de cálcio gelado seguido de curto choque térmico, se apresentava competente para ser utilizada em transformação bacteriana utilizando DNA exógeno.

Segundo Nascimento *et al.* (2003), Mandel e Higa (1970) também verificaram que a *E. coli* crescida até a fase de crescimento exponencial se apresentava mais competente que em outros estágios de crescimento. Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989) e Sambrook e Russell (1989) publicaram em seus livros “*Molecular cloning: A laboratory manual*”, o protocolo clássico de transformação bacteriana utilizando ressuspensão em $CaCl_2$ a baixas temperaturas. Esse protocolo somente foi alterado por Sharma, Singh e Gill (2007), pela adição de etanol.

A preparação de células competentes atualmente utilizada, descrita por Mandel e Higa (1970), produz eficiência de transformação de 10^5 a 10^7 transformantes $\cdot \mu g_{DNA}^{-1}$. Devido à influência do tamanho e da conformação da molécula do DNA, os plasmídeos pequenos apresentam vantagens na absorção pela célula competente (NASCIMENTO *et al.* 2003).

Acredita-se que na captação da molécula do DNA pela bactéria competente, o DNA plasmidial permeia por canais situados nas

chamadas zonas de adesão, locais onde as membranas interna e externa da célula se unem, formando estruturas semelhantes a poros. Normalmente, estes poros estão presentes na bactéria durante a fase de crescimento exponencial. A Figura 3, extraída de Nascimento *et al.* (2003), ilustra este processo.

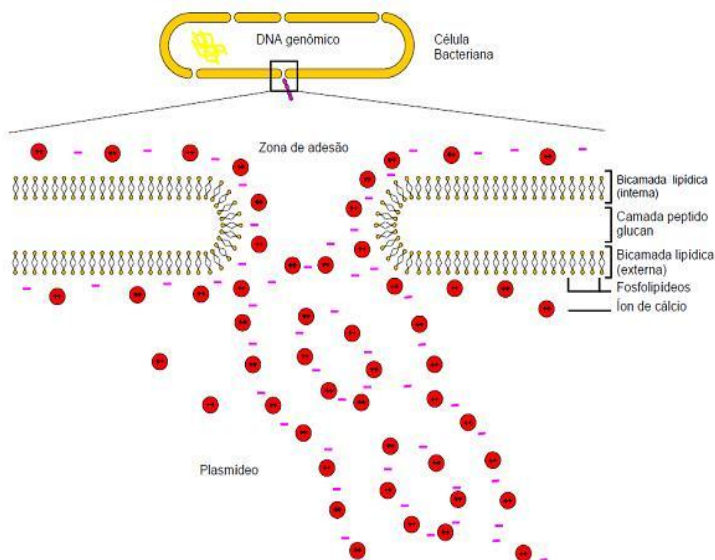


Figura 3 - Mecanismo molecular proposto para explicar a transformação de *E. coli* utilizando molécula de DNA exógeno (NASCIMENTO *et al.* 2003).

2.9 O OPERON *LAC* (*LACZ* E IPTG)

A *E. coli*, assim como outras bactérias, na disponibilidade de diversas fontes de açúcares é capaz de “optar” por qual utilizar em seu crescimento. Mesmo com sua preferência pela glicose, quando os níveis de lactose no meio externo encontram-se altos e os níveis de glicose baixos, é ativado um conjunto de genes metabólicos que permite a utilização da lactose como fonte de carbono. Este controle se dá a partir de um mecanismo biológico chamado de operon *Lac*. Os genes que estão sob controle de uma mesma sequência regulatória constituem um operon, sendo o operon *Lac* o mais conhecido (MULLER-HILL, 1996; PETERSON, 2009).

O operon *Lac* controla a expressão de três genes diferentes, associados ao metabolismo da lactose. Os genes codificadores das enzimas β -galactosidase, permease e transacetilase são expressos sob a mesma regulação. A β -galactosidase é a enzima responsável pela hidrólise de lactose em galactose e glicose. A permease é a enzima que permite o transporte da lactose para o interior da célula. Finalmente, a transacetilase estaria envolvida na desintoxicação de metabólitos secundários da atividade da β -galactosidase. Estas enzimas são expressas (produzidas) quando a lactose está presente no meio de cultivo e é utilizada para crescimento da *E. coli*. Isto significa que a célula tem uma capacidade de definir quais enzimas serão produzidas para realizar o metabolismo do açúcar disponível (PETTERSON, 2009; LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

Na ausência de lactose, uma proteína repressora (*LacI*) liga-se a um sítio de regulação do operon, chamado sítio operador, impedindo a expressão de todas as enzimas do operon. Uma vez que os vetores de expressão são normalmente projetados no sentido de produzir proteína em abundância, o DNA codificante para uma dada proteína deve ser colocado sob o comando de um promotor forte, como por exemplo, o *lacZ*. Desta forma, para manutenção dos níveis basais de expressão do gene insignificantes até a indução, adiciona-se IPTG (*isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside*) (PETTERSON, 2009).

O IPTG é um derivado de açúcar amplamente utilizado na indução de proteínas de expressão em *E. coli* recombinante. A maioria dos vetores projetados para proteína de expressão da *E. coli* recombinante tem o gene de interesse sob o controle do promotor *Lac*. Esse promotor está sob o controle do repressor *Lac* e é ativado apenas na presença de lactose ou seu análogo IPTG. A lactose ou o IPTG ligam-se ao repressor liberando a transcrição, mas ao contrário da lactose, o IPTG não é metabolizado. Além disso, a cinética da indução por IPTG ocorre em uma taxa muito mais elevada do que por lactose (SIGMA-ALDRICH, 2012).

Através de técnicas de engenharia genética, como a transformação bacteriana, a *E. coli* pode captar moléculas de DNA circular (plasmídeo) com informações genéticas capazes de expressar resistência a antibióticos e produção de compostos biotecnologicamente úteis como, por exemplo, os polímeros biodegradáveis (PHAs), característica do plasmídeo pRLC2. O plasmídeo pRLC2, desenvolvido por Bressan (2007) e utilizado neste estudo, contém os genes *phaC* de *Chromobacterium violaceum* (*C. violaceum*) a montante dos genes

phbA e *phbB* de *Cupriavidus necator* (*C. necator*), todos sob regulação do promotor *Lac* do plasmídeo.

Steinbüchel *et al.* (1993) citam a *C. violaceum* como um dos poucos micro-organismos, até agora estudados, capazes de realizar a biossíntese do homopolímero de hidroxivalerato (PHV), quando cultivado na presença de valerato como única fonte de carbono e concentrações limitantes de nitrogênio. Esta capacidade é definida pela enzima PHA sintase, presente no plasmídeo pRLC2 (BRESSAN, 2007).

2.10 PRODUÇÃO DE PHAs

Os PHAs (poli-hidroxialcanoatos) são biopolímeros e constituem um grupo de poliésteres acumulados por bactérias como material de reserva de carbono e energia (STEINBÜCHEL, 1991; GOMEZ *et al.*, 1993). Apresentam propriedades termoplásticas e são integralmente biodegradáveis (SILVA *et al.*, 2007).

A primeira determinação de PHA foi através do *Bacillus megaterium* (*B. megaterium*), no Instituto Pasteur, em 1923. As pesquisas no Brasil iniciaram em 1991 no IPT (Instituto de Pesquisas Tecnológicas), em São Paulo, e em 2000 iniciou a produção de poli-hidroxibutirato (P-3HB), através da indústria brasileira PHB Industrial S.A. Esta empresa produz o polímero P(3HB) (poli-hidroxibutirato) e o copolímero P(3HB-*co*-3HV) (poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato)), dois polímeros da família dos PHAs, utilizando sacarose como fonte principal de carbono (JUNIOR, 2006).

Os PHAs são considerados atraentes para a substituição de alguns derivados de petróleo, com destaque ao P(3HB), que possui densidade entre 1,18 e 1,25 g·cm⁻³, 70% de cristalinidade, 5% de resistência a ruptura, apresentando uma degradação total em até 6 semanas em meio anaeróbico, 60 semanas em meio aeróbio e 75 semanas em contato com o solo, produzindo CO₂ e H₂O (LUZIER, 1992). Outros autores, como Schneider (2006), acompanharam a biodegradação de P(3HB) produzido por *C. necator*. A autora em seus estudos, obteve 100% de degradação em até 34 dias em solo preparado com baixo teor de argila, esterco de cavalo e areia de praia.

Como os PHAs têm elevado custo de produção, busca-se a redução destes custos utilizando-se em sua produção substratos de baixo valor comercial (SQUIO; ARAGÃO, 2004).

O soro de queijo, com uma composição média em lactose em torno de 48 g·L⁻¹ (ATRA *et al.*, 2005), é considerado um substrato de baixo valor comercial e uma rica fonte de carbono para a produção

destes biopolímeros. Park, Park e Lee (2002) citam, para a produção de PHAs, a utilização de soro de queijo livre de proteínas e partículas em suspensão, pH corrigido para 6,9, teor de lactose ajustado para $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, suplementado com $4,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, e concentrações de O_2 superiores a 30%.

As pesquisas realizadas atualmente visam obter expressiva produção de massa celular seca (MCS) e máximo acúmulo intracelular de PHAs (FINKLER, 2006).

2.10.1 Micro-organismos produtores de PHAs

Grande variedade de micro-organismos é capaz de produzir e acumular PHAs intracelular, sendo produzidos tanto por bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas, presentes no solo, água e efluentes. Entretanto, a produção de PHAs só se torna economicamente viável quando ocorre em quantidades suficientes para caracterização e aplicação tecnológica (ANDERSON; DAWES, 1990; GURIEFF; LANT, 2007).

Os micro-organismos produtores de PHAs são divididos em dois grupos, baseados nas condições de cultivo: os dependentes e os não dependentes de limitação de nutrientes, tais como o nitrogênio, para a indução da produção do biopolímero. Em ambos os grupos, o excesso da fonte de carbono é necessário. A grande maioria dos micro-organismos estudados pertence ao grupo dependente de limitação de nutriente (nitrogênio, fósforo, oxigênio e/ou enxofre) para acúmulo de PHAs, sendo exemplos: *Cupriavidus necator*, *Pseudomonas oleovorans* e *Chromobacterium violaceum*. Dentre os micro-organismos não dependentes de limitação nutricional, citam-se: *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii* e *E. coli* recombinante, que acumulam polímeros durante a fase de crescimento (LEE, 1996).

São encontrados na literatura diversos estudos utilizando linhagens de *E. coli* ancorando os genes responsáveis pela biossíntese de PHAs dos isolados nativos de *C. necator* e de outras bactérias, como a *C. violaceum*, ou seja, *E. coli* recombinantes. Uma das vantagens da utilização destas bactérias é que a *E. coli* tem genoma e fisiologia bem caracterizados, o que facilita a manipulação genética e desenvolvimento de estratégias de engenharia metabólica. Estas bactérias recombinantes são capazes de acumular elevados conteúdos de biopolímeros, chegando até 80% da biomassa seca (MCS), sem necessidade de limitação nutricional durante o crescimento (LEE, 1996), permitindo a utilização de rejeitos industriais como meio de cultivo, tal como o soro de queijo.

A expressão de genes inseridos em *E. coli* por vezes necessita de indução, que é realizada por compostos de custo elevado, como o isopropilgalactosídeo (IPTG), e que devem ser adicionados ao meio de cultura. O IPTG, um análogo da lactose, é um indutor de expressão gênica de genes que estejam sob a regulação do sítio operador do operon *Lac*. Este indutor apresenta custo elevado (cerca de US\$ 551,00·10g⁻¹) (SIGMA-ALDRICH, 2012), além de problemas de hipersensibilidade transcricional do micro-organismo dependente de sua concentração e da heterogeneidade transcricional em nível celular (KANG; WANG; ZHANG, 2008).

Segundo Harvey, Champe e Fischer (2008), a lactose presente no meio de cultura se associa ao repressor, inibindo-o, deixando o promotor de expressão livre para a transcrição do gene, atuando desta forma como indutor de expressão gênica.

Com base nos dados apresentados anteriormente, é possível a produção de PHAs por *E. coli* recombinante, ancorando plasmídeo contendo os genes necessários à biossíntese de biopolímeros. Quando a expressão dos genes constitutivos da bactéria está sob a regulação do operon *Lac*, pode-se utilizar o soro de queijo como substrato ou como suplemento ao meio de crescimento. Contudo, estudos são necessários para otimizar as condições de produção e obter PHAs com composição monomérica compatível com as necessidades do mercado a custo aceitável.

3 METODOLOGIA

Neste capítulo são apresentadas as atividades experimentais deste estudo: utilização de processos de separação com membranas no tratamento do soro de queijo, transformação e cultivo de *E. coli* recombinante, e a produção e quantificação de PHAs. Um resumo das atividades experimentais é ilustrado na Figura 4.

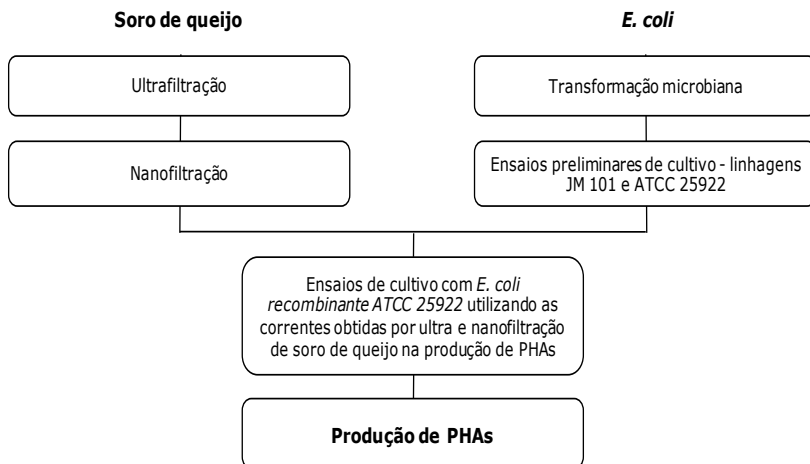


Figura 4 - Fluxograma das atividades experimentais realizadas neste estudo.

3.1 UTILIZAÇÃO DE PROCESSOS DE SEPARAÇÃO COM MEMBRANAS NO TRATAMENTO DO SORO DE QUEIJO

A ultrafiltração foi utilizada para a desproteïnização do soro, utilizando-se membranas com ponto de corte da ordem de $50.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, enquanto a nanofiltração foi empregada para concentração parcial da lactose através de membranas com massa molar de corte de 150 a $300 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. O processo de separação empregado neste estudo é descrito na sequência.

3.1.1 Ultrafiltração e nanofiltração

Nos experimentos, coletaram-se dados de fluxo permeado e vazão de água pura, utilizando-se membranas limpas. Na avaliação da colmatação das membranas e possíveis alterações de composição nas correntes de alimentação, permeadas e concentradas, coletaram-se dados de fluxo permeado utilizando-se soro de queijo.

3.1.1.1 Soro de queijo

O soro de queijo foi fornecido pelo Instituto Federal Catarinense (IFC), Campus Camboriú, SC, resultante da dessoragem do queijo tipo minas frescal, elaborado enzimaticamente com leite previamente pasteurizado a 75 °C/15 min. Após a dessoragem, o soro era novamente pasteurizado a 75 °C/15 min em pasteurizador de placas marca Sotronic (300 L·h⁻¹), resfriado a 5 °C em 10 segundos, embalado em sacos de polietileno de baixa densidade (PEBD) (65 μm de espessura) com capacidade de 1 litro, e armazenado em câmara fria à temperatura de -18 °C.

3.1.1.2 Unidade piloto de filtração

Para realização dos experimentos de ultra e nanofiltração utilizou-se uma mesma unidade piloto, intercambiando-se apenas as membranas e as condições operacionais durante o processo. Os principais componentes da unidade piloto são mostrados na Figura 5. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Processos de Separação com Membranas (LABSEM), do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos (EQA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC.

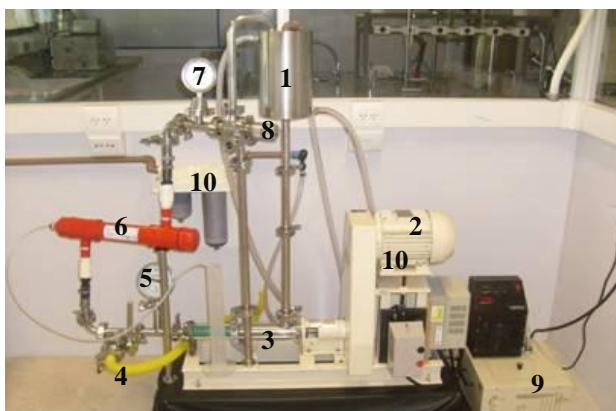


Figura 5 - Fotografia da unidade piloto de filtração utilizada no estudo - 1) tanque de alimentação encamisado; 2) motor; 3) bomba de pressão positiva; 4) dreno; 5) termômetro; 6) módulo de membranas (UF ou NF); 7) manômetro; 8) válvula de contra-pressão; 9) banho-maria para circulação de água; 10) filtro para água de limpeza.

A unidade piloto é equipada com tanque de alimentação encamisado com capacidade para 6 litros, dotada de bomba de pressão positiva acionada por motor de 1 cv e acoplada a um inversor de frequência que permite regular a sua velocidade de rotação e, conseqüentemente, a vazão de alimentação.

Traçou-se uma curva de calibração para determinar a relação entre a frequência e vazão de alimentação da solução utilizada (dados apresentados no Anexo 1). A vazão de alimentação foi determinada com água pura e com soro de queijo para ambas as membranas (ultra e nanofiltração). Para determinação da vazão de alimentação, utilizou-se a Equação 1.

$$\phi = \frac{V_f - V_i}{\theta} \quad (1)$$

Onde: ϕ é a vazão de alimentação em $\text{m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$, V_f é o volume final do recipiente (m^3), V_i é o volume inicial do recipiente (m^3) e θ é o tempo gasto para encher o recipiente (h).

3.1.1.3 Módulos de filtração

Utilizaram-se módulos de ultrafiltração na configuração fibrosa e módulos de nanofiltração na configuração espiral.

O módulo de ultrafiltração foi fabricado e fornecido pela Empresa Pam Membranas Seletivas, Rio de Janeiro/RJ, Brasil. Segundo o fabricante, essas membranas possuem camada seletiva externa com retenção de até 99,99% de micro-organismos e sólidos suspensos. As membranas apresentam massa molar de corte de $50.000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ e área nominal de permeação de 1 m^2 . Toleram pressões máximas de operação de $4 \text{ kgf} \cdot \text{cm}^{-2}$, temperatura máxima de $55 \text{ }^\circ\text{C}$, pH entre 4 e 10 e permeabilidade com água entre 84 e $111 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$. O módulo possui 977 fibras, preparadas a partir de poli(éter-sulfona) com diâmetro interno das fibras entre 0,5 e 0,7 mm, diâmetro individual externo entre 0,9 a 1,0 mm, e diâmetro hidráulico total de 49 mm.

O módulo de nanofiltração foi fabricado e fornecido pela GE Osmonics, USA. Possui configuração espiral preparada a partir de poliamida, com massa molar de corte de 150 a $300 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ e área nominal de permeação de $0,9 \text{ m}^2$.

3.1.1.4 Avaliação da temperatura, pressão e vazão de alimentação na ultra e nanofiltração do soro de queijo

Avaliou-se a influência da temperatura, pressão e vazão de alimentação na manutenção do fluxo permeado e na composição das correntes permeadas e concentradas do soro submetido a ultra e nanofiltração. Para isso, utilizou-se o delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 , acrescido de pontos axiais, como sugerido por Myers e Montgomery (1995) e Rodrigues e Iemma (2005).

O DCCR 2^3 é composto por uma matriz com 17 ensaios experimentais (Tabela 5 e Tabela 11, ultra e nanofiltração, respectivamente) em dois níveis principais, um nível central e dois axiais. Os níveis das variáveis independentes do DCCR 2^3 utilizado nos experimentos de ultrafiltração encontram-se na Tabela 1, e os níveis das variáveis independentes dos experimentos de nanofiltração, na Tabela 2. Para ambos os experimentos, obteve-se como resposta o fluxo permeado estabilizado final, a composição centesimal das correntes concentrada e permeada, e o coeficiente de retenção dos compostos presentes. Também se avaliou o percentual médio de redução da demanda química de oxigênio (DQO) na corrente permeada.

Tabela 1 - Níveis das variáveis estudadas no DCCR 2^3 utilizado nos experimentos de ultrafiltração do soro de queijo.

Codificação	Temperatura (°C)	Pressão (kgf·cm ⁻²)	Vazão de alimentação (m ³ ·h ⁻¹)
-1	25	1,0	0,398
+1	45	3,0	0,580
0*	35	2,0	0,489
-1,68	18	0,3	0,336
+1,68	52	3,7	0,643

*Ponto central/valor central.

Os níveis das variáveis avaliadas no estudo de ultrafiltração, como vazão de alimentação, temperatura e pressão, foram fixados com base nos estudos realizados por Serpa (2005), considerando as limitações técnicas do equipamento e do módulo de membranas.

Os valores de temperatura e pressão utilizados nos experimentos de nanofiltração foram sugeridos por Atra *et al.* (2005) para atividades experimentais desta natureza, e a vazão de alimentação foi limitada pelas restrições técnicas do equipamento.

Tabela 2 - Níveis das variáveis estudadas no DCCR 2³ utilizado nos experimentos de nanofiltração do soro de queijo.

Codificação	Temperatura (°C)	Pressão (kgf·cm ⁻²)	Vazão de alimentação (m ³ ·h ⁻¹)
-1	25	3	0,398
+1	45	7	0,580
0*	35	5	0,489
-1,68	18	1,6	0,336
+1,68	52	8,4	0,643

*Ponto central/valor central.

A sequência utilizada para realização dos ensaios experimentais foi por distribuição inteiramente casualizada, eliminando a influência de fatores ambientais nos resultados do experimento.

3.1.1.5 Procedimento experimental

Inicialmente, procedeu-se a permeação com água pura para avaliação da linearidade do aumento de fluxo em relação à pressão. Para a ultrafiltração, foram identificados os fluxos nas pressões de 0, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0 kgf·cm⁻². Para a nanofiltração, as pressões utilizadas foram 1, 3,0, 5,0 e 7,0 kgf·cm⁻². Todas as leituras de fluxos permeados foram realizadas em triplicata.

Também foi verificada a permeação com água pura à temperatura de 35 °C e vazão de alimentação de 0,489 m³·h⁻¹ (velocidade de 0,676 m·s⁻¹ para membrana de ultrafiltração), nas pressões de 1, 2 e 3 kgf·cm⁻², durante 60 min. Para a nanofiltração, utilizou-se a mesma temperatura e vazão de alimentação, mas em pressões de 1, 3, 5 e 7 kgf·cm⁻², também durante 60 min.

Leituras de fluxo permeado foram realizadas em intervalos de 5 min para determinação da permeabilidade da membrana com água, verificação da eficiência do sistema de limpeza *CIP* e, conseqüentemente, a determinação do retorno de fluxo após cada ensaio. Para o cálculo do fluxo permeado (J), utilizou-se a Equação 2 citada por Bezerra e Matsumoto (2011).

$$J = \frac{Q_p}{A_{sup}} \quad (2)$$

Onde: J é o fluxo permeado (L·m⁻²·h⁻¹), Q_p é a vazão de permeação (L·h⁻¹), e A_{sup} é a área da membrana (m²).

Nos experimentos de ultra e nanofiltração do soro de queijo foram utilizados os delineamentos experimentais descritos anteriormente. Lotes de 7 litros do soro eram previamente descongelados e pré-filtrados em dessorador de queijo com tecido sintético. O volume de cada ensaio experimental foi estabelecido pela capacidade do tanque de alimentação da unidade piloto de filtração que é de 6 litros, com reposição apenas dos volumes coletados para determinações analíticas (amostras).

Em ambos os processos de separação - ultra e nanofiltração - realizaram-se leituras de fluxos permeados em intervalos de 5 min. Nos primeiros 60 min de cada ensaio, o permeado era totalmente recirculado. Este procedimento permitia analisar a colmatação da membrana, sem influência da variação da concentração de solutos do soro de queijo na corrente de alimentação. Após, iniciava-se a coleta de permeado sem reciclo, até $FC = 3$, ou seja, para um volume inicial de 6 litros, recolhia-se 4 litros de permeado, restando somente 2 litros na tubulação do sistema, o que limitou a concentração até um $FC = 3$. O FC foi calculado com a Equação 3.

$$FC = \frac{V_o}{V_r} = \frac{V_o}{V_o - V_p} \quad (3)$$

Onde: V_o é o volume inicial, V_r o volume final e V_p o volume de permeado.

Coletaram-se amostras das correntes de alimentação, permeadas e concentradas. As amostras foram coletadas no tempo zero, após 60 min de filtração com reciclo total e após atingir o $FC = 3$. As amostras foram acondicionadas à temperatura de $-4 \text{ }^\circ\text{C}$ (± 2) e enviadas ao Laboratório Estadual da Qualidade do Leite, pertencente à UnC/CIDASC, localizado em Concórdia, SC, para as determinações analíticas.

Avaliou-se a relação proteína/lactose da corrente de alimentação, concentrada e permeada ($R_{Pt/Lac}$), utilizando-se a Equação 4 e o coeficiente de rejeição (CR) da membrana pela Equação 5, conforme utilizado por Farro e Viotto (2003).

$$R_{\frac{Pt}{Lac}} = \frac{\% Pt}{\% Lac} \quad (4)$$

Onde: $R_{Pt/Lac}$ é a razão de relação proteína/lactose, $\% Pt$ é a percentagem de proteína (p/v) e $\% Lac$ é a percentagem de lactose (p/v).

$$CR = 1 - \left(\frac{C_p}{C_a} \right) \quad (5)$$

Onde: CR é o coeficiente de rejeição, C_p é a concentração do permeado e C_a é a concentração de alimentação.

Na Figura 6, são apresentadas as atividades realizadas envolvendo os processos de separação com membranas.

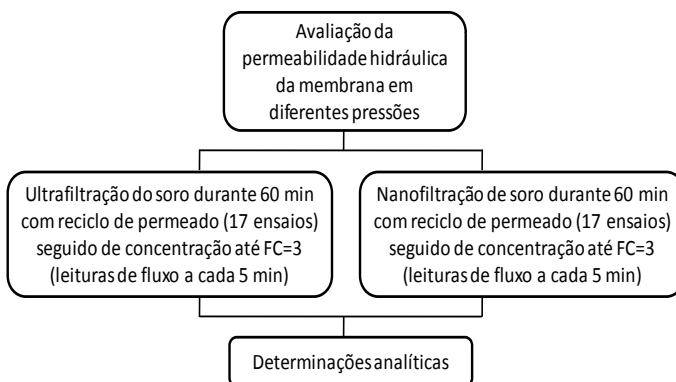


Figura 6 - Fluxograma dos experimentos de ultra e nanofiltração.

3.1.1.6 Limpeza CIP

Após cada ensaio experimental, realizou-se, primeiramente, enxágue com água pura a 45 °C, pressão de 1 kgf·cm⁻² e vazão de alimentação de 0,489 m³·h⁻¹, para remoção de sujidades da membrana. O coeficiente de remoção de sólidos (R) utilizando-se enxágue com água pura foi calculado com a Equação 6, também utilizada por Ballanec *et al.* (2002).

$$R = \left(1 - \frac{C_p}{C_a} \right) * 100 \quad (6)$$

Onde: R é o coeficiente de remoção de sólidos (%), C_a a concentração na corrente de alimentação ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e C_p a concentração da corrente permeada ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

Para recuperação do fluxo permeado da membrana, reduzido em razão da polarização por concentração e *fouling*, utilizou-se o protocolo sugerido por Kazemimoghdam e Mohammadi (2007), com modificação na redução da concentração da solução ácida para $0,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. O módulo de membranas foi limpo com água destilada, soluções alcalina (NaOH 0,5% (m/v)) e ácida (ácido nítrico $0,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Diversas condições foram testadas até a obtenção de um protocolo aceitável, que permitisse o retorno de fluxo permeado, monitorando-se a remoção da resistência (RR) e a recuperação de fluxo (FR) com a Equação 7 e Equação 8, respectivamente.

$$RR(\%) = \left[(R_f - R_c) / R_f \right] * 100 \quad (7)$$

Onde: RR é a remoção da resistência, R_f a resistência após o *fouling* e R_c a resistência após a limpeza.

$$FR(\%) = \left[(J_{wc} - J_{ww}) / (J_{wi} - J_{ww}) \right] * 100 \quad (8)$$

Onde: FR é a recuperação de fluxo (em percentual), J_{wi} o fluxo de água destilada inicial, com a membrana limpa, J_{ww} o fluxo de água destilada com a membrana suja e J_{wc} o fluxo de água destilada após o procedimento de limpeza.

3.1.2 Caracterização do soro de queijo, correntes de alimentação, concentrada e permeada

Amostras do soro das correntes de alimentação, concentrada e permeada, obtidas por ultra e nanofiltração, foram acondicionadas em frascos com capacidade de 20 mL, congeladas a $-4 \text{ }^\circ\text{C}$ e enviadas para determinações analíticas no Laboratório Estadual da Qualidade do Leite, UnC, Concórdia/SC. Utilizou-se bronopol a 4% (*2-bromo-2-nitropropano-1, 3-diol*) para conservação das amostras. As

determinações dos teores de proteínas, minerais e lactose foram realizadas por infravermelho (*Medium Infra-Red*) empregando-se o equipamento Bentley 2000® (BENTLEY INSTRUMENTS, 1994). Determinou-se também os teores de CCS (contagem de células somáticas) e a contagem bacteriana total (CBT) expressa em UFC·mL⁻¹ (unidades formadoras de colônias), com equipamento eletrônico *Somacount 300*^R, que opera por citometria fluxométrica.

O pH foi monitorado com potenciômetro digital, realizando-se leituras diretamente na amostra, em temperatura ambiente (com correção interna de temperatura) (IAL, 1985; AOAC, 1997).

O teor de sólidos solúveis foi determinado por leitura direta em refratômetro portátil de Brix, modelo Rt 95(0-32 °B), com precisão de 0,2 °B.

A densidade das amostras do soro de queijo das correntes de alimentação, permeada e concentrada, foi determinada por termolactodensímetro em proveta de 500 mL.

A DQO foi determinada por microdigestão com leitura em espectrofotômetro a 600 nm (ZUCCARI; GRANER; LEOPOLDO, 2005).

3.2 CULTIVO DE *E. coli* E PRODUÇÃO DE PHAs

Como atividades preliminares ao aproveitamento do permeado do soro de queijo, previamente ultra e/ou nanofiltrado, na produção de PHAs, obteve-se isolados de *E. coli* recombinante por técnicas de transformação, sendo na sequência submetidos a incubação por período de 24 horas.

As atividades experimentais foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Micro-organismos (LBBMM), do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina (BQA/UFSC), localizado em Florianópolis, SC.

3.2.1 Micro-organismo, plasmídeo e armazenamento

3.2.1.1 Micro-organismo

Utilizou-se a bactéria *E. coli* linhagens JM 101 e ATCC 25922.

A linhagem JM 101 possui uma característica relevante a expressão aumentada do repressor *LacI*, proteína reguladora que inibe a expressão dos genes sob regulação do operon *Lac* na ausência de lactose

ou seu análogo IPTG. Isolados nativos da linhagem JM 101 compunham o portfólio microbiano do laboratório (LBBMM/UFSC).

A linhagem ATCC 25922 possui como característica relevante a capacidade de utilizar lactose como fonte de carbono sem necessidade de hidrólise prévia. Bactérias com essa característica possuem operon *Lac* contendo genes codificadores das enzimas β -galactosidase, lactose permease e β -galactosidase transacetilase. A linhagem ATCC 25922 foi obtida da empresa Newprov, código 1229, lote 01101001R.

3.2.1.2 Plasmídeo

O plasmídeo pRLC2 foi contruído por Bressan (2007), por técnicas de engenharia genética, utilizando-se a sequência demonstrada na Figura 7.

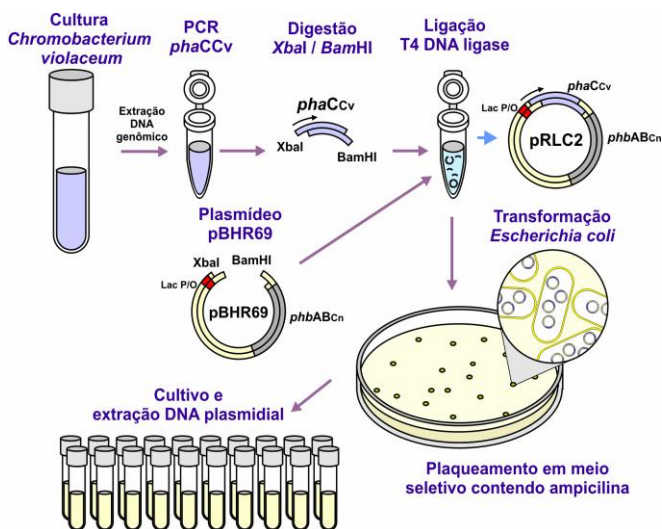


Figura 7 - Fluxograma de obtenção do plasmídeo pRLC2 (BRESSAN, 2007).

O plasmídeo pRLC2 possui como característica relevante o fato de ser derivado do plasmídeo comercial *pBluescript SK+* que ancora o gene de resistência a ampicilina (*Amp^r*) e carrega os genes *phaA* e *phaB* de *C. necator* e *phaC* de *C. violaceum* colinear ao promotor *Lac*, pelo qual sua expressão é controlada. Estes genes são codificantes das enzimas β -cetotilase, acetoacetyl-CoA redutase e PHB sintase, respectivamente.

O pRLC2 foi escolhido em razão de possuir capacidade de incorporar PHAs e não ter sido utilizado, até o momento, em estudos com bactérias *E. coli* linhagens JM 101 e ATCC 25922.

3.2.1.3 Armazenagem

Alíquotas estoque da bactéria *E. coli* (JM 101 e ATCC 25922) nativa e recombinante (pRLC2) foram congeladas em temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em solução de criopreservação (80% de meio de cultivo + 20% de glicerina), como sugerido por Andrade (2009).

Alíquotas de bactérias ancorando o plasmídeo pRLC2 também foram estocadas em placas de Petri com meio sólido Luria Bertani (LB) acrescido de solução de ampicilina ($100\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) à temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Quando necessário, colônias eram repicadas em meio LB líquido e/ou meio mineral M9 com lactose monohidratada ($10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e ampicilina ($100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

A suspensão estoque do plasmídeo pRLC2 foi armazenada em temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. A solução estoque foi obtida através de extração de DNA plasmidial utilizando-se o kit “UltraClean® 6 Minute Mini Plasmid Prep Kit” do fabricante Gibco BRL, cujo protocolo de extração encontra-se no Anexo 2.

3.2.2 Meios de cultivo

Utilizou-se meio LB (Luria Bertani) nas atividades de transformação microbiana, estocagem, preparação de inóculos e cultivos. Em alguns experimentos foram utilizados os meios minerais MM e M9, cujas composições são descritas a seguir.

O meio LB (sólido e líquido) continha: $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de triptona, $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de extrato de levedura, $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl, com adição de $15\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ágar para meio sólido (BERTANI, 1951).

O meio mineral MM continha: $6,67\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de KH_2PO_4 , $4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $0,8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0,8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido cítrico e $0,5\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ de solução de oligoelementos composto por: $0,30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de H_3BO_3 , $0,20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $0,10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0,03\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $0,03\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $0,02\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de $\text{NiCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e $0,01\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

O meio mineral M9 era composto por: $16\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Na_2HPO_4 , $3,75\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de KH_2PO_4 , $0,63\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl, $1,25\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NH_4Cl , 2 mL de $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 M) e 100 μL de CaCl_2 (1 M).

3.2.3 Soluções

3.2.3.1 Solução de ampicilina

A solução estoque de ampicilina foi preparada na concentração de $100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. A ampicilina foi dissolvida em água ultra pura esterilizada, filtrada em sistema Milipore com membrana de $0,22 \mu\text{m}$ sob condições assépticas e estocadas em microtubos esterilizados à temperatura de $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.2.3.2 Solução de IPTG

A solução de IPTG foi preparada na concentração de $0,5 \text{ mM}$ sob condições assépticas e estocadas em microtubos esterilizados à temperatura de $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. A solução foi utilizada para indução da expressão dos genes clonados sob regulação do promotor *Lac* no plasmídeo pRLC2.

3.2.3.3 Solução de cloreto de cálcio (CaCl_2)

Uma solução de CaCl_2 $0,1 \text{ M}$, foi utilizada para a preparação das células competentes e transformação. Pesaram-se $1,11 \text{ g}$ de CaCl_2 , após dissolvido em 100 mL de água destilada filtrada e esterilizada foi estocada sob resfriamento a $\pm 8 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.2.3.4 Solução de ácido propiônico

Para obtenção de 200 mL de solução de ácido propiônico 1 M , adicionou-se $14,96 \text{ mL}$ de ácido propiônico em 50 mL de água destilada, e o pH foi ajustado para 7 com NaOH 1 M .

3.2.3.5 Solução de glicose e lactose

Soluções estoque de glicose e lactose na concentração de $200 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, após preparadas, foram esterilizadas em autoclave ($121 \text{ }^\circ\text{C}/15 \text{ min}$) e armazenadas sob refrigeração ($\pm 8 \text{ }^\circ\text{C}$).

Soluções estoque de glicose e lactose na concentração de $200 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, após preparadas, foram esterilizadas em autoclave ($121 \text{ }^\circ\text{C}/15 \text{ min}$) e armazenadas sob refrigeração ($\pm 8 \text{ }^\circ\text{C}$).

3.2.4 Obtenção de *E. coli* recombinante

A Figura 8 mostra a sequência das etapas de preparo e obtenção dos isolados recombinantes (*E. coli*) de acordo com metodologias descritas por Hanahan (1983) e Sambrook e Russell (1989).

As linhagens nativas JM 101 e ATCC 25922 foram submetidas à preparação de células competentes, transformação e seleção, obtendo-se células recombinantes com resistência a ampicilina contendo genes codificantes das enzimas responsáveis pela biossíntese de PHAs presentes no plasmídeo pRLC2.

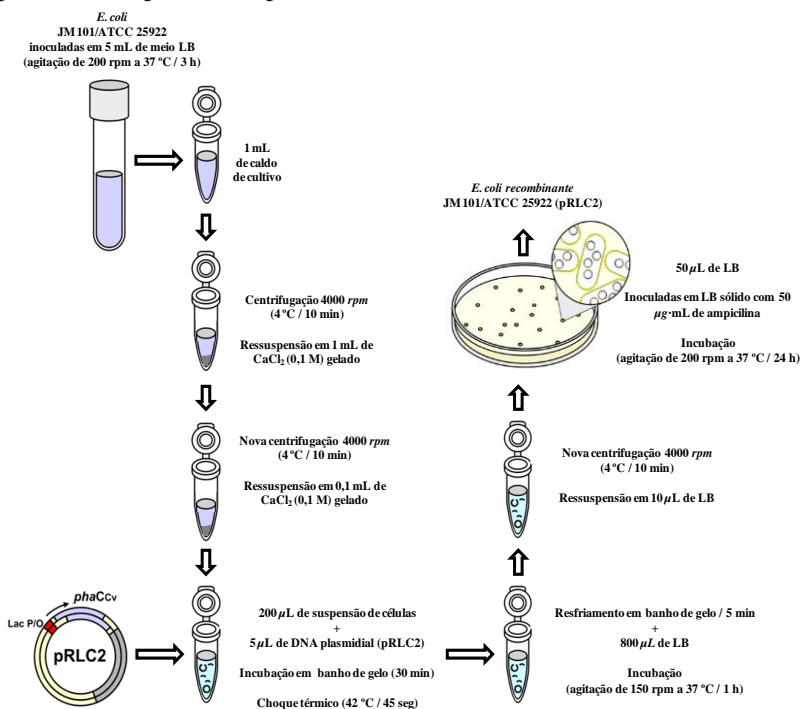


Figura 8 - Sequência das transformações microbianas realizadas para obtenção das células recombinantes de *E. coli* JM 101 e ATCC 25922 com plasmídeo pRLC2.

3.2.4.1 Preparação de células competentes

Células competentes são aquelas com capacidade de captar um plasmídeo. O procedimento empregado na preparação de células competentes baseia-se no método descrito por Hanahan (1983). Uma

alçada de suspensão estoque de *E. coli* foi transferida para meio ágar LB e cultivada por período de 18 h à temperatura de 37 °C. Com o auxílio de palito de madeira estéril, transferiu-se uma única colônia isolada da bactéria para um tubo de tampa e rosca contendo 5 mL de meio LB. O tubo foi incubado por aproximadamente 3 horas sob agitação de 200 rpm e temperatura de 37 °C, até o caldo de cultivo ter atingido absorvância entre 0,5 e 0,6 (600 nm) (fase de crescimento). Transferiu-se 1 mL do caldo de cultivo para um microtubo plástico com capacidade volumétrica de 2 mL (estéril) e centrifugou-se a 4.000 rpm, em temperatura de 4 °C por período de 10 min. As células foram ressuspensas em 1 mL de solução de CaCl₂ (0,1 M) gelado. Repetiu-se a centrifugação nas mesmas condições, e as células foram novamente ressuspensas em 0,1 mL de CaCl₂ (0,1 M) gelado.

3.2.4.2 Transformação

As células competentes preparadas como descrito no item anterior foram transformadas com a introdução do plasmídeo de interesse (pRLC2). A transformação das células (*E. coli*) foi realizada de acordo com metodologia descrita por Sambrook e Russell (1989). Em 200 µL de suspensão de células competentes, adicionou-se 5 µL da solução de DNA plasmidial pRLC2 (5 a 10 µM). A suspensão foi incubada em banho de gelo por 30 min e, em seguida, em banho-maria a 42 °C por exatos 45 segundos. Imediatamente, resfriou-se a mistura em banho de gelo por 5 min. À suspensão, adicionou-se 800 µL de meio LB, incubou-se a 37 °C sob agitação de 150 rpm durante uma hora para recuperação das células. Centrifugou-se a suspensão a 4.000 rpm por 10 min em temperatura ambiente e descartou-se o sobrenadante.

O precipitado foi ressuspenso em 100 µL de meio LB, e alíquotas de 50 µL dessa suspensão de células transformadas (contendo plasmídeos) foram transferidas para placas de Petri contendo meio ágar LB sólido com ampicilina (100 µg·mL⁻¹), a fim de selecionar os transformantes contendo o plasmídeo, os quais, devido à inserção do plasmídeo, apresentam resistência ao antibiótico. Após inoculação, placas de Petri foram incubadas por 24 horas a 37 °C.

As colônias obtidas através dos procedimentos descritos foram utilizadas nos ensaios que são apresentados na sequência. Para isso, o preparo de inóculos dos cultivos foi realizado a partir de uma única colônia recombinante, transferida para meio LB, contendo ampicilina na concentração de 100 µg·mL⁻¹.

3.2.5 Avaliação de cultivo da *E. coli* na produção de PHAs

3.2.5.1 Preparação dos meios de cultivo

O meio LB e meios minerais (MM e M9) foram esterilizados em autoclave a 121 °C/15 min sem $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. O soro de queijo *in natura* pasteurizado, correntes permeadas e concentradas de ultra e nanofiltração, também foram esterilizados em autoclave a 121 °C/15 min, sem suplementação.

O $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, soluções de ampicilina ($100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) e de substratos carbônicos (glicose e lactose monohidratada), quando adicionados aos meios de cultivo, eram esterilizados em separado (121 °C/15 min). Essa operação foi realizada em ambiente estéril (câmara de fluxo laminar), como todas as atividades envolvendo material estéril. Alguns meios de cultivo foram suplementados com $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ para estimular o crescimento celular e o acúmulo do biopolímero (MAYER *et al.*, 2011; PARK *et al.*, 2002).

Nos meios de cultivo mineral e M9, utilizou-se lactose monohidratada na concentração final de $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ como substrato carbônico principal.

3.2.5.2 Preparação dos inóculos

Na preparação dos inóculos, utilizou-se uma colônia de *E. coli* recombinante estocada em placas de Petri sob refrigeração. Os inóculos foram incubados em frascos de *Erlenmeyer* e mantidos em agitador orbital (150 rpm) por ± 12 horas ou até atingir absorvância mínima de 0,6. A absorvância era determinada em espectrofotômetro a 600 nm.

No preparo dos inóculos, utilizou-se meio LB esterilizado a 121 °C durante 15 min. Após resfriamento, adicionou-se ampicilina ($100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) e uma colônia do isolado recombinante com auxílio de palito de madeira estéril.

3.2.5.3 Cultivo dos isolados recombinantes

Obtidos os isolados recombinantes, os cultivos foram divididos em relação à linhagem de interesse (JM 101 e ATCC 25922), sendo conduzidos em frascos de *Erlenmeyer* com capacidade volumétrica útil de 125 ou 500 mL e com agitação de 150 ou 200 rpm em agitador orbital com aquecimento (*shaker*). Também se realizaram cultivos em

frascos de Duran com sistema de aeração. Uma fotografia do frasco de Duran é mostrada na Figura 9.

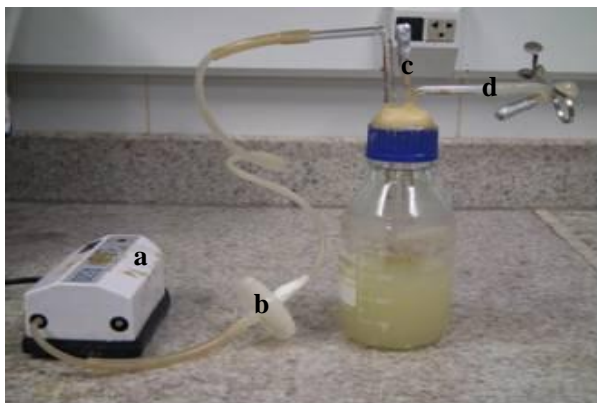


Figura 9 - Frasco de Duran, capacidade volumétrica útil de 0,5 L, composto por: a) bomba de aeração, b) filtro de ar na linha de alimentação, c) tubulação para descarga de pressão, e d) coletor de amostras.

Os frascos de Duran foram equipados com bomba de aeração ($3,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$), filtro de ar na linha de alimentação ($0,22 \mu\text{m}$), tubulação para descarga de pressão com filtro biológico (algodão com papel alumínio) e coletor de amostras. Ambas as modalidades de cultivo utilizaram temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e período de incubação de 24 horas em batelada.

Realizaram-se cultivos com diferentes meios, sendo eles: meios minerais (MM e M9), meio LB, soro de queijo *in natura* pasteurizado, permeados e concentrados do soro obtido por ultra e nanofiltração. Os meios minerais de cultivo (MM e M9) foram suplementados com lactose monohidratada ($40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e em alguns casos com $4,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Cultivos com meio M9 também foram suplementados com ácido propiônico, além da lactose monohidratada ($40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, a fim de avaliar o potencial dos isolados na incorporação do copolímero hidroxivalerato. Em todos os cultivos, corrigiu-se o pH no momento da inoculação para 6,8 e acompanhou-se durante as 24 horas de incubação.

3.2.5.4 Acompanhamento cinético

Em alguns cultivos, avaliou-se o comportamento cinético de isolados da linhagem ATCC 25922 em período de incubação de até 24 horas. Amostras com volume de 10 mL foram coletadas em duplicata e submetidas às determinações de MCS e acúmulo intracelular de PHAs.

Amostras foram coletadas em intervalos de 60 min até a 8ª hora, e em intervalos de 120 min após esse período. Com os dados de MCS, calculou-se $\ln(n/n_0)$ e utilizou-se o modelo de Gompertz modificado (Equação 9) (ERKMEN, 2001) para se obter dados da velocidade específica máxima na fase de crescimento bacteriano ($\mu_{máx}$) e duração da fase *lag* (λ (h)). Também foram calculados os fatores de conversão de substrato em célula (MCS) ($Y_{x/s}$) (g/g), de substrato em PHAs ($Y_{p/s}$) (g/g) e a MCS residual (Xr) ($g \cdot L^{-1}$), utilizando-se respectivamente as Equações 10, 11 e 12.

$$MCS_p = A \cdot \exp \left\{ - \exp \left[\frac{(\mu_{máx} \cdot e)}{A} \right] (\lambda - t) + 1 \right\} \quad (9)$$

$$Y_{x/s} = \frac{MCS_f - MCS_i}{S_i - S_f} \quad (10)$$

$$Y_{p/s} = \frac{PHA_t - PHA_{t_0}}{S_i - S_f} \quad (11)$$

$$Xr = MCS - PHAs \quad (12)$$

Onde: MCS_p é a massa celular seca predita pelo modelo, MCS_f é a quantidade de massa celular seca final ($g \cdot L^{-1}$), MCS_i é a quantidade de massa celular seca inicial ($g \cdot L^{-1}$), MCS é a quantidade de massa celular seca total ($g \cdot L^{-1}$), PHA_t é a quantidade de polímero no tempo t ($g \cdot L^{-1}$), PHA_{t_0} é a quantidade de polímero no tempo t_0 ($g \cdot L^{-1}$), S_f é a quantidade de substrato final ($g \cdot L^{-1}$), S_i é a quantidade de substrato inicial ($g \cdot L^{-1}$), Xr é a MCS residual ($g \cdot L^{-1}$) e $PHAs$ é a quantidade total de polímero produzido em $g \cdot L^{-1}$.

3.2.6 Determinações analíticas

3.2.6.1 Massa celular seca (MCS)

A MCS foi determinada por gravimetria. 15 mL de amostras eram centrifugados a 6.000·g em centrífuga termostaticada e refrigerada, modelo MPW-350-RH, utilizando-se temperatura de 4 °C/20 min. A massa remanescente foi seca em estufa à temperatura de 65 °C durante aproximadamente 120 horas ou até massa constante para posterior pesagem em balança analítica.

3.2.6.2 PHAs

A determinação qualitativa e quantitativa de PHAs foi realizada por cromatografia gasosa, utilizando-se cromatógrafo *Shimadzu CG2014*, equipado com coluna empacotada *Restek Rtx-Stabilwax Silcoport W 110/120* com 1,83 m de comprimento e 2 mm de diâmetro.

Na determinação cromatográfica utilizou-se nitrogênio como gás de arraste. As condições de operação utilizadas foram: fluxo do gás de arraste de 20 mL·min⁻¹·m⁻², temperatura do injetor de 250 °C, temperatura inicial da coluna de 140 °C e temperatura do detector de 270 °C. Estabeleceu-se uma rampa de temperatura, iniciando com 140 °C, com aumento de 2 °C·min⁻¹ até 160 °C, e um segundo aumento de 40 °C·min⁻¹ até 250 °C, mantendo-se por 2 min. Ácido benzoico (0,4 g·L⁻¹) foi utilizado como padrão interno e a curva de calibração foi construída utilizando poli (ácido 3-hidroxi-butírico-co-3-hidroxi-valérico) 88 mol % HB e 12 mol % HV (ALDRICH CHEM. Co.).

As amostras (volume de 15 mL) previamente desidratadas (65 °C até peso constante em estufa de secagem e esterilização modelo DL-SE) e pesadas em balança analítica, foram metanolizadas em solução com metanol (85%), ácido sulfúrico (15%) e suplementadas com 0,4 g·L⁻¹ de ácido benzoico (solução de metanol acidificado), conforme descrito por Braunegg *et al.* (1978) com modificações sugeridas por Brandl *et al.* (1988). Os PHAs intracelulares foram degradados a metil-ésteres de seus constituintes ácidos β-hidroxi-alcanoicos, possibilitando a identificação por análise cromatográfica.

Para metanolização das amostras, utilizaram-se tubos de vidro com tampa e rosca, 10 a 50 mg de MCS, 2 mL de solução de metanol acidificado e 2 mL de clorofórmio. Os tubos eram incubados em termobloco à temperatura de 100 °C/150 min, agitados para

homogeneização e nova incubação por 60 min nas mesmas condições. Após incubação, os tubos eram submetidos a banho de gelo para adição de 1 mL de água destilada, sendo agitados por 30 segundos, ficando em repouso por 5 min. Após a separação de fases, coletou-se a fase inferior (orgânica) com pipeta de *Pasteur* e armazenou-se sob refrigeração (-4 °C) para posterior injeção no cromatógrafo.

3.2.6.3 Lactose por DNS

A determinação dos teores de lactose (principal substrato carbônico) durante os cultivos foi realizada por técnica de DNS (3,5-dinitro salicilato), utilizada para determinação de açúcares redutores. A técnica foi descrita por Sumner (1921) com alterações sugeridas por Miller (1959), cujo protocolo detalhado é descrito no Anexo 3.

De maneira geral e simplificada, o protocolo de análise utilizava 1,5 mL de amostra previamente diluída em tubo de ensaio para adição de 1,5 mL de solução de DNS (1% de DNS, 0,2% de fenol, 0,05% de bissulfito de sódio e 1% de NaOH). Os tubos eram aquecidos a 100 °C por 15 min. Previamente ao resfriamento, adicionava-se 1 mL de solução de tartarato duplo de sódio e potássio, também conhecida por “sal de Rochelle”. Os tubos eram submetidos a banho de gelo e após a estabilização da temperatura à leitura das absorvâncias em espectrofotômetro (575 nm).

3.2.6.4 Eletroforese em gel de agarose

Para a identificação do plasmídeo pRLC2, utilizou-se eletroforese em gel de agarose 0,9%. O gel diluído em tampão TAE 1x. 5 μ L de solução de DNA plasmidial foram adicionados em 2 μ L de solução de azul de bromofenol. Em paralelo, adicionou-se 5 μ L de padrão molecular de 1 kb (kilobase) DNA *ladder* (250 μ g) (*Invitrogen*) em 2 μ L de solução de azul de bromofenol para acompanhamento da migração da amostra no gel. Ambas as soluções, depois de homogeneizadas eram injetadas em poços independentes localizados nas extremidades do gel de agarose previamente solidificado e imerso em solução TAE 1x. Mantinha-se a corrida do gel por período aproximado de 35 min a 75 V \cdot cm⁻¹. Após a corrida, o gel era imerso em solução de brometo de etídio por 20 min, fotografado e lido em transiluminador ultravioleta (UV) marca UVTRANS, modelo UVT-312, com comprimento de onda de 312 nm.

3.2.7 Extração do DNA plasmidial

Para a extração do DNA plasmidial utilizou-se o *kit* comercial de extração do fabricante *Gibco BRL (UltraClean® 6 Minute Mini Plasmid Prep Kit)*. Centrifugou-se alíquota de 1 mL do caldo de cultivo a 10.000·g/10 min (4 °C). A MCS era ressuspensa em tampões presentes no *kit* a fim de romper as células, eliminar o DNA genômico e obter o DNA plasmidial, sendo o DNA plasmidial ressuspensa em 75 µL de tampão Tris-EDTA. Ao final do procedimento de extração (Anexo 2), obteve-se o volume de 50 µL de solução de DNA plasmidial, que foi armazenado em microtubos em temperaturas de -20 e -80 °C para posteriores transformações microbianas.

3.3 FERRAMENTAS ESTATÍSTICAS EMPREGADAS NO ESTUDO

A Tabela 3 apresenta as diversas ferramentas estatísticas empregadas no estudo e suas finalidades.

Tabela 3 - Ferramentas estatísticas utilizadas no estudo.

Ferramenta estatística	Utilização no estudo	Restrições
Delineamento experimental (DCCR) 2 ^k .	Otimização de condições experimentais dos processos de separação.	Não é recomendado para comparação entre médias.
Duplicatas e triplicatas de ensaios experimentais.	Comparação de meios de cultivo utilizados na incubação da <i>E. coli</i> .	Não permite otimização nem a interação das condições experimentais. Permite somente avaliar as condições testadas.
Distribuição de ensaios experimentais ao acaso.	Distribui aleatoriamente as seqüências de realização dos ensaios experimentais.	
Teste de ANOVA.	Avaliação da influência das variáveis estudadas (teste “F”).	Considera a dispersão dos dados experimentais na comparação entre médias.

Durante as atividades experimentais, diversas ferramentas estatísticas foram empregadas a fim de delinear os ensaios experimentais e fornecer confiabilidade técnica na obtenção e tratamento dos dados. Todos os dados quantitativos coletados foram estatisticamente tratados utilizando-se o *software Statistica 7.0* e/ou *Microsoft Office Excel 2007*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados os resultados e as discussões relativas à utilização de processos de separação com membranas no tratamento do soro de queijo e a proposição de um destino biotecnológico para a lactose residual utilizando técnicas de transformação e cultivo de *E. coli* recombinante para produção de PHAs.

4.1 UTILIZAÇÃO DE PROCESSOS DE SEPARAÇÃO COM MEMBRANAS NO TRATAMENTO DO SORO DE QUEIJO

A partir da utilização das estratégias descritas no Capítulo 3, são apresentados inicialmente os resultados físico-químicos e microbiológicos do soro de queijo utilizado neste estudo.

4.1.1 Caracterização do soro de queijo

A composição centesimal do soro de queijo encontra-se na Tabela 4. Na primeira coluna, encontram-se os valores médios obtidos nas amostras do soro de queijo oriundas de lote único destinado aos processos de separação com membranas (ultra e nanofiltração). Na segunda e terceira colunas, são apresentados os valores descritos na literatura para as classificações correspondentes a soro de queijo doce e ácido, respectivamente.

Tabela 4 - Composição centesimal e contagem microbiana do soro utilizado neste estudo e composição centesimal do soro doce e ácido.

Componentes/contagem microbiana	Soro de queijo deste estudo (%)	Soro doce (%)*	Soro ácido (%)**
Sólidos totais	5,52 ±0,23	5,77	6,82 ±0,18
Água	94,48 ±0,23	94,23	93,17 ±0,18
Proteínas	0,78 ±0,06	0,54	0,86 ±0,02
Lactose	4,15 ±0,12	4,26	5,24 ±0,56
CCS	28,20 x 10 ³ ±15,79 x 10 ³		
CBT (UFC·mL ⁻¹)	1340 x 10 ³ ±485 x 10 ³		

CBT: contagem bacteriana total expressa em unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC·mL⁻¹).

Fonte: *Román *et al.* (2011).

**Atra *et al.* (2005); Soares *et al.* (2011).

As amostras do soro de queijo apresentaram pH médio de 6,78 ($\pm 0,1$), densidade média de 1,02 ($\pm 0,01$) e DQO média de 66,05 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($\pm 2,61$).

O pH do soro de queijo também é dependente da manipulação higiênica na obtenção. Quando a redução do pH do soro é causada por ácidos produzidos por micro-organismos, ocorre um aumento da acidez, que é determinada em °Dornic ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido láctico), devido a um consumo da lactose, fato constatado por Ounis *et al.* (2008). Os autores utilizaram em seus estudos, soro com pH entre 5,1 e 5,2, e constataram a presença de 22,3 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de lactose, ao invés dos 42,6 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ citados por Román *et al.* (2011) e Sánchez *et al.* (2011).

Observa-se que o soro utilizado no estudo apresentou percentual de proteína acima do citado por Román *et al.* (2011) para soro doce, provavelmente devido à presença de resíduos de renina, enzima utilizada para a precipitação das proteínas do leite no momento da fabricação do queijo e que também é detectada pelo método analítico utilizado.

O baixo teor proteico do soro apresentado na Tabela 4 (0,78 $\pm 0,06$) comparado ao teor proteico do leite que é de 3,3% (TRONCO, 2010), justifica-se pela presença isolada das proteínas hidrossolúveis, sendo as demais retidas durante a fabricação dos queijos. As frações α -lactoalbumina e β -lactoglobulina presentes no soro representam respectivamente 20 e 50% da composição das proteínas apresentadas na Tabela 4, sendo a parcela restante composta por imunoglobulinas, BSA, lactoferrina, lactoperoxidase e caseinomacropéptídeos. Em processos de separação com membranas, o conhecimento das características físicas e térmicas destas proteínas é necessário, pois são potencialmente responsáveis pela redução de fluxo, causando entupimento de poros e incrustações na superfície das membranas (AIMUTIS, 2004; METSÄMUURONEN; NYSTRÖM, 2009).

O soro utilizado no estudo foi classificado como soro doce por ser obtido através de reação enzimática, mantendo sua parcela de ácido láctico abaixo de 16 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e pH acima de 6, características que segundo Román *et al.* (2011) e Lizieiri e Campos (2006), o classificam como soro doce. Na obtenção do soro doce, a precipitação da proteína não ocorre em função de seu ponto isoelétrico médio, que no caso das proteínas do leite bovino é de pH 4,5 em temperatura de ± 20 °C (soro ácido) (PERRY, 2004), e sim pela ação enzimática, que age no rompimento da κ -caseína, possibilitando a obtenção de queijo com qualidade superior ao obtido com auxílio de solução ácida.

No processo de fabricação do queijo tipo minas frescal, que deu origem ao soro utilizado no presente estudo, utilizou-se salga seca,

aplicada diretamente sobre o queijo. O soro gerado nesse processo não contém resíduos de cloreto de sódio utilizado no procedimento de salga, permitindo sua reutilização e/ou destinação para fins fermentativos.

A composição do soro de queijo é variável, sendo influenciada por espécie, raça, idade, fase de lactação, alimentação, sanidade da vaca produtora do leite e do processo de fabricação do queijo (TRONCO, 2010), o que justifica pequenas diferenças detectadas entre os dados experimentais obtidos nas determinações analíticas do soro utilizado no estudo e os dados encontrados na literatura para as composições de sólidos totais, proteínas e lactose (Tabela 4).

A Instrução Normativa nº 51/02 que define os padrões de identidade e qualidades para leite bovino estabelece o limite máximo para contagem de células somáticas (CCS) presentes em leites produzidos nas diversas regiões do país. Na região Sul do Brasil, para o período entre 2008 a 2011, o limite máximo estabelecido foi de 750.000 células·mL⁻¹. No estudo, as amostras do soro de queijo apresentaram teores médios de 28.200 células·mL⁻¹ (± 15.790), estando dentro dos limites estabelecidos pela legislação vigente no período. A mesma Instrução Normativa define que, após 2011, os limites de CCS para o Sul do Brasil passariam para no máximo 400.000 células·mL⁻¹, similar aos adotados pela União Europeia.

A CCS é um indicativo do grau de infecção da glândula mamária, sendo fator diagnóstico de mastite subclínica e aceita internacionalmente como uma das medidas para determinar a qualidade do leite (BRITO; DIAS, 1998; MACHADO; PEREIRA; SARRIÉS, 1999; SILVEIRA, 2002). Elevadas CCS estão correlacionadas com maiores teores de gordura e proteínas do soro, menor porcentagem de caseínas, lactose e manutenção da concentração de sólidos totais. As mudanças significativas nas concentrações dos componentes do leite e/ou soro de queijo ocorrem a partir de 500.000 células·mL⁻¹ para proteína e lactose (MACHADO; PEREIRA; SARRIÉS, 1999). Desta forma, pode-se observar que os valores de CCS apresentados na Tabela 4 são insuficientes para alterações da qualidade dos componentes sólidos do soro, além de permitir sua classificação como originário de úberes saudáveis, que segundo Eberhart; Hutchinson; Spencer (1982), apresentam CCS menor que 50.000 células·mL⁻¹.

A contagem bacteriana total expressa em unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC·mL⁻¹) também é um parâmetro de avaliação da qualidade do leite e do soro de queijo produzidos no Brasil. As amostras do soro obtidas no estudo e submetidas às determinações analíticas apresentaram 1.340.000 UFC·mL⁻¹ (± 485.000).

A Instrução Normativa nº 51/02 também estabelece limites para a contagem de micro-organismos totais, que são de $1.000.000 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$. Segundo Philpot e Nickeron (2002), no momento da publicação da Instrução Normativa nº 51, os limites legais de contaminação bacteriana em leites produzidos nos EUA e União Europeia eram de, no máximo, $100.000 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$, sem a presença de adulterantes e/ou antibióticos que poderiam reduzir a carga biológica (RIBEIRO; ZANELA; BARBOSA, 2006). Salienta-se que a exigência regulamentar estabelecida pela Instrução Normativa nº 51/02 não causou redução na contagem de micro-organismos totais nos diferentes tipos de leites produzidos e comercializados no país, pois em estudo sobre contagem de bactérias psicotróficas totais em leite cru pasteurizado realizado no estado do Rio Grande do Sul, detectou-se contaminações entre $10.000.000$ e $31.600.000 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ (MILKPOINT, 2010). Altas CBT determinam menores rendimentos de produtos como queijos, redução da vida de prateleira e no caso de bactérias psicotróficas (acima de $1.000.000 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$), além de se multiplicarem em temperatura de refrigeração, produzem as enzimas lipases e proteases, que são termorresistentes aos tratamentos térmicos tradicionais (PEREIRA JÚNIOR, 2002; ALVES, 2006).

A DQO das amostras do soro obtidas no estudo foi de $66,05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, estando na faixa citada por Cordi *et al.*, (2007) (50 e $80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), podendo ser tratado de diversas maneiras, como digestão anaeróbia, leite fluidizado, lodo ativado e/ou sistemas de filtração utilizando membranas.

Os danos ambientais gerados pelo soro de queijo descartado sem prévio tratamento não são recentes. Na década de 1980, autores como Souza (1982), Lo e Lião (1986) e Lacerda, Oliveira e Caruso (1990) conseguiram em seus estudos taxas de remoção de DQO que variaram entre 70 a 90% das $68 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ presentes utilizando técnicas de digestão anaeróbia. Hickey e Owens (1981), utilizando digestores de leite fluidizado, conseguiram remover até 83,6% da DQO presente no soro.

Hosseini, Shojaosadati e Towfighi (2003) citam o soro de queijo não devidamente tratado como um dos principais poluentes ambientais a partir de laticínios. Lira *et al.* (2009) afirmam em seus estudos que, no Brasil, 50% do volume do soro produzido não é aproveitado, sendo uma parcela deste destinado a corpos receptores sem prévio tratamento, o que não só gera impacto ambiental de proporções significativas, como também se caracteriza como desperdício energético, considerando sua composição físico-química.

Desta forma, tecnologias que possam contribuir com a redução da carga orgânica deste efluente e/ou aproveitem o potencial energético desperdiçado, merecem atenção. Neste contexto, na sequência são apresentados os resultados obtidos no estudo com o emprego do processo de separação com membranas (ultra e nanofiltração), uma alternativa para tratamento do soro.

4.1.2 Ensaio de ultrafiltração

Os dados de permeabilidade da membrana limpa com água e os resultados de ambos os parâmetros de caracterização dos processos de separação obtidos neste estudo, são apresentados a seguir.

4.1.2.1 Caracterização da membrana de ultrafiltração

Após limpeza prévia com água pura, procederam-se ensaios de fluxo permeado em diferentes pressões (entre 0 e 3,5 kgf·cm⁻²). A determinação do fluxo inicial de uma membrana nova é um procedimento realizado para se estabelecer e controlar o processo de limpeza após a utilização. Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 10.

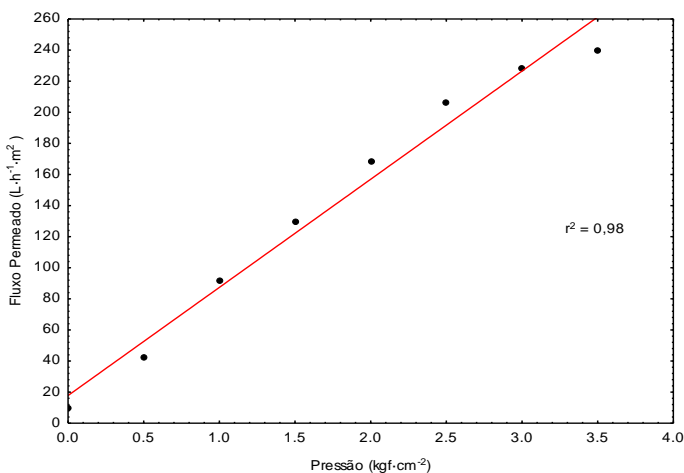


Figura 10 - Fluxo permeado de ultrafiltração utilizando água pura em diferentes pressões por período de 10 min.

Observa-se na Figura 10 que, mesmo com pressão transmembrana $0 \text{ kgf}\cdot\text{cm}^{-2}$, obteve-se fluxo médio de permeação com água de $9,67 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^2$ ($\pm 0,09$). Isto ocorre porque a tubulação do sistema, suas curvas e a tensão de cisalhamento do fluido nas paredes da tubulação, representam elementos de restrição, ou seja, barreiras de retenção de fluido, fazendo com que o mesmo seja pressionado à permeação através da membrana sem que esta pressão seja detectada pelo manômetro do equipamento, visto que a sua força motriz é a pressão transmembrana (ROMÁN *et al.*, 2011).

Segundo Román *et al.* (2011), existe uma relação linear entre fluxo e a diferença de pressão transmembrana, quando utilizada água pura em membrana nova e limpa, dentro de certos limites. Os autores ressaltam que essa linearidade também é observada quando se circula água limpa em membrana suja e/ou soro de queijo em membrana suja. Porém, esta linearidade é encontrada em uma restrita faixa de pressão.

Na pressão de $3,0 \text{ kgf}\cdot\text{cm}^{-2}$ (Figura 10), nota-se uma pequena redução do fluxo permeado, possivelmente em função da compactação da membrana. A compactação é causada pelo efeito da pressão sobre a espessura da membrana, devido ao seu limite de resistência mecânica, comprimindo-a, diminuindo o orifício dos poros e, conseqüentemente, alterando sua seletividade, reduzindo a permeação. Essa observação está de acordo com Atrá *et al.* (2005), que observaram esse mesmo efeito de compactação em seus estudos. Assim, a partir destas observações, pode-se afirmar que os melhores resultados de fluxo permeado de água pura para módulos de membranas equivalentes aos do presente estudo podem ser obtidos em pressões entre $1,0$ e $2,5 \text{ kgf}\cdot\text{cm}^{-2}$, intervalo em que a relação do fluxo com a pressão transmembrana é linear.

Os fluxos de água pura nas pressões transmembrana de 0 , 1 , 2 e $3 \text{ kgf}\cdot\text{cm}^{-2}$ também foram monitorados por períodos de até 60 min, análise necessária para avaliar a compactação da membrana em relação ao tempo de exposição a determinada pressão.

A Figura 11 apresenta o comportamento do fluxo permeado com água pura ao longo de 60 min de ultrafiltração em diferentes pressões transmembrana (0 , 1 , 2 e $3 \text{ kgf}\cdot\text{cm}^{-2}$).

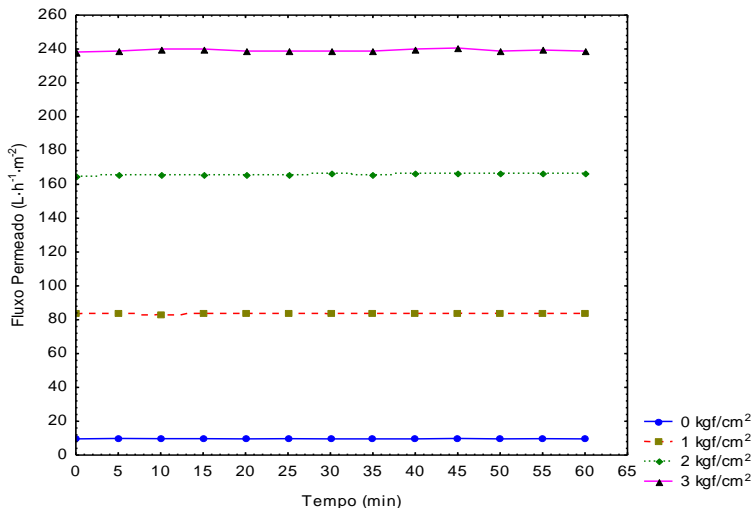


Figura 11 - Fluxo de água utilizando-se a membrana de ultrafiltração em diferentes pressões.

Percebe-se, com base nos resultados da Figura 10 e Figura 11, que o aumento de fluxo permeado em relação à pressão é linear até uma determinada pressão, indiferente do tempo, mantendo-se estável durante a filtração. Desta forma, qualquer fator que possa interferir nesta linearidade, como é o caso do aumento da pressão osmótica no fluido de alimentação (ROMÁN *et al.*, 2011), aumento de sólidos na superfície da membrana e/ou bloqueio de poros, alteraria o fluxo permeado.

4.1.2.2 Avaliação dos parâmetros operacionais da ultrafiltração no tratamento do soro

A Tabela 5 apresenta a matriz experimental utilizada, os fluxos permeados e os percentuais de redução de fluxos permeados obtidos nos 17 ensaios experimentais de ultrafiltração com soro, durante 60 min com reciclo total de permeado até FC= 3. Os 17 ensaios experimentais fazem parte do DCCR 2³ utilizado para este experimento.

Tabela 5 - Matriz experimental do DCCR 2³ com valores reais para temperatura, pressão e vazão de alimentação. Como resposta: os fluxos permeados (J) e o percentual de redução de fluxo dos ensaios experimentais de ultrafiltração do soro.

Ensaio	Temperatura (°C)	Pressão (kgf·cm ⁻²)	Vazão de alimentação (m ³ ·h ⁻¹)	$J_{inicial}$ (L·h ⁻¹ ·m ²)	% de		$J_{60\ min}$ (L·h ⁻¹ ·m ²)	% redução de $J_{60\ min}$	J_{final} (L·h ⁻¹ ·m ²)	% redução de J_{final}
					$J_{tempo\ 5}$ (L·h ⁻¹ ·m ²)	redução de $J_{tempo\ 5}$				
1	25	1,0	0,398	25,20	16,80	33,33	11,88	52,86	11,16	55,71
2	25	1,0	0,580	28,20	18,36	34,89	14,76	47,66	13,68	51,49
3	25	3,0	0,398	33,00	26,40	20,00	23,40	29,09	23,16	29,82
4	25	3,0	0,580	35,40	26,04	26,44	19,92	43,73	18,84	46,78
5	45	1,0	0,398	33,00	21,60	34,55	17,40	47,27	16,44	50,18
6	45	1,0	0,580	33,60	22,80	32,14	18,60	44,64	17,52	47,86
7	45	3,0	0,398	39,60	30,00	24,24	27,12	31,52	25,80	34,85
8	45	3,0	0,580	50,28	34,20	31,98	29,40	41,53	29,28	41,77
9	18	2,0	0,489	31,80	21,96	30,94	18,00	43,40	17,88	43,77
10	52	2,0	0,489	52,08	28,32	45,62	23,64	54,61	22,20	57,37
11	35	0,3	0,489	10,80	8,40	22,22	6,84	36,67	6,00	44,44
12	35	3,7	0,489	37,80	28,32	25,08	22,20	41,27	21,48	43,17
13	35	2,0	0,336	38,52	28,56	25,86	22,56	41,43	22,20	42,37
14	35	2,0	0,643	39,24	29,28	25,38	24,84	36,70	24,12	38,53
15	35	2,0	0,489	27,00	18,00	33,33	13,80	48,89	13,80	48,89
16	35	2,0	0,489	32,04	20,88	34,83	15,60	51,31	14,16	55,81
17	35	2,0	0,489	31,20	21,36	31,54	15,60	50,00	14,40	53,85
Média				34,04	23,60	30,14	19,15	43,68	18,36	46,27
S (±)				9,37	6,25	6,20	5,82	7,22	5,89	7,62

A queda de fluxo permeado pode ser considerada a maior barreira dos processos de separação com membranas, pois além de comprometer a eficiência da separação, requer maior área filtrante resultando em maior investimento na aquisição das unidades processadoras. Com base nessa preocupação, buscou-se, utilizando uma metodologia estatística (DCCR 2³), avaliar em quais condições operacionais da ultrafiltração o soro apresenta a menor queda de fluxo permeado (J) e o maior fluxo permeado final (J_{final}). Investigou-se a redução de fluxo permeado durante os primeiros 60 min de ultrafiltração, com reciclo total de permeado, evitando-se, assim, influência da variação da concentração do retentado no fluxo permeado.

Verificou-se influência significativa ($p < 0,05$) da temperatura no fluxo permeado final, entretanto, não houve influência significativa ($p < 0,05$) da temperatura na queda de fluxo permeado durante a ultrafiltração (Tabela 5). Esta condição torna o processo mais econômico porque demanda menor gasto energético, preservando-se, ainda, as características e propriedades nutricionais do produto.

Verificou-se, também, como esperado, uma redução de fluxo permeado com o aumento da pressão osmótica do soro, em função de sua concentração.

A **Figura 12** mostra os fluxos de permeação do soro nas 17 condições experimentais testadas com o primeiro planejamento DCCR 2³, sendo possível observar a redução de fluxo permeado em relação ao tempo, identificando os momentos de formação da polarização de concentração e *fouling*.

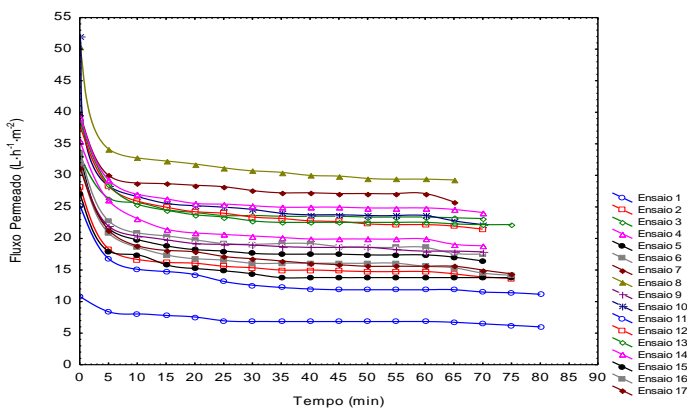


Figura 12 - Fluxos permeados do soro nas condições experimentais determinadas pela matriz experimental do primeiro DCCR 2³.

Em função de o delineamento experimental utilizar somente uma triplicata de pontos centrais, a análise estatística dos efeitos absolutos foi realizada por SS residual, distribuindo estatisticamente os erros nos 17 ensaios experimentais e não somente nas triplicatas dos pontos centrais, como é tradicionalmente realizado.

O maior fluxo permeado inicial obtido na ultrafiltração do soro foi de $52,08 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^2$ com temperatura de $51,8 \text{ }^\circ\text{C}$, pressão de $2 \text{ kgf}\cdot\text{cm}^{-2}$ e $0,489 \text{ m}^3\cdot\text{h}^{-1}$. O fluxo permeado obtido foi 38% inferior ao fluxo inicial obtido quando utilizada água pura como fluido, que foi de $84 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^2$. A redução observada justifica-se pela presença de sólidos na corrente de alimentação, criando uma camada polarizada na superfície da membrana e/ou bloqueando poros.

Observa-se na **Figura 12** que a membrana apresentou redução média inicial de fluxo permeado nos primeiros dez min de operação de aproximadamente 46,1%, redução obtida pelo aumento da concentração de sólidos próximos à superfície da membrana. Esta alteração da concentração de sólidos é também citada por Constenla e Lozano (1997) como polarização de concentração, ou seja, um aumento localizado da concentração de compostos rejeitados na superfície da membrana devido ao transporte convectivo de solutos.

A polarização por concentração é um fenômeno de redução imediata de fluxo. Este fenômeno pode ser minimizado com o aumento da vazão de alimentação. Quando a concentração de solutos próximos à superfície da membrana é maior do que no seio da solução, ocorre um movimento difusivo deste soluto no sentido de retornar ao seio da solução, gerando um equilíbrio do sistema, provavelmente devido a diferença de pressão osmótica.

Observa-se ainda, na Figura 12, que o ensaio 10 apresentou queda de fluxo inicial mais acentuada. Neste ensaio, trabalhou-se à temperatura de $52 \text{ }^\circ\text{C}$, sendo esta a maior temperatura utilizada no experimento. Segundo Metsämuuronen e Nyström (2009), temperaturas acima de $50 \text{ }^\circ\text{C}$ favorecem a agregação térmica da fração de α -lactoalbumina presente no soro e a precipitação de fosfato de cálcio na superfície da membrana. Os autores, ultrafiltrando soro, observaram queda inicial de fluxo de 65,3% nos primeiros min de ultrafiltração em membranas de poli(éter-sulfona) com massa molar de corte de $50.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, equivalentes à utilizada neste estudo. Temperaturas mais altas também reduzem a viscosidade do soro, aumentando a velocidade com que o fluido é direcionado do seio da solução em direção à membrana, aumentando sua permeação inicial e conseqüentemente o arraste de

solutos em direção à membrana, acelerando a polarização de concentração.

Cheryan (1998b), em estudos com ultrafiltração do soro de queijo, observou queda de fluxo permeado com o aumento da temperatura de operação de 10 para 30 °C, devido à insolubilização e precipitação de fosfatos de cálcio. Porém, com o aumento da temperatura para acima dos 30 °C o fluxo aumentou. Segundo o autor, os benefícios da baixa viscosidade e alta difusividade do soro em temperaturas acima de 30 °C compensaram a queda de fluxo gerada pela incrustação de sais de cálcio.

Bassetti (2002) afirma que, em ultrafiltração com escoamento tangencial, a polarização de concentração depende das condições hidrodinâmicas do escoamento da solução a ser filtrada, pois quanto maior a velocidade de escoamento tangencial, menor a intensidade da polarização por concentração, já que o arraste das partículas polarizadas permite maior permeação do solvente.

Bronstein e Monte Alegre (1998), utilizando permeado de soro de queijo parmesão obtido por ultrafiltração através de membrana de polissulfona, observaram 30% de redução de fluxo nos primeiros 5 min de ultrafiltração devido à polarização por concentração. Este comportamento também foi observado neste estudo e pode ser visualizado na **Figura 12**.

Outro fator evidenciado na Figura 12 é o *fouling*, fenômeno geralmente irreversível, responsável pela colmatação da membrana, geralmente provocado pela presença de proteínas e gordura que contribuem com a queda do fluxo permeado (METSÄMUURONEN; NYSTRÖM, 2009).

Quando a membrana apresenta tamanhos de poros muito próximos aos dos diâmetros dos solutos, a colmatação é favorecida, bloqueando os poros ou interagindo-se com eles, reduzindo-os parcialmente ou alterando sua seletividade. O acúmulo de partículas coloidais ou macromoléculas nos poros ou na superfície da membrana, e a possível cristalização e/ou precipitação de solutos que atravessam os poros, geram o *fouling* (BASSETTI, 2002).

A análise estatística não identificou efeito significativo ($p < 0,05$) da variação da pressão, vazão de alimentação e temperatura em relação ao percentual de redução de fluxo permeado. A redução de fluxo permeado observada na Figura 12 ocorreu em função da polarização de concentração e/ou colmatação da membrana e não em função da variação das condições experimentais testadas. Porém, foi possível

observar efeito significativo da temperatura e pressão transmembrana na manutenção do fluxo permeado final.

No ensaio 8 da Tabela 5 obteve-se o maior fluxo permeado final quando utilizou-se temperatura de 45 °C, pressão de 3,0 kgf·cm⁻² e vazão de alimentação de 0,580 m³·h⁻¹. A temperatura de 45 °C provavelmente diminuiu a viscosidade do soro sem desnaturar suas proteínas. A vazão de alimentação de 0,580 m³·h⁻¹ levou a um aumento da turbulência no sistema, contribuindo para a redução da polarização de concentração, permitindo a manutenção das taxas de permeação.

Os efeitos das variáveis em estudo e suas relações com o fluxo permeado final foram avaliados utilizando-se análise de variância (ANOVA). O resultado da análise de variância referente ao fluxo permeado pode ser observado na **Tabela 6**.

Tabela 6 - Análise de variância (ANOVA). Fluxo permeado final dos ensaios experimentais de ultrafiltração (DCCR 2³). Sendo L: linear e Q: quadrática.

Variáveis	SS	GL	MS	F_{calc}	p -valor
Temperatura (L)	63,5703	1	63,5703	23,8203	0,0018
Temperatura (Q)	51,5478	1	51,5478	19,3153	0,0032
Pressão (L)	302,8043	1	302,8043	113,4630	0,0000
Pressão (Q)	0,0832	1	0,0832	0,0312	0,8649
Vazão de Aliment. (L)	2,4681	1	2,4681	0,9248	0,3682
Vazão de Aliment. (Q)	118,1442	1	118,1442	44,2695	0,0003
Interação variável 1 e 2 (L)	1,9602	1	1,9602	0,7345	0,4198
Interação variável 1 e 3 (L)	5,0562	1	5,0562	1,8946	0,2111
Interação variável 2 e 3 (L)	2,4642	1	2,4642	0,9234	0,3686
Erro puro	18,6812	7	2,6687		
Total	555,5232	16			

O quadro de ANOVA da **Tabela 6** apresenta valores de p -valor inferiores a 0,05 para a variável temperatura (linear e quadrática), pressão (linear) e vazão de alimentação (quadrática). Os valores de F calculado (F_{calc}) presentes na **Tabela 6** são superiores ao valor de F tabelado (F_{tab}) para experimentos desta natureza, que é de 3,23 (RODRIGUES; IEMMA, 2005; VIEIRA, 2006; BARBETTA; REIS; BORNIA, 2009). Toda vez que o F_{calc} for maior que o F_{tab} rejeita-se a hipótese de que os efeitos das variáveis independentes sobre a resposta são iguais, validando a diferença significativa ($p < 0,05$) (VIEIRA, 2006).

Observa-se na **Figura 13** os efeitos das variáveis que apresentaram significância ($p < 0,05$).

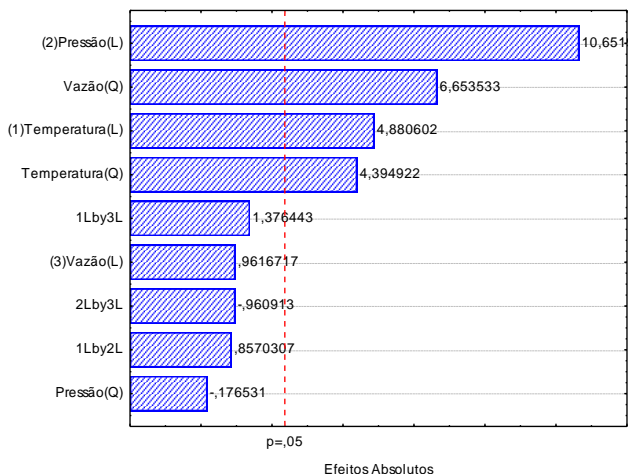


Figura 13 - Gráfico de Pareto com análise dos efeitos absolutos das variáveis temperatura, pressão e vazão de alimentação, e suas relações com o fluxo permeado final.

Constata-se que o efeito de interação entre as variáveis estudadas não foi significativo ($p < 0,05$) em relação ao fluxo permeado final. O efeito indica o quanto cada fator influenciou na resposta estudada, para o parâmetro linear. O efeito positivo indica que o aumento da variável provoca um aumento no fluxo permeado final.

As premissas da análise de variância foram satisfeitas, pois a distribuição dos resíduos é normal sem a presença de *outliers*, validando os resultados da análise de variância observados na **Tabela 6**.

A **Figura 14** apresenta a superfície de resposta demonstrando graficamente a influência da pressão e temperatura de operação no fluxo permeado final do soro obtido por ultrafiltração até $FC = 3$.

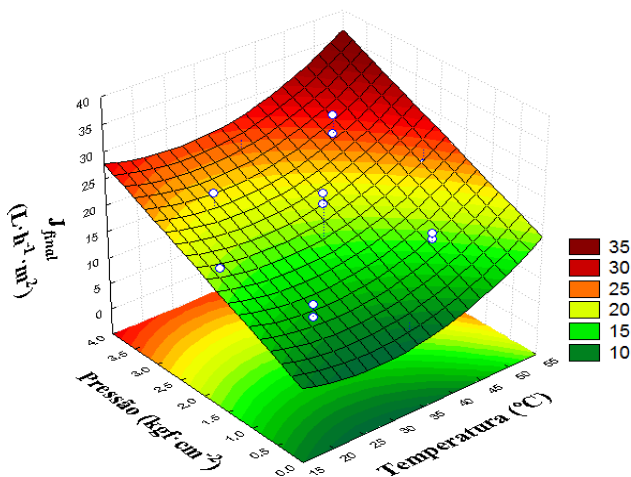


Figura 14 - Superfície de resposta do fluxo permeado final obtido na ultrafiltração do soro de queijo.

Observa-se na **Figura 14** que os melhores resultados de fluxo permeado final foram obtidos em temperaturas acima de 40 °C e pressões superiores a 2,5 kgf·cm⁻², restritas às limitações térmicas e mecânicas do módulo de membranas utilizado. A influência da temperatura no fluxo permeado final também é devida à diminuição da viscosidade do soro, pois a parcela de gordura presente possui ponto de fusão em torno de 29 °C. A influência da temperatura acima de 40 °C no fluxo permeado também foi observada por Metsämuuronen e Nyström (2009). Além disso, a temperatura de operação afeta a mobilidade das cadeias poliméricas da membrana, tornando o material polimérico mais flexível (BARROS, 2002; GOOSEN *et al.*, 2002), contribuindo com a manutenção do fluxo permeado. Já a variação linear da vazão de alimentação (L) não apresentou influência significativa ($p < 0,05$) no fluxo permeado final, o que pode ser observado na **Tabela 6** e **Figura 13**.

Com base nos resultados apresentados, define-se como melhor condição para ultrafiltração do soro no módulo de membranas utilizado no estudo, objetivando fluxos permeados finais, a temperatura de 45 °C, pressão de 3,0 kgf·cm⁻² e vazão de alimentação de 0,580 m³·h⁻¹.

4.1.2.3 Caracterização físico-química das correntes obtidas na ultrafiltração do soro

Amostras do soro, obtidas nas correntes de alimentação, concentradas e permeadas até FC= 3, foram analisadas quanto aos teores de sólidos totais, proteínas e lactose. Essas últimas determinações são necessárias ao acompanhamento da relação proteína/lactose, como utilizado por Farro e Viotto (2003). A composição das correntes de alimentação, permeada e concentrada, pode ser observada na Tabela 7, e a relação proteína/lactose na Tabela 8.

Tabela 7 - Percentual de sólidos totais, proteína e lactose das correntes de alimentação, concentradas e permeadas obtidas por ultrafiltração do soro.

Ensaio Experimentais	Corrente de alimentação			Corrente concentrada			Corrente permeada		
	(%) Sólidos Totais	(%) Proteínas	(%) Lactose	(%) Sólidos Totais	(%) Proteínas	(%) Lactose	(%) Sólidos Totais	(%) Proteínas	(%) Lactose
1	5,57	0,82	4,15	5,31	1,15	3,55	4,22	0,36	3,52
2	5,38	0,76	4,12	5,18	1,03	3,54	4,36	0,46	3,52
3	5,51	0,75	4,18	5,16	0,83	3,79	4,71	0,59	3,66
4	5,27	0,78	3,98	5,32	1,03	3,71	4,38	0,5	3,49
5	5,54	0,76	4,22	5,33	0,93	3,68	4,58	0,48	3,63
6	5,49	0,74	4,14	5,54	1,05	3,66	4,49	0,41	3,63
7	5,66	0,77	4,30	5,60	0,92	3,96	4,87	0,57	3,79
8	5,51	0,76	4,17	5,12	0,80	3,63	4,46	0,50	3,48
9	5,41	0,74	4,08	5,11	0,87	3,63	4,46	0,55	3,49
10	5,58	0,76	4,34	5,13	0,87	3,63	4,40	0,47	3,48
11	5,24	0,73	3,96	5,05	1,07	3,41	4,20	0,41	3,42
12	5,38	0,79	4,06	5,42	0,95	3,73	4,39	0,47	3,48
13	5,27	0,74	4,05	5,06	0,84	3,61	4,49	0,53	3,51

Ensaio Experimental	Corrente de alimentação				Corrente concentrada				Corrente permeada					
	(%) Sólidos Totais	(%) Proteínas	(%) Lactose	(%) Sólidos Totais	(%) Sólidos Totais	(%) Proteínas	(%) Lactose	(%) Sólidos Totais	(%) Sólidos Totais	(%) Proteínas	(%) Lactose	(%) Sólidos Totais	(%) Proteínas	(%) Lactose
14	5,53	0,80	4,15	5,36	0,99	3,70	4,59	0,56	3,61					
15	6,2	0,98	4,36	6,02	1,28	3,86	4,82	0,59	3,65					
16	5,57	0,80	4,04	5,83	1,19	3,75	4,64	0,44	3,63					
17	5,79	0,80	4,21	6,29	1,32	3,83	5,06	0,55	3,82					
Média	5,52	0,75	4,15	5,40	1,01	3,69	4,54	0,50	3,58					
S (±)	0,23	0,13	0,12	0,36	0,16	0,13	0,23	0,07	0,11					

Observa-se na Tabela 7 que menores pressões apresentaram maior retenção de proteína. Acredita-se que em pressões elevadas ocorra deformação da molécula de proteína (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006) ou redução do tamanho dos poros em função da compactação da membrana. A redução média obtida no teor de proteína no permeado em relação ao soro inicial foi de 36,30% ($\pm 8,71$), aumentando a relação proteína/lactose na corrente concentrada e diminuindo esta relação na corrente permeada, conforme observado na **Tabela 8**. Ressalta-se que a ultrafiltração realizada neste estudo teve como objetivo a redução proteica na corrente permeada.

A Tabela 8 também mostra o percentual de variação média da relação proteína/lactose na corrente concentrada de 44,84% ($\pm 17,87$), até um FC= 3. A pressão, temperatura e vazão de alimentação apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$) no percentual de variação da relação proteína/lactose, sem efeito de interação entre as variáveis.

Tabela 8 - Relação proteína/lactose ($R_{P/L}$) das correntes de alimentação, permeada e concentrada. Percentual de redução da relação proteína/lactose calculados pela Equação 4.

Ensaios Experimentais	$R_{P/L}$ (Alim.)	$R_{P/L}$ (Conc.)	$R_{P/L}$ (Perm.)	% Variação $R_{P/L}$ (Conc.)	% Variação $R_{P/L}$ (Perm.)
1	0,20	0,32	0,10	63,95	51,76
2	0,18	0,29	0,13	57,73	70,84
3	0,18	0,22	0,16	22,05	89,84
4	0,20	0,28	0,14	41,66	73,10
5	0,18	0,25	0,13	40,32	73,42
6	0,18	0,29	0,11	60,50	63,19
7	0,18	0,23	0,15	29,74	83,99
8	0,18	0,22	0,14	20,92	78,83
9	0,18	0,24	0,16	32,14	86,89
10	0,18	0,24	0,14	36,86	77,12
11	0,18	0,31	0,12	70,22	65,03
12	0,19	0,25	0,14	30,89	69,41
13	0,18	0,23	0,15	27,35	82,64
14	0,19	0,27	0,16	38,80	80,47
15	0,22	0,33	0,16	47,53	71,92
16	0,20	0,32	0,12	60,25	61,21
17	0,19	0,34	0,14	81,37	75,77
Média	0,19	0,27	0,14	44,84	73,85
S (\pm)	0,01	0,04	0,02	17,87	9,88

A corrente concentrada provavelmente reteve as frações proteicas de BSA ($69.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), imunoglobulinas ($150.000 - 1.000.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), lactoferrina ($78.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) e lactoperoxidase ($89.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), permeando as frações de α -lactoalbuminas ($14.100 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), β -lactoglobulinas ($18.400 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) e caseinomacropéptídeos ($7.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) (SGARBIERI, 1995; METSÄMUURONEN; NYSTRÖM, 2009). Segundo Aimutis (2004), o soro de queijo possui em sua composição proteica: 20% de α -lactoalbuminas, 50% de β -lactoglobulinas, 10% de albumina do soro bovino (BSA), 10% de imunoglobulinas e 10% de proteases e peptonas.

A retenção das frações proteicas de BSA, imunoglobulinas, lactoferrina e lactoperoxidase na corrente concentrada, todas com massa molar superior a $50.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (massa molar de corte da membrana utilizada), justifica o aumento médio de 44,8% ($\pm 17,9$) na relação proteína/lactose da corrente concentrada. O desvio padrão observado nos dados da **Tabela 8** referentes ao percentual de variação na relação proteína/lactose é devido à influência da pressão na permeação de proteínas com massa molar aproximada à massa molar de corte da membrana, pois no experimento utilizou-se pressões entre 0,3 a 3,7 $\text{kgf}\cdot\text{cm}^{-2}$.

As frações α -lactalbumina e β -lactoglobulina representam aproximadamente 70% da composição proteica do soro (AIMUTIS, 2004; ATRA *et al.*, 2005), ambas com massas molares inferiores a $50.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Estas duas frações proteicas acrescidas da fração de caseinomacropéptídeos justificam a permeação média de 64% ($\pm 0,09$) (CR= 0,36) de proteínas, obtida nos 17 ensaios experimentais do estudo.

Segundo Habert, Borges e Nobrega (2006), a baixa concentração de soluto na corrente de alimentação, sua fraca interação com a membrana, elevado número de *Reynolds* e baixos fluxos de permeação, são os principais fatores que contribuem para obtenção de bons resultados de rejeição parcial de compostos na corrente concentrada. Os autores salientam que moléculas de mesma massa molar e naturezas diferentes podem apresentar características distintas além da variação de forma, flexibilidade e interação com a membrana.

Na Tabela 9 observa-se os coeficientes de rejeição, calculados com a Equação 5, dos componentes do soro nas 17 condições experimentais definidas pela matriz do planejamento DDCR 2³.

Tabela 9 - Coeficientes de rejeição (CR) de sólidos totais, proteínas e lactose presentes no soro utilizando membrana de ultrafiltração até FC= 3.

Ensaio Experimentais	CR (Sólidos Totais)	CR (Proteínas)	CR (Lactose)
1	0,24	0,56	0,15
2	0,21	0,39	0,15
3	0,12	0,21	0,12
4	0,17	0,36	0,12
5	0,17	0,37	0,14
6	0,18	0,45	0,12
7	0,12	0,26	0,12
8	0,18	0,34	0,17
9	0,20	0,26	0,14
10	0,16	0,38	0,20
11	0,22	0,44	0,14
12	0,17	0,41	0,14
13	0,15	0,28	0,13
14	0,17	0,30	0,13
15	0,22	0,40	0,16
16	0,17	0,45	0,10
17	0,13	0,31	0,09
Média	0,17	0,36	0,14
S (\pm)	0,04	0,09	0,02

A retenção de sólidos na corrente concentrada de ultrafiltração observada na Tabela 9 permite seu reaproveitamento, pois segundo Skelton (2000), a corrente concentrada do soro rica em proteínas e gordura pode ser utilizada em substituição parcial da matéria prima láctea, reduzindo o volume de efluentes. Salienta-se que a legislação brasileira permite a adição de sólidos de origem láctea no fabrico de produtos como doce de leite e leite condensado (BRASIL, PORTARIA 354/1997).

Também foi monitorada a redução de células somáticas (CCS) do soro submetido à ultrafiltração, pois sua presença é um indicativo de mastite no leite bovino e, conseqüentemente, no soro de queijo. Pode-se observar na **Tabela 10** que a corrente permeada de ultrafiltração apresentou uma redução média de 54% (± 18) na CCS.

Tabela 10 - Composição e coeficiente de rejeição na CCS·mL⁻¹ em permeado do soro ultrafiltrado.

Ensaio Experimentais	CCS (x1000·mL ⁻¹) (Alimentação)	CCS (x1000·mL ⁻¹) (Concentrada)	CCS (x1000·mL ⁻¹) (Permeada)	CCS (CR)
1	25	44	4	0,84
2	23	34	7	0,70
3	20	25	12	0,40
4	15	22	7	0,53
5	26	41	14	0,46
6	26	49	11	0,58
7	24	30	15	0,38
8	36	54	32	0,11
9	17	25	9	0,47
10	48	53	20	0,58
11	25	41	8	0,68
12	28	29	8	0,71
13	26	32	13	0,50
14	24	26	9	0,63
15	81	116	55	0,32
16	13	16	3	0,77
17	21	40	11	0,48
Média	28,12	39,82	14,00	0,54
S (±)	15,79	22,51	12,51	0,18

A Tabela 10 também mostra que a ultrafiltração em baixa pressão (1 kgf·cm⁻²), temperatura de 25 °C e vazão de alimentação de 0,398 (m³·h⁻¹), reduziu até 84% a CCS do soro. Segundo Mazal (2005), a redução de CCS contribui para a manutenção do perfil de textura dos derivados lácteos elaborados à base de leite e/ou soro de queijo, não alterando sua qualidade sensorial típica, justificando a utilização da ultrafiltração como pré-tratamento do soro enviado à fabricação de derivados lácteos como é o caso da bebida láctea e ricota.

Altos teores de células somáticas (>200.000·mL⁻¹) aumentam a proteólise das frações proteicas α e β , ou seja, das frações proteicas hidrossolúveis presentes no soro (MAZAL, 2005), dificultando sua retenção por processos de separação com membranas. Da mesma forma que a ultrafiltração pode ser utilizada para reduzir a CCS, melhorando a qualidade do soro de queijo, a eficiência do processo de separação pode

ser prejudicada pelas altas taxas de CCS. Os processos de separação, dentre eles a ultrafiltração, podem ser uma alternativa para a melhoria da qualidade do soro, porém, isso não elimina a necessidade dos cuidados higiênicos com a produção, obtenção e processamento do leite utilizado na obtenção do soro, fato que após a publicação da Instrução Normativa nº 51/02 tornou-se necessidade compulsória.

Com a ultrafiltração foi possível obter corrente permeada com reduzida carga proteica, diminuindo a quantidade de sólidos suspensos, permitindo que este soro de queijo possa ser utilizado como meio de cultivo para crescimento de *E. coli* recombinante na produção de PHAs, cuja proposta compõe a segunda parte deste estudo.

Utilizando a ultrafiltração na redução proteica do soro de queijo, obteve-se também uma redução média de 40,28% na DQO, ainda insuficiente para envio a corpos receptores, com DQO final de 40,54 mg·L⁻¹ (±1,03). Segundo Brião e Tavares (2007), a moderada redução na DQO das correntes permeadas de ultrafiltração deve-se à permeação de mais de 70% da lactose presente na corrente de alimentação. Assim, a ultrafiltração não se mostrou uma solução definitiva para o tratamento de rejeitos de queijaria, mas uma opção para a redução da carga orgânica do efluente.

4.1.3 Ensaios de nanofiltração

Conforme descrito no capítulo 3, o soro de queijo tipo minas frescal também foi submetido a tratamento com membrana de nanofiltração. A utilização da nanofiltração teve como objetivo a obtenção de corrente concentrada com teores de lactose superiores a 41,5 g·L⁻¹ (±0,12) (p/v) utilizando soro de queijo sem prévio tratamento, e corrente permeada com teores de lactose inferiores a 10,0 g·L⁻¹ (m/v), permitindo a utilização da corrente concentrada como meio de cultivo para produção de PHAs e corrente permeada com baixa DQO para ser enviada a corpos receptores.

4.1.3.1 Caracterização das membranas de nanofiltração

Após limpeza prévia com água, determinou-se o fluxo permeado de água pura a diferentes pressões. Os ensaios seguiram o mesmo protocolo realizado com a membrana de ultrafiltração e os resultados podem ser observados na **Figura 15**.

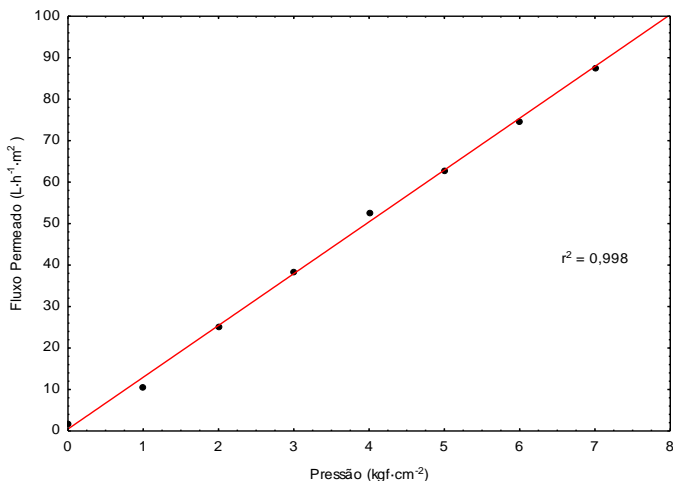


Figura 15 - Fluxo permeado de nanofiltração utilizando água pura em diferentes pressões por período de 10 min.

A **Figura 16** apresenta o comportamento do fluxo permeado com água ao longo de 60 min de nanofiltração em temperatura de 35 °C, vazão de alimentação de 0,489 m³·h⁻¹ e diferentes pressões transmembrana (3, 5 e 7 kgf·cm⁻²).

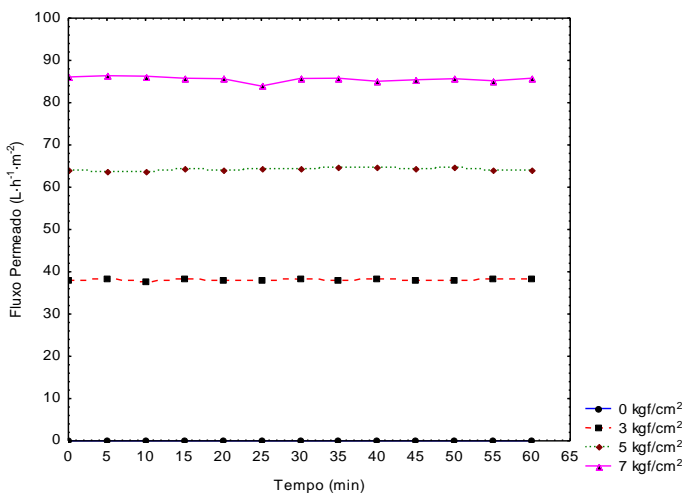


Figura 16 - Fluxo de permeação de água em membrana de nanofiltração.

Observa-se que o fluxo permeado se manteve estável, sem influência da compactação da membrana, comportamento também evidenciado na membrana de ultrafiltração (Figura 11).

4.1.3.2 Avaliação dos parâmetros operacionais da nanofiltração no tratamento do soro

A Tabela 11 apresenta a matriz experimental utilizada nos experimentos de nanofiltração (DCCR 2³) com os valores de fluxo permeado e os percentuais de redução observados nas diferentes condições experimentais testadas nos estudos de nanofiltração com soro.

A Figura 17 ilustra os dados de fluxos obtidos na permeação do soro nas 17 condições experimentais testadas com o delineamento, sendo possível observar a redução de fluxo permeado, identificando os momentos de formação da polarização por concentração (entre 0 a 5 min de operação) e *fouling* (entre 5 e 45 min de operação).

Tabela 11 - Matriz experimental do DCCR 2³ com valores reais para temperatura, pressão e vazão de alimentação. Como resposta: os fluxos permeados (J) e o percentual de redução de fluxo dos ensaios experimentais de nanofiltração do soro.

Ensaio	Temperatura (°C)	Pressão (kgf·cm ⁻²)	Vazão de alimentação (m ³ ·h ⁻¹)	$J_{inicial}$ (L·h ⁻¹ ·m ²)	$J_{tempo\ 5}$ (L·h ⁻¹ ·m ²)	% de		% de		% de	
						redução de $J_{tempo\ 5}$	$J_{60\ min}$ (L·h ⁻¹ ·m ²)	redução de $J_{60\ min}$	J_{final} (L·h ⁻¹ ·m ²)	redução de J_{final}	
1	25	3,0	0,398	1,30	1,30	0,00	0,81	37,50	0,43	66,67	
2	25	3,0	0,580	2,27	1,94	14,29	0,97	57,14	0,43	80,95	
3	25	7,0	0,398	12,15	11,07	8,89	8,91	26,67	1,35	88,89	
4	25	7,0	0,580	20,52	17,60	14,21	16,31	20,53	6,32	69,21	
5	45	3,0	0,398	0,81	0,81	0,00	0,59	26,67	0,38	53,33	
6	45	3,0	0,580	1,08	1,08	0,00	0,59	45,00	0,54	50,00	
7	45	7,0	0,398	14,85	14,31	3,64	12,96	12,73	3,51	76,36	
8	45	7,0	0,580	22,68	18,63	17,86	15,66	30,95	5,94	73,81	
9	18,18	5,0	0,489	12,15	11,50	5,33	10,48	13,78	4,59	62,22	
10	51,82	5,0	0,489	23,76	21,87	7,95	19,98	15,91	7,83	67,05	
11	35	1,63	0,489	1,03	0,92	10,53	0,76	26,32	0,54	47,37	
12	35	8,36	0,489	18,36	15,93	13,24	13,50	26,47	3,13	82,94	
13	35	5,0	0,336	15,12	14,58	3,57	14,04	7,14	3,51	76,79	
14	35	5,0	0,643	12,96	11,34	12,50	10,96	15,42	1,78	86,25	
15	35	5,0	0,489	19,44	17,77	8,61	16,20	16,67	4,05	79,17	
16	35	5,0	0,489	16,90	16,15	4,47	14,85	12,14	4,32	74,44	
17	35	5,0	0,489	21,98	18,09	17,69	15,66	28,75	4,21	80,84	
Média				12,79	11,46	8,40	10,19	24,69	3,11	71,55	
*S (±)				8,39	7,36	5,98	6,77	12,92	2,33	12,40	

*S = Desvio padrão.

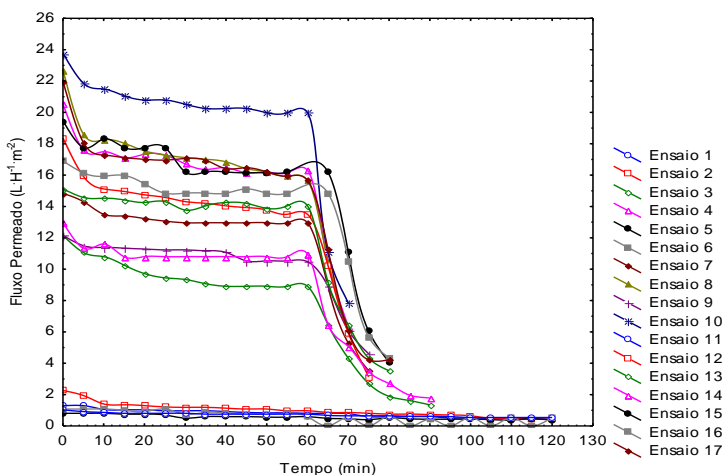


Figura 17 - Fluxos de permeação das condições experimentais determinadas pela matriz do segundo DCCR 2³ - Nanofiltração.

A redução de fluxo permeado em processos de separação observada na Tabela 11 e Figura 17, utilizando-se membranas de nanofiltração, pode ser causada pela adsorção de proteínas, potencializada pelo efeito eletrostático entre as proteínas do soro e a superfície da membrana (MARSHALL; DAUFIN, 1995), criando uma resistência ao fluxo de permeação (RICE *et al.*, 2009).

Observa-se na Figura 17 que após 60 min de operação iniciou-se a concentração do soro de queijo (sem reciclo de permeado), identificando-se uma expressiva queda de fluxo permeado. A queda é justificada pelo aumento da concentração de sólidos na corrente de alimentação, provavelmente aumentando a pressão osmótica da solução e, conseqüentemente, a polarização de concentração de proteínas, resíduos de gordura e lactose na superfície da membrana. Pode também ter ocorrido precipitação de íons cálcio devido à solubilidade ser excedida, formando incrustações nos poros da membrana. Nos derivados lácteos, a presença de fosfato de cálcio é a maior preocupação, devido à supersaturação na fase aquosa do leite e pela solubilidade diminuir com o aumento da temperatura (MARSHALL; DAUFIN, 1995; POULIOT, 1995). A precipitação de sais de cálcio também está relacionada ao pH elevado das soluções, sugerindo, para escalas industriais, a utilização de pH baixo e temperaturas amenas,

evitando a incrustação de fosfatos de cálcio e quedas bruscas no fluxo de permeação (BOERLAGE *et al.*, 1999; LEE; KIM; LEE, 1999).

Rice *et al.* (2009) observaram pequena precipitação de sais de cálcio em nanofiltração de soro de queijo utilizando temperatura de 30 °C e pH 6,9, com menor queda de fluxo do que em operações com temperaturas mais elevadas (50 °C). Essa incrustação se demonstrou difícil de ser removida sem agentes de limpeza química, por formar massas de cristais mais fortemente ligadas à superfície da membrana. Os autores também observaram que temperaturas acima de 30 °C com pH baixo são recomendadas para processos de separação de soro de queijo com membranas de nanofiltração. Segundo os autores, altas temperaturas favorecem a queda inicial de fluxo, porém, a redução da permeação reduz o arraste de solutos em direção à membrana, fazendo com que alguns solutos sejam capazes de se difundir no seio da solução, levando a um aumento do fluxo permeado. Segundo os autores, este fenômeno ocorre exclusivamente em nanofiltração e osmose inversa, em que a capacidade de reter íons contribui fortemente para os efeitos da pressão osmótica.

Butylina, Luque e Nystrom (2006) observaram aumento do fluxo permeado final em membranas de nanofiltração quando submetidas a filtração de soro de queijo com pH 9,5, sugerindo que em pH alcalino possa ocorrer um discreto alargamento dos poros da membrana, aumentando o fluxo de permeação, com pequena alteração em sua seletividade. Cabe salientar que se o presente estudo fosse conduzido em sistema de batelada alimentada e/ou em reator com alimentação contínua, o aumento da pressão osmótica na corrente de alimentação ocorreria a uma menor taxa e provavelmente não seria detectada a queda acentuada de fluxo observada na após os 60 min de filtração.

Para avaliar a influência da temperatura, pressão e vazão de alimentação na manutenção fluxo permeado final, utilizou-se a análise de variância (ANOVA), cujo resultado pode ser observado na Tabela 12.

Tabela 12 - Análise de variância (ANOVA). Fluxo permeado final dos ensaios experimentais de nanofiltração (DCCR 2³). Sendo L: linear e Q: quadrática.

Variáveis	SS	GL	MS	F_{calc}	p -valor
Temperatura (L)	21.2190	1	21.2190	7.3880	0.0299
Temperatura (Q)	1.4796	1	1.4796	0.5152	0.4961
Pressão (L)	60.1856	1	60.1856	20.956	0.0026
Pressão (Q)	7.3958	1	7.3958	2.5750	0.1526
Vazão de Alimentação (L)	3.2136	1	3.2136	1.1189	0.3253
Vazão de Alimentação (Q)	0.3202	1	0.3202	0.1115	0.7482
Interação variável 1 e 2 (L)	25.9200	1	25.9200	9.0248	0.0198
Interação variável 1 e 3 (L)	12.1032	1	12.1032	4.2141	0.0792
Interação variável 2 e 3 (L)	4.1472	1	4.1472	1.4440	0.2686
Erro puro	20.1045	7	2.8721		
Total	154.4870	16			

A influência das variáveis no fluxo permeado final também é ilustrada no gráfico de Pareto da Figura 18.

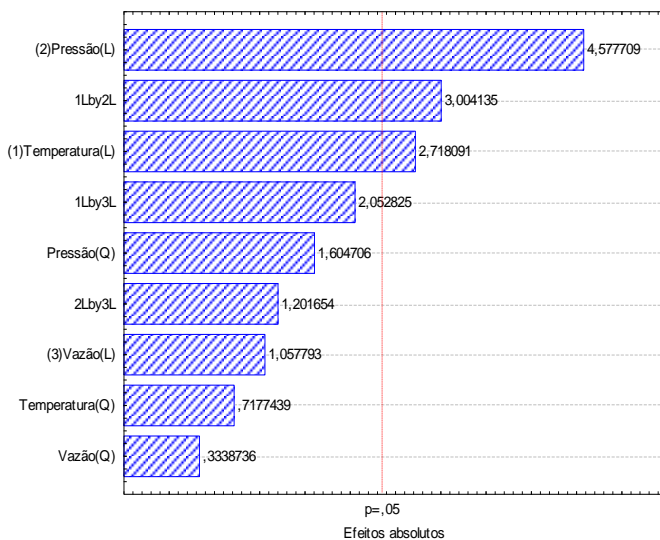


Figura 18 - Gráfico de Pareto dos efeitos absolutos das variáveis no fluxo permeado de nanofiltração.

O efeito da temperatura na manutenção do fluxo final observado na Tabela 12 e Figura 18 é devido à redução da viscosidade do soro de queijo. Altas temperaturas reduzem a viscosidade do soro, neutralizando parcialmente a queda de fluxo causada pelo efeito da insolubilização e incrustação dos sais de cálcio. Porém, ressalta-se que temperaturas entre 10 e 50 °C favorecem atividades microbianas durante a filtração (RICE *et al.*, 2009).

Román *et al.* (2011), em estudos com soro de queijo, constataram também relação linear entre o aumento da pressão transmembrana utilizada como força motriz e o fluxo permeado até 20 kgf·cm⁻² de pressão em algumas faixas de temperatura. Os autores obtiveram seus melhores resultados de fluxo permeado em temperaturas de 40 °C, pressão de 20 kgf·cm⁻² e vazão de alimentação de 700 L·h⁻¹, validando a influência significativa da pressão transmembrana no aumento de fluxo permeado, fato confirmado neste estudo pela análise de variância (**Tabela 12**) e gráfico de Pareto (**Figura 18**). Os autores observaram que o aumento da pressão osmótica da corrente de alimentação devido à concentração de sólidos até FC= 4, aliado à colmatação da membrana, fez com que em 12 horas de nanofiltração o fluxo permeado se reduzisse a zero, inviabilizando o processo de separação após este período. Desta forma, sugere-se que a nanofiltração seja utilizada para concentração de lactose e proteínas do soro de queijo até FC= 3, utilizando pressões de até 20 kgf·cm⁻².

4.1.3.3 Caracterização físico-química das correntes obtidas na nanofiltração do soro

Observou-se que a redução média de 59,63% na concentração de sólidos solúveis (°Brix) na corrente permeada e a retenção de componentes orgânicos pela membrana, reduziu a DQO da corrente permeada em até 88,06% ($\pm 2,34$) com DQO final de 7,66 mg·L⁻¹ ($\pm 1,5$). Mesmo com DQO acima do limite tolerável para o envio a corpos receptores, o permeado do soro de queijo após a nanofiltração apresentou redução média de 77% ($\pm 0,08$) em sua composição proteica e 0,68% ($\pm 0,15$) de lactose.

O objetivo da utilização da nanofiltração no presente estudo foi concentrar a fração de lactose, obtendo uma corrente permeada com o menor percentual de sólidos possível e com baixa DQO. Desta forma, a Tabela 13 apresenta os valores percentuais dos componentes sólidos das correntes de alimentação, permeadas e concentradas, obtidas nos ensaios de nanofiltração do soro.

Observa-se, na Tabela 13 que nas pressões 7 e 8,37 kgf·cm², operando em baixas temperaturas (25 e 35 °C, respectivamente) obtiveram-se as menores taxas de permeação de lactose, provavelmente influenciadas pela polarização de concentração próxima aos poros da membrana. O aumento da pressão transmembrana favorece o transporte de solutos do seio da solução em direção à superfície da membrana, aumentando a camada polarizada e, conseqüentemente, diminuindo o fluxo permeado e a permeação de alguns compostos que seriam permeados, como é o caso da lactose (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006), pois a membrana de nanofiltração utilizada no estudo apresenta massa molar de corte médio entre 150 a 300 g·mol⁻¹, muito próximo à massa das moléculas de lactose (342,3 g·mol⁻¹).

Tabela 13 - Percentual (m/v) de sólidos totais, proteína e lactose das correntes de alimentação, concentrada e permeada obtidas por nanofiltração do soro.

Ensaio Experimentais	Corrente de alimentação			Corrente concentrada			Corrente permeada		
	(%) Sólidos Totais	(%) Proteínas	(%) Lactose	(%) Sólidos Totais	(%) Proteínas	(%) Lactose	(%) Sólidos Totais	(%) Proteínas	(%) Lactose
1	5,98	0,88	4,36	5,05	0,69	3,87	2,90	0,41	2,41
2	5,31	0,75	4,21	4,90	0,70	3,82	0,66	0,15	0,69
3	5,59	0,85	4,32	11,07	1,94	7,86	0,26	0,16	1,38
4	4,81	0,67	3,79	10,32	0,49	7,91	0,00	0,20	0,17
5	5,99	0,94	4,43	6,37	1,02	4,54	1,05	0,13	1,42
6	5,82	0,82	4,39	6,55	0,97	4,63	0,17	0,11	1,03
7	5,64	0,67	4,47	11,30	1,60	8,01	0,43	0,17	1,78
8	5,76	0,84	4,55	10,47	1,60	7,44	0,40	0,18	1,71
9	5,52	0,75	4,27	8,16	1,16	6,10	0,12	0,20	0,95
10	5,86	0,82	4,52	11,13	1,96	7,61	1,02	0,15	3,27
11	5,62	0,74	4,24	4,43	0,67	3,37	0,32	0,12	1,55
12	5,09	0,72	4,15	10,91	1,52	8,08	0,02	0,22	0,68
13	5,63	0,77	4,36	8,42	1,23	6,28	0,28	0,16	1,39
14	5,74	0,77	4,34	9,15	1,36	6,68	0,42	0,18	1,72
15	6,27	0,82	4,74	8,42	1,23	6,34	0,28	0,16	1,35
16	5,75	0,77	4,40	7,99	1,12	6,06	0,17	0,16	1,09
17	5,64	0,76	4,31	8,86	1,29	6,57	0,29	0,15	1,40
Média	5,65	0,78	4,34	8,44	1,21	6,19	0,52	0,18	1,41
S (±)	0,34	0,07	0,20	2,31	0,43	1,60	0,68	0,07	0,70

Na determinação do tamanho médio de poro da membrana, deseja-se que, no mínimo, 95% dos poros apresentem diâmetros abaixo do ponto molar de corte estabelecido, permitindo a permeação de parte dos componentes que se deseja rejeitar. Fatores como temperatura e pressão podem causar deformação nas moléculas de proteínas alterando sua forma e capacidade de interação com a membrana, facilitando a permeação e/ou gerando micelas que bloqueiam os poros, reduzindo o fluxo permeado (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006).

A Tabela 14 mostra a relação proteína/lactose e os dados referentes à relação proteína/lactose apresentaram amplitude de até 356,06%, ou seja, o coeficiente de rejeição da membrana de nanofiltração para as frações de proteína e lactose foi influenciado diretamente pela alteração da pressão, vazão de alimentação e temperatura. Porém, devido a essa influência não ser linear, não se constatou influência estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Tabela 15 apresenta o coeficiente de rejeição das diversas correntes de alimentação, permeadas e concentradas, do estudo.

Tabela 14 - Relação proteína/lactose das correntes de alimentação, permeada e concentrada. Percentual de redução da relação proteína/lactose calculados pela Equação 4.

Ensaios Experimentais	$R_{P/L}$ (Alim.)	$R_{P/L}$ (Conc.)	$R_{P/L}$ (Perm.)	% Variação $R_{P/L}$ (Conc.)	% Variação $R_{P/L}$ (Perm.)
1	0,20	0,38	0,17	89,48	84,29
2	0,18	0,18	0,22	2,86	122,03
3	0,20	0,25	0,12	25,44	58,93
4	0,19	0,19	0,71	3,51	381,35
5	0,21	0,22	0,09	5,88	43,15
6	0,19	0,21	0,11	12,16	57,17
7	0,15	0,20	0,10	33,27	63,72
8	0,18	0,22	0,11	16,49	57,02
9	0,18	0,19	0,21	8,27	119,86
10	0,18	0,26	0,05	41,97	25,29
11	0,17	0,20	0,08	13,91	44,36
12	0,17	0,19	0,32	8,43	186,48
13	0,18	0,20	0,12	10,90	65,18
14	0,18	0,20	0,10	14,75	58,99
15	0,17	0,19	0,12	12,15	68,51
16	0,18	0,18	0,15	5,61	83,88

17	0,18	0,20	0,11	11,35	60,76
Média	0,18	0,22	0,17	18,61	93,00
S (\pm)	0,01	0,05	0,15	21,04	83,37

Os dados referentes à relação proteína/lactose apresentaram amplitude de até 356,06%, ou seja, o coeficiente de rejeição da membrana de nanofiltração para as frações de proteína e lactose foi influenciado diretamente pela alteração da pressão, vazão de alimentação e temperatura. Porém, devido a essa influência não ser linear, não se constatou influência estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Tabela 15 - Coeficientes de rejeição (CR) de sólidos totais, proteínas e lactose presentes no soro utilizando membrana de nanofiltração.

Ensaio Experimental	CR (Sólidos Totais)	CR (Proteínas)	CR (Lactose)
1	0,52	0,53	0,45
2	0,88	0,80	0,84
3	0,95	0,81	0,68
4	0,99	0,70	0,96
5	0,82	0,86	0,68
6	0,97	0,87	0,77
7	0,92	0,75	0,60
8	0,93	0,79	0,62
9	0,98	0,73	0,78
10	0,83	0,82	0,28
11	0,94	0,84	0,63
12	0,99	0,69	0,84
13	0,95	0,79	0,68
14	0,93	0,77	0,60
15	0,96	0,80	0,72
16	0,97	0,79	0,75
17	0,95	0,80	0,68
Média	0,91	0,77	0,68
S (\pm)	0,11	0,08	0,15

Comportamentos não lineares geram erros experimentais estatisticamente altos, não sendo possível detectar linearidade nos comportamentos das variáveis independentes, que no caso do

experimento eram temperatura, pressão e vazão de alimentação. Salienta-se que esse fato não inviabiliza a análise dos resultados individuais de cada ensaio experimental realizado no delineamento proposto (DCCR 2³).

A membrana de nanofiltração reteve integralmente as células somáticas (CCS) presentes na corrente de alimentação apresentando um coeficiente de rejeição médio igual a 1,0. Não foi possível obter uma condição otimizada de processo para os coeficientes de rejeição da membrana de nanofiltração em relação aos teores dos demais componentes sólidos (sólidos totais, proteínas e lactose). A influência de diversos fatores como temperatura, viscosidade, interações com a membrana, deformação das moléculas presentes e a colmatção da membrana dificultam a obtenção de uma condição operacional ideal para a nanofiltração do soro de queijo. A condição operacional ideal de cada variável estudada se apresentou dependente das demais.

Com base nos resultados experimentais, observa-se: que o melhor resultado de fluxo permeado final estabilizado foi obtido em temperatura de 45 °C, pressão de 7 kgf·cm⁻² e vazão de alimentação de 0,580 m³·h⁻¹ (ensaio 8 da Tabela 11); que menores temperaturas geraram percentuais maiores de queda de fluxo e que o ensaio que concentrou o maior percentual de lactose utilizou o maior valor de pressão do estudo, 8,39 kgf·cm⁻².

Desta forma, a nanofiltração também não se mostrou uma solução definitiva para o tratamento de rejeitos de queijaria, mas uma opção para a redução de 88,06% ($\pm 2,34$) de sua DQO e uma alternativa para a concentração dos compostos sólidos presentes no soro de queijo, concentrando lactose até 80,8 g·L⁻¹. Salienta-se que Brião e Tavares (2007), em estudos com soro de queijo, obtiveram redução de 75,56% na DQO utilizando membranas com tamanho médio de poro de 5.000 a 8.000 g·mol⁻¹. Os autores também observaram que a presença de proteína nas paredes internas dos poros da membrana reteve aproximadamente 30% da lactose presente, mesmo com massa molar inferior ao tamanho do poro da membrana.

4.1.4 Limpeza do módulo de ultrafiltração e nanofiltração

Quando o fluxo permeado atinge um limite inviável sob o ponto de vista operacional, é necessária a reversão da redução de fluxo através de limpeza *CIP*, o que em ultrafiltração com soro de queijo ocorre em poucas horas de permeação.

Para a limpeza *CIP* da unidade de ultrafiltração utilizou-se o protocolo sugerido por Kazemimoghdam e Mohammadi (2007), com modificação na redução da concentração da solução ácida para $0,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. O módulo de membranas foi limpo com água destilada e soluções alcalina e ácida. Diversas condições foram testadas até a obtenção de um protocolo aceitável.

Durante os procedimentos de limpeza, dificuldades de retorno de fluxo eram constantes. As prováveis formações de micelas de proteínas causadas pelas altas temperaturas de ultrafiltração, a provável cristalização dos sais de cálcio presentes no soro de queijo e as restrições técnicas da membrana (pH entre 2 e 9, temperatura até $55 \text{ }^\circ\text{C}$ e pressão de até $4 \text{ kgf}\cdot\text{cm}^{-2}$) dificultaram o processo de limpeza.

A **Figura 19** ilustra o retorno de fluxo obtido durante a limpeza *CIP* na membrana de ultrafiltração após a concentração do soro. Com o protocolo utilizado, não se obteve retorno total de fluxo permeado, fato justificado pela provável presença do *fouling* por bloqueio interno.

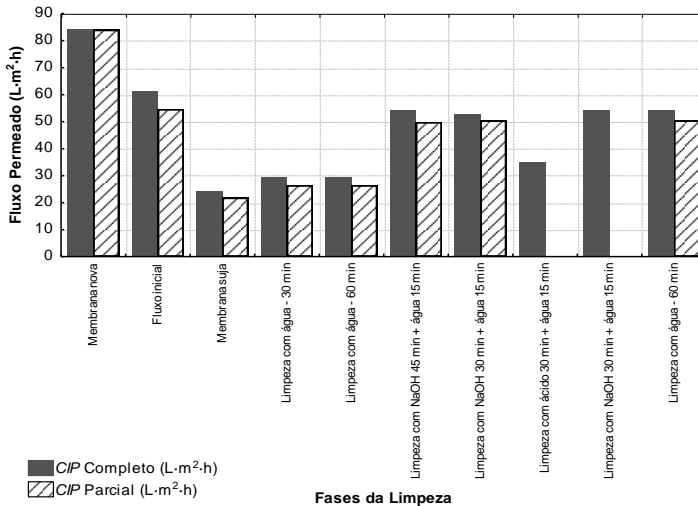


Figura 19 - Retorno de fluxo permeado através do processo de limpeza *CIP* da membrana de ultrafiltração. As colunas escuras mostram os resultados de fluxo permeado obtidos com sistema *CIP*, utilizando limpeza alcalina e ácida e as colunas vazadas mostram os resultados obtidos sem a utilização da limpeza ácida.

O processo de limpeza *CIP* sugerido para produtos de origem animal com presença de compostos orgânicos (proteínas e gordura) e inorgânicos (sais) deve ser precedido com um enxágue com água até a

obtenção de fluxo estável, momento em que ocorre a remoção parcial das resistências, seguido de lavagem alcalina para saponificação da gordura e remoção das proteínas, neutralização com água, lavagem ácida para a remoção das incrustações e enxágue final para neutralização do pH e remoção de resíduos químicos.

Como alternativa, testou-se no processo *CIP* a necessidade da lavagem ácida citada no protocolo de limpeza sugerido por Kazemimoghadam e Mohammadi (2007). Foram realizadas leituras de fluxo antes e após a limpeza ácida com ácido nítrico na concentração de $0,03 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (pH 3,0). Os ensaios foram realizados em triplicata.

A membrana de ultrafiltração, após ser utilizada para concentração do soro de queijo, apresentou fluxo médio final estabilizado de $21,4 \text{ m}^3\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^2$, redução de 71,42% em relação ao fluxo inicial. Após enxágue com água houve remoção da resistência ao fluxo de permeado, calculado com a Equação 7, de 9 %.

Um segundo enxágue com água não apresentou aumento na remoção das resistências em relação a um único enxágue de 30 min. Dupla limpeza alcalina também não apresentou diferenças no retorno de fluxo permeado em relação à limpeza alcalina única utilizando tempos de exposição de 15 min. Na Figura 19 observa-se que a limpeza ácida não alterou o percentual de recuperação de fluxo permeado em relação ao protocolo *CIP* sem limpeza ácida.

Com base nos resultados obtidos nestes experimentos, definiu-se como protocolo padrão para limpeza *CIP* do módulo de membranas da unidade de ultrafiltração mostrado na Figura 5, quando utilizado o soro de queijo, a seguinte sequência:

- enxágue com água sem reciclo durante 30 min;
- circulação com solução de NaOH (1%) (volume de 3 litros) durante 45 min em pressão de $1 \text{ kgf}\cdot\text{cm}^{-2}$, temperatura de $45 \text{ }^\circ\text{C}$ e vazão de alimentação de $0,580 \text{ m}^3\cdot\text{h}^{-1}$; e
- enxágue com água pura sem reciclo por 15 min e/ou até neutralização de pH (7,0).

Nova limpeza alcalina e eventual limpeza ácida eram realizadas somente quando não se obtinha retorno total de fluxo após o *CIP* sugerido.

Para limpeza da membrana de nanofiltração também foi utilizada somente limpeza alcalina, como sugerido por Román *et al.* (2011). Os autores utilizaram para a limpeza *CIP* do módulo de nanofiltração, pré-enxágue com água de torneira adicionada de solução

de NaOH (0,2%) durante 3 horas de exposição a temperatura de 40 °C, e enxágue final com água destilada. Com o protocolo sugerido pelos autores, obteve-se retorno total de fluxo permeado na membrana de nanofiltração.

4.2 APROVEITAMENTO DO SORO TRATADO POR PROCESSOS DE SEPARAÇÃO COM MEMBRANAS NA PRODUÇÃO DE PHAs

Nesta seção é avaliado o potencial de aplicação de permeados obtidos por ultra e nanofiltração do soro como meio de cultivo para a produção de PHAs por *E. coli* recombinante, propondo um destino biotecnológico aos componentes residuais do rejeito.

Cabe salientar que a utilização de linhagens selvagens como a *C. necator* não foi avaliada neste estudo devido às dificuldades na realização da limitação nutricional necessária, face à composição do soro de queijo. A produção de PHAs em linhagens selvagens é classicamente induzida por limitação de nutrientes tais como fósforo, nitrogênio, enxofre, dentre outros.

Conforme apresentado na seção anterior, os permeados obtidos neste estudo apresentam teores relativamente elevados de fósforo e nitrogênio, além da lactose (substrato carbônico desejável). Assim, o uso de linhagens de *E. coli* recombinante é adequado neste estudo, uma vez que não necessita de indução por limitação de nutrientes. Ao contrário, essas linhagens são capazes do acúmulo de biopolímero paralelamente ao seu crescimento. Portanto, para atender aos objetivos deste estudo, foram realizadas transformações bacterianas, ou seja, a inserção de um plasmídeo contendo os genes necessários à produção de enzimas do metabolismo de biossíntese de PHAs em linhagens de *E. coli*. As linhagens selecionadas para o estudo foram JM 101 e ATCC 25922, ambas com características adequadas a estudos de engenharia genética, dentre elas a capacidade de receber genes heterólogos, não sendo inibidas por estes. Os resultados destes ensaios são apresentados e discutidos a seguir.

4.2.1 Obtenção de células recombinantes (transformação) e características relevantes

Realizaram-se atividades de transformação bacteriana em ambas as linhagens utilizadas no estudo. A **Figura 20** mostra a placa de Petri com colônias de *E. coli* recombinante ATCC 25922 ancorando plasmídeo pRLC2, obtidas por técnicas de engenharia genética (DNA

recombinante), procedimento também realizado com a linhagem JM 101.

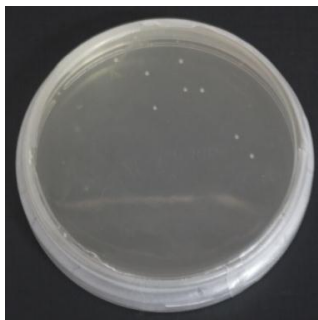


Figura 20 - Células recombinantes de *E. coli* ATCC 25922 ancorando plasmídeo pRLC2 obtidas por técnicas de DNA recombinante.

Observa-se na **Figura 20** a presença de oito colônias de *E. coli* recombinante ATCC 25922 (pRLC2), que foram inoculadas e incubadas em meio LB acrescido de ampicilina ($100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). Essas colônias são resultado da transformação de 4,5 mL de caldo de cultivo composto por meio LB e células de *E. coli* com $\text{OD} \pm 0,6$ (540 nm), o que equivale à quantidade aproximada de $27 \times 10^8 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ (WONG *et al.*, 2006), eficiência aproximada de 1 recombinante em cada $3,38 \times 10^8 \text{ UFC}$, ou 1,6 recombinantes para cada μL de DNA plasmidial, suficiente para realização do presente estudo.

O plasmídeo pRLC2, inserido nas linhagens de *E. coli* JM 101 e ATCC 25922, possui o gene codificante da enzima PHA sintase de *C. violaceum* (*phaC_{cv}*) e os genes para as enzimas β -cetotiolase (*phbA*) e acetoacetil-CoA redutase (*phbB*) do operon de *C. necator*, necessárias à biossíntese de PHAs.

4.2.2 Avaliação de cultivo da *E. coli* recombinante linhagem JM 101

4.2.2.1 Cultivos em meio mineral com lactose monohidratada

Neste estudo, a linhagem recombinante de *E. coli* JM 101 ancorando o plasmídeo pRLC2 apresentou crescimento celular em meio mineral suplementado com lactose monohidratada de, no máximo, $0,11 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (acúmulo de 5,93% de P(3HB)), produção equivalente à obtida por Araújo (2005) utilizando *E. coli* recombinante linhagem JM 101 (pBHR68) em meio LB, suplementado com ácido propiônico, ácido

acético e glicose. Em seu estudo, a autora obteve $0,10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de MCS quando adicionado azeite de oliva ao meio de cultivo, e $0,13 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de MCS quando suplementado com ácido itacônico.

Fonseca (2003), em seus estudos com a linhagem recombinante JM 101 ancorando o plasmídeo pBHR71, que continha os genes codificantes da PHA sintase de *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando soro de queijo homogeneizado e esterilizado como substrato, obteve $0,06 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de MCS com 0,52% de acúmulo intracelular de biopolímero. Esses dados demonstram que a linhagem recombinante JM 101 (pRLC2) apresentou, neste estudo, produção celular compatível com dados presentes na literatura. Em seus estudos, Fonseca (2003) obteve até $1,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de MCS com 39,47% de acúmulo intracelular de PHAs quando utilizou amido de milho hidrolisado suplementado com soro de queijo. Neste caso, o amido de milho hidrolisado foi utilizado como fonte de carbono e a lactose presente no soro de queijo como indutor de expressão gênica. Estes dados demonstram a baixa produção de MCS da linhagem JM 101 em presença de dissacarídeos como única fonte de carbono.

A baixa produção da linhagem JM 101 observada neste estudo e também citada por Fonseca (2003) e Araújo (2005), deve-se ao fato de que, mesmo possuindo o operon *Lac* com os genes “*i*, *z*, *y*, *a*” (Figura 21), codificadores da proteína repressora *LacI* (repressor) e das enzimas β -galactosidase, lactose permease e da β -galactosidase transacetilase, respectivamente, a linhagem JM 101 não demonstrou capacidade de hidrolizar a lactose.

A linhagem JM 101 possui o genoma *i+z-y+a+*, não sendo capaz de codificar de forma eficiente a enzima β -galactosidase. O gene *i+* codifica o repressor que se liga ao sítio operador (Figura 21) quando a lactose não está presente no meio, sendo assim, em presença de lactose, esta se liga à proteína repressora *LacI*, liberando a transcrição e promovendo a regulação negativa da expressão do gene (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995). Porém, a presença do gene *z-* em seu genoma, impede a linhagem JM 101 de hidrolizar a lactose e, conseqüentemente, de utilizá-la como única fonte de carbono, mas somente como indutor de expressão gênica.

Quando a glicose é utilizada como fonte principal de carbono, o gene i^+ do operon *Lac* da bactéria codifica a proteína repressora *LacI* que também se liga ao sítio operador do *operon* do plasmídeo, evitando a transcrição e consequentemente a produção de PHAs, sendo necessário adicionar lactose ou IPTG para liberar a transcrição mediada pelo promotor *LacI* do vetor, como pode-se observar na Figura 21, extraída de Lehninger, Nelson e Cox (1995).

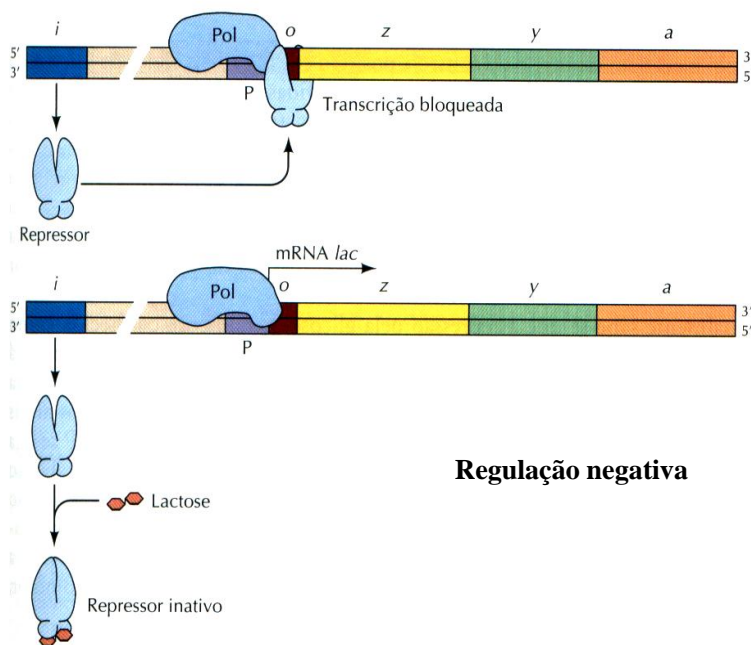


Figura 21 - Regulação negativa. Ligação da lactose à proteína repressora *LacI*, permitindo a livre passagem da DNA polimerase e a transcrição dos genes (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

Salienta-se que normalmente os mutantes constitutivos possuem genótipo $i^-z^+y^+a^+$ e os selvagens $i^+z^+y^+a^+$, não sendo necessária a adição de lactose ou IPTG em micro-organismos mutantes, com exceção dos que possuem expressão aumentada da proteína repressora *LacI*, como é o caso da *E. coli* linhagem JM 101.

O indutor de expressão gênica IPTG, além do custo elevado (US\$ 55,10·g⁻¹, conforme SIGMA-ALDRICH, 2012), pode induzir a hipersensibilidade do micro-organismo causando heterogeneidade transcricional em nível celular (KANG; WANG; ZHANG, 2008).

O estudo não descarta a utilização da linhagem JM 101 no aproveitamento biotecnológico da lactose residual do soro de queijo, e sim sugere a necessidade de hidrólise prévia, para que esta linhagem de *E. coli* utilize as frações de glicose e galactose como fonte de carbono de forma mais eficaz, não somente na indução de expressão gênica.

Fonseca (2003), utilizando a linhagem de *E. coli* JM 101 ancorando o plasmídeo pBHR68, obteve 0,48 g·L⁻¹ de MCS com 3,04% de acúmulo intracelular de PHAs utilizando apenas soro de queijo como meio de cultivo, sugerindo que o soro possui, em sua composição, compostos que fornecem condições nutricionais e de crescimento para a *E. coli* linhagem JM 101. Dessa forma, estudos foram realizados para avaliar seu crescimento utilizando soro de queijo como meio de cultivo.

4.2.2.2 Cultivos em soro de queijo

A Tabela 16 apresenta os resultados de produção de MCS (g·L⁻¹) e percentual de acúmulo intracelular de PHAs em *E. coli* recombinante linhagem JM 101 incubada por período de 24 horas a 37 °C e agitação de 200 rpm, utilizando diferentes meios de cultivo, dentre eles o soro de queijo. O estudo avaliou o desempenho de crescimento da linhagem recombinante JM 101 em soro de queijo *in natura* pasteurizado, tratado por ultra e nanofiltração e em meio mineral suplementado com concentrado de soro. Para obtenção dos permeados e/ou concentrados utilizados nos experimentos apresentados na Tabela 16, utilizou-se as condições experimentais que apresentaram melhores fluxos permeados finais até FC= 3, determinados pelos delineamentos experimentais (DCCR 2³). Para ultrafiltração utilizou-se as condições do ensaio 8 da Tabela 5 e para nanofiltração as condições do ensaio 10 da Tabela 11. O soro, além da lactose, possui outras fontes de carbono como proteínas e ácido láctico.

Tabela 16 - Produção de MCS ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e percentual de acúmulo intracelular de PHAs em *E. coli* recombinante linhagem JM 101.

Meio de cultivo	MCS ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Acúmulo de PHAs (%)
Soro de queijo esterilizado em autoclave 121 °C/15 min	1,27 \pm 0,37	5,58
Permeado do soro ultrafiltrado e concentrado por nanofiltração até FC=3	2,03 \pm 0,29	11,01
Permeado do soro ultrafiltrado	2,06 \pm 0,66	2,01
Permeado do soro nanofiltrado e esterilizado em autoclave 121 °C/15 min	0,34 \pm 0,03	2,63
Permeado do soro nanofiltrado, suplementado com lactose monohidratada ($40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)	0,73 \pm 0,04	1,78
Meio mineral suplementado com soro concentrado por nanofiltração até FC=3 ($76 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de lactose)	1,59 \pm 0,21	4,70

Concentração de lactose: Soro de queijo: $42 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
 Permeado de soro ultrafiltrado: $35 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
 Concentrado de soro nanofiltrado: $76 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
 Permeado de soro nanofiltrado: $33 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

Observa-se na Tabela 16, que o permeado do soro de queijo obtido por ultrafiltração e concentrado por nanofiltração até FC= 3, se apresentou eficiente como meio de cultivo e/ou na suplementação de meio mineral para produção de MCS em *E. coli* recombinante linhagem JM 101 e no acúmulo intracelular de biopolímero.

A nanofiltração utilizada na obtenção do permeado do soro, permite concentrar compostos com massas molares acima de $300 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, retendo parcialmente as proteínas, lactose e minerais, tornando o soro concentrado meio de cultivo nutritivo para crescimento de *E. coli* recombinante, com teores de lactose de até $81 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

A produção de MCS obtida com concentrado do soro nanofiltrado foi significativamente ($p < 0,05$) maior que a produção obtida em cultivos utilizando meio mineral suplementado com lactose monohidratada, apresentando percentual médio de acúmulo de 11,01% ($\pm 0,60$) de PHAs. Esse resultado mostra a possível viabilidade da utilização do soro de queijo para produção de MCS e acúmulo intracelular de PHAs.

Salienta-se que, das duas linhagens testadas nas atividades experimentais do presente estudo, somente a linhagem JM 101 apresenta

dependência comprovada do promotor *Lac* do vetor (BRESSAN, 2007), devido à sua expressão repressora ser aumentada. A linhagem ATCC 25922 não necessita de indução gênica. Desta forma, a lactose presente no soro é, além de uma rica fonte de carbono, um indutor de expressão gênica para a linhagem JM 101.

4.2.3 Avaliação de cultivo da *E. coli* recombinante linhagem ATCC 25922

A linhagem nativa de *E. coli* ATCC 25922 foi inicialmente testada quanto à capacidade de crescer em meio LB (KANG; WANG; ZHANG, 2008) e meio mineral M9 utilizando lactose monohidratada ($40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) como única fonte de carbono, característica desejada para se atingir um dos objetivos do estudo. Após transformada, a linhagem recombinante foi cultivada em meio LB, soro de queijo e permeado do soro de queijo obtido por ultrafiltração até $\text{FC} = 3$.

4.2.3.1 Cultivos em meio mineral com lactose monohidratada

Na **Figura 22** pode-se visualizar os frascos de *Erlenmeyer* com meio de cultivo turvo após 24 horas de incubação, resultado do crescimento da *E. coli* ATCC 25922. Inoculou-se a bactéria nativa em meio mineral M9 suplementado com lactose monohidratada e glicose, com e sem a presença de ampicilina ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Os ensaios foram realizados para avaliar o crescimento da linhagem nativa ATCC 25922 em lactose como única fonte de carbono e sua resistência ao antimicrobiano (ampicilina $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).



Figura 22 - Resultado de cultivo da *E. coli* ATCC 25922 em meio mineral M9 com lactose monohidratada e glicose, com e sem a presença de ampicilina ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), conforme segue: (A) M9+lactose+amp, (B) M9+lactose, (C) M9+glicose+amp e (D) M9+glicose.

O cultivo mostrado na **Figura 22** foi realizado por período de 24 horas a 37 °C em agitação orbital de 200 rpm utilizando concentração final de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ampicilina. O limite de 24 horas para os referidos cultivos objetivou o controle efetivo de crescimento de células nativas, pois Fonseca (2003), em estudos com *E. coli* recombinante DH10B e JM 101, observou significativa diminuição da concentração de antimicrobiano (ampicilina 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) no meio de cultivo após 48 horas de incubação, o que permitiu o crescimento de colônias satélites sem plasmídeo.

Observa-se que a linhagem ATCC 25922 cultivada nos frascos de *Erlenmeyer* A e C não apresentou crescimento em meio mineral M9 em presença de ampicilina (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) por não possuir genes de resistência ao antimicrobiano. Fass e Barnishan (1979), em estudos para determinação da concentração inibitória mínima de antibióticos em isolados de *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853, testaram 34 antimicrobianos e determinaram que, para a linhagem ATCC 25922, 4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ seriam suficientes para inibir o crescimento visível do micro-organismo em períodos de até 20 horas de cultivo.

Depois de constatado empiricamente que a linhagem ATCC 25922 apresentava os genes da β -galactosidase, da lactose permease e da β -galactosidase transacetilase, que juntos permitem que a bactéria utilize dissacarídeos, como é o caso da lactose, como fonte de carbono, submeteu-se o isolado à preparação de células competentes, transformação, seleção e posterior utilização em cultivo com meio LB adicionado de ampicilina, sendo alguns cultivos realizados com adição de ácido propiônico, IPTG ou glicose.

Os resultados obtidos nos referidos cultivos avaliaram o potencial de crescimento e produção de PHAs da linhagem recombinante em meio LB, a necessidade de IPTG como indutor de expressão gênica e a capacidade de incorporar o co-polímero P(3HB-co-3HV) em presença de ácido propiônico. Os cultivos foram conduzidos em frascos de *Erlenmeyer* e os melhores resultados são apresentados na **Tabela 17**.

Tabela 17 - Cultivos de *E. coli* recombinante ATCC 25922 (pRLC2) cultivada em meio LB. Resultados de MCS ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), PHAs (%) e PHV (%) presente no biopolímero.

Meio de cultivo utilizado	MCS ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	PHAs (%)	HV (%) no PHAs
LB + amp**	1,62 \pm 0,09	0,58	-
LB + amp** + glicose***	2,39 \pm 0,11	2,03	-
LB + amp** + glicose*** + IPTG	2,34 \pm 0,07	1,91	-
LB + amp** + IPTG	1,56 \pm 0,04	0,59	-
LB + amp** + ácido propiônico	1,83 \pm 0,06	0,35	27,13

* 24 horas de cultivo, agitação de 200 rpm a 37 °C.

** amp: ampicilina ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

*** glicose: $10 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

p.s. os resultados dos cultivos utilizando lactose como única fonte de carbono foram conduzidos em frasco de Duran com aeração forçada.

Observa-se que a adição de IPTG não gerou aumento da MCS e/ou incorporação de PHAs na linhagem recombinante ATCC 25922 por não possuir expressão aumentada do gene repressor *LacI*, não necessitando de indução de expressão gênica para transcrição dos genes presentes no plasmídeo pRLC2 como ocorre com a linhagem JM 101, também utilizada neste estudo. Os dados apresentados na Tabela 17 demonstram que a linhagem recombinante ATCC 25922 possui genótipo *i-z+y+a+*.

Observa-se na Tabela 17 a baixa produção de PHAs da linhagem ATCC 25922, mesmo sob agitação de 200 rpm. Estima-se que a limitação de oxigênio dissolvido seja uma das principais causas da baixa produção celular (MCS).

A bactéria *E. coli* acumula biopolímero desde o início da fase de crescimento sem necessitar de restrição nutricional. Park, Park e Lee (2002) sugerem, para experimentos desta natureza, saturação de oxigênio em 30% e controle de pH durante o cultivo ($\pm 6,9$).

Observa-se também que em presença de ácido propiônico (10 mM), a *E. coli* recombinante ATCC 25922 (pRLC2) produziu o copolímero P(3HB-*co*-3HV) com 27,13% de valerato.

Carminatti (2008), em estudos com *C. violaceum*, obteve co-polímero P(3HB-*co*-3HV) utilizando somente glicose como fonte de carbono. O autor obteve em seus estudos incorporação de PHAs com até 15,4% de valerato. Lee (1996) e Viegas (2005) afirmam que a *E. coli*, mesmo com PHA sintase específica, não utiliza o ácido propiônico de forma eficiente para a produção de PHAs, pois a composição do monômero produzido é dependente do micro-organismo produtor, de

seu substrato e da especificidade da sintase presente na via de biossíntese (PARK; LEE, 2004)

Em estudos com *E. coli* recombinante, Choi e Lee (2000) observaram que a taxa de absorção do ácido propiônico pela bactéria é diferente da taxa de absorção da glicose, interferindo diretamente na eficiência de produção de PHAs. Para compensar a baixa eficiência, os autores utilizaram batelada alimentada suplementada com ácido propiônico somente após a exaustão da glicose. Também observaram queda significativa da produção de PHAs quando a concentração de ácido propiônico foi alterada de 5 mM para 10 mM.

Segundo Steinbüchel e Eversloh (2003), o ácido propiônico é um precursor de valerato, o qual é empregado na biossíntese de P(3HB-*co*-3HV), um copolímero composto por monômeros de cadeia curta e cadeia média, que apresenta propriedades similares ao polietileno de baixa densidade. A incorporação de unidades de valerato torna o polímero mais atraente sob ponto de vista comercial, devido à diminuição dos níveis de cristalinidade e de seu ponto de fusão, características que permitem diminuir sua rigidez e aumentar a resistência a impactos (DOI; KITAMURA; ABE, 1995; ARAÚJO, 2005).

O P(3HB-*co*-3HV) tem sido considerado melhor candidato que o P(3HB) na produção de plásticos biodegradáveis, por ser mais flexível, forte e fácil de processar. Porém, os isolados de *E. coli* com potencial para produção de P(3HB-*co*-3HV), quando cultivados em meio apropriado para produção do copolímero, não crescem em alta densidade celular nem apresentam altas produtividades (CHOI; LEE, 2000), fato constatado neste estudo.

A utilização de ácido propiônico como precursor de unidades de valerato também foi avaliada por Ramsay *et al.* (1990). No estudo, os autores utilizaram meio mineral suplementado com ácido propiônico para incorporação de P(3HB-*co*-3HV) por *Alcaligenes latus*, *Alcaligenes eutrophus*, *Pseudomonas pseudoflava* e *Pseudomonas cepacia*. Observaram que 0,01% (m/v) de ácido propiônico adicionado ao meio mineral inibiu parcialmente a incorporação de PHAs em *A. latus*. A inibição total ocorreu ao atingir a concentração de 0,05% (m/v). O mesmo ocorreu com *Bacillus cereus*, em que 0,1% (m/v) foi suficiente para iniciar um processo inibitório, cessando totalmente a produção em concentrações de 3% (m/v) de ácido propiônico. Esse fato justifica os valores de PHAs obtidos neste estudo e mostrados na **Tabela 17**, onde se observa a redução da produção de PHAs nos ensaios em que foi adicionado ácido propiônico ao meio de cultivo.

Os dados apresentados na **Tabela 17** e discutidos anteriormente confirmam a capacidade da *E. coli* recombinante ATCC 25922 ancorando o plasmídeo pRLC2, em produzir P(3HB) e P(3HB-co-3HV). Por se tratar de bactéria com características lactose positiva, empiricamente observadas neste estudo, possui características adequadas à utilização da lactose presente no soro de queijo para produção de PHAs.

4.2.3.2 Cultivos em soro de queijo

Inoculou-se a linhagem recombinante ATCC 25922 em frascos de Duran (Figura 9) com fluxo de oxigênio de $3,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$. Utilizou-se meio LB, soro de queijo e permeados do soro de queijo ultrafiltrado (condições experimentais do ensaio 8 da Tabela 5), suplementados com minerais ($16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Na_2HPO_4 , $3,75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de KH_2PO_4 , $0,63 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl , $1,25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NH_4Cl , 2 mL de $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 M) e $100 \mu\text{L}$ de CaCl_2 (1 M) e/ou $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$. O $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ foi utilizado para estimular o crescimento celular e o acúmulo do biopolímero (MAYER *et al.*, 2011; PARK *et al.*, 2002). Os resultados de MCS ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), PHAs ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e percentual de acúmulo de PHAs (m/v) são apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 - Resultados de MCS ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), PHAs ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e percentual de acúmulo de PHAs (p/v) dos cultivos da linhagem recombinante ATCC 25922 utilizando meio LB, soro e permeados de ultrafiltração em frascos de Duran.

Meio de cultivo utilizado	MCS ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	PHAs ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	PHAs (%)
Meio LB + amp*	$3,82 \pm 0,08$	$0,26 \pm 0,03$	$10,27 \pm 0,58$
Soro de queijo + $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + amp*	$5,09 \pm 0,21$	$2,47 \pm 0,13$	$48,43 \pm 0,68$
Permeado do soro de queijo ultrafiltrado + minerais** + amp*	$6,01 \pm 0,29$	$2,06 \pm 0,81$	$34,28 \pm 0,81$
Permeado do soro de queijo ultrafiltrado + $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + amp*	$3,11 \pm 0,09$	$2,69 \pm 0,80$	$86,50 \pm 0,80$

* amp: ampicilina ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

**minerais: $16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Na_2HPO_4 , $3,75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de KH_2PO_4 , $0,63 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl , $1,25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NH_4Cl , 2 mL de $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1M) e $100 \mu\text{L}$ de CaCl_2 (1M).

± desvio padrão referente às réplicas experimentais (cultivos).

Cultivos utilizando meio LB foram utilizados como testemunha comparativa aos cultivos em soro e soro tratado por ultrafiltração.

Salienta-se que a utilização do meio LB, mesmo sendo utilizado pela comunidade acadêmica em estudos de bancada por ser considerado um meio complexo, não apresenta viabilidade econômica para a produção de PHAs.

Os dados apresentados na Tabela 18 demonstram o potencial da linhagem recombinante ATCC 25922 (pRLC2) em utilizar a lactose presente no soro de queijo bruto e/ou tratado por processo de separação com membranas para a produção de PHAs.

Observa-se a importância do pré-tratamento do soro, realizado com membranas de ultrafiltração. O processo de separação com membranas reteve parcialmente na corrente concentrada as proteínas e partículas em suspensão, mantendo na corrente permeada os componentes solúveis. A retirada de partículas em suspensão auxilia na determinação da MCS, realizada por gravimetria, evitando a quantificação dos componentes sólidos do soro junto a MCS, pois de forma geral, os substratos agroindustriais são bastante complexos e alguns de seus componentes podem ser responsáveis pela inibição da produção celular, ou ainda, dificultar a posterior recuperação e/ou purificação de bioprodutos (VALDUGA *et al.*, 2007).

Outra vantagem do pré tratamento com membranas é na esterilização (121 °C/15 min) do soro, onde ocorre uma associação de suas proteínas com micelas de caseínas (LAW; LEAVER, 2000), formando precipitados que por sua vez apresentam aderência proteica, dificultado a separação dos precipitados por filtração. Com a realização de pré tratamentos com membranas, parte dos sólidos presentes são retidos, evitando e/ou reduzindo os efeitos de precipitação de proteínas gerados pelo tratamento térmico (esterilização), facilitando a preparação dos meios de cultivo.

Observa-se na Tabela 18 que a suplementação do permeado ultrafiltrado com minerais inibiu e/ou limitou a incorporação do biopolímero, pois segundo Valduga *et al.*, (2007), o excesso de alguns nutrientes como nitrogênio, potássio, magnésio, manganês e ferro, dentre outros, pode causar inibição indesejada, tanto no crescimento microbiano como sobre a ação de enzimas associadas à biossíntese. Porém, a adição isolada de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (1 M) ao permeado de soro ultrafiltrado, estimulou o crescimento celular e o acúmulo do biopolímero como também observado por Mayer *et al.* (2011) e Park *et al.* (2002), produzindo até $86,50 \pm 0,80$ de PHAs.

O permeado de soro de queijo ultrafiltrado descrito na Tabela 18 apresentava-se homogêneo, isento de partículas em suspensão, com

reduzida CBT e CCS, adequado para ser utilizado como meio de cultivo da *E. coli* recombinante.

Observa-se que somente a corrente permeada obtida por ultrafiltração do soro foi utilizada como meio de cultivo, sendo esta a corrente de interesse na redução da carga orgânica do rejeito de queijaria. As correntes concentradas (ultra e nanofiltração) podem ser aproveitadas para enriquecimento dos derivados lácteos e a corrente permeada obtida por nanofiltração, devido à baixa concentração de lactose (1,4% \pm 0,7)(p/v) e reduzida DQO (7,66 mg·L⁻¹ \pm 1.5), não foi considerada adequada para a produção do biopolímero.

Como vantagem dos resultados mostrados na Tabela 18, obtidos com a aplicação do permeado do soro ultrafiltrado, salienta-se que, mesmo produzindo uma massa absoluta de PHAs equivalente à obtida com soro sem prévio tratamento, as células com percentuais de incorporação mais altos facilitam a lise celular.

Segundo Ramsay *et al.* (1990), a extração (lise celular) e purificação representam um dos principais custos da produção, e esta lise celular é facilitada quando as bactérias acumulam percentuais acima de 60% de PHAs, devido à fragilidade celular. Os autores, citando micro-organismos que acumulam percentuais acima de 90% de PHAs, sugerem que, em experimentos desta natureza, quando realizados em escala industrial, sejam utilizadas bateladas alimentadas ou sistemas contínuos, vista a necessidade de suplementação das fontes de carbono e nitrogênio ao longo do cultivo.

Com base nos resultados obtidos nos cultivos com soro sem tratamento e apresentados na Tabela 18, acredita-se que como a *E. coli* possui capacidade de acumular PHAs junto a seu crescimento celular, as condições de alguns ensaios experimentais fizeram com que o micro-organismo destinasse energia para o crescimento, suprimindo a produção de PHAs. Este evento também foi constatado por Park, Park e Lee (2002) em estudos com *E. coli* CGSC 4401 (pJC4) utilizando como substrato soro de queijo reconstituído. No seu estudo, os autores utilizaram restrição da fonte de carbono na fase de crescimento, o que induziu o direcionamento de energia ao crescimento celular com baixo percentual de acúmulo de PHAs. Utilizaram concentrações de 2 g·L⁻¹ de lactose até a 15ª hora de cultivo, com suplementação para 20 g·L⁻¹ após o início da fase de crescimento, momento em que a energia foi direcionada para a produção de acetil-CoA, acetoacetil-CoA e 3-hidroxisovaleril-CoA, sendo posteriormente polimerizado pela PHA sintase em grânulos de PHAs ao invés do crescimento celular. Obtiveram com este protocolo, 55 g·L⁻¹ de MCS com 70% de acúmulo intracelular de PHAs em sistema de batelada

alimentada, pH controlado (6,9), saturação de oxigênio (30%) e manutenção da concentração de lactose em 20 g·L⁻¹.

Na preparação do soro dos cultivos cujos resultados são apresentados na Tabela 18, após esterilizado em autoclave, o soro era novamente filtrado, procedimento também realizado por Ahn, Park e Lee (2001). A caseína residual presente no soro, quando submetida a altas temperaturas (acima de 82 °C por no mínimo 30 min) forma micelas, e estas podem se agregar a outros componentes presentes, sendo retidos na filtração (VEIGA; VIOTTO, 2001) e alterando a composição nutricional do soro residual. Este fato não foi constatado nos cultivos que utilizaram permeados do soro ultrafiltrado, pois os resíduos de caseína provavelmente ficaram retidos na membrana e/ou na corrente concentrada.

A Tabela 19 apresenta o melhor resultado de produção celular e acúmulo de PHAs obtido neste estudo comparado aos citados por outros autores, mostrando a representatividade do percentual obtido e apresentado na Tabela 18, pois segundo Lee e Chang (1995), a *E. coli* é capaz de acumular até 90% de sua MCS em PHAs.

Tabela 19 - Tabela comparativa de produção de MCS ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e percentual de acúmulo de PHAs ($\text{p}\%$) utilizando diferentes linhagens de *E. coli* recombinante com diferentes plasmídeos.

Linhagem de <i>E. coli</i>	MCS ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	PHAs (%)	Sistema de cultivo		Principal fonte de carbono	Autores
			Batelada 24 h	Batelada 40 h		
ATCC 25922 (pRRLC2)	3,1	86,5			Lactose	Este estudo
DH5 α (pBHR68)	2,3	42,6	Batelada 40 h		Glicose	Kang, Wang e Zhang (2008)
DH5 α (pQKZ103)	4,1	85,8				Carlson, Wlaschin e Sritenc (2005)
DH5 α (pPT500)	5,0	50	Batelada 24 h		LB + Glicose	
WA 101 (p104613C2R)	3,9	48,4				Park e Lee (2004)
WB 101 (p104613C2R)	3,5	25,3	Batelada 72 h		LB	
WAB 101 (p104613C2R)	4,1	32,3				
CGSC 4401 (pJC4)	51,0	70	Batelada alimentada 26 h		Lactose	Park; Park; Lee (2002)
JM 109 (pBHR67)		65				Antonio; Steinbuechel; Rehm (2000)
JM 109 (pBHR68)	*N/I	80	Batelada 48 h		Glicose	
LS1298 (pBHR67)		53				
LS1298 (pBHR68)		67				
CGSC 4401 (pJC4)	194	87	Batelada alimentada / recirculação de células		Lactose	Ahn; Park; Lee (2001)
XL1-Blue (pJC4)	158,8	78,2	Batelada alimentada 56,8h		Glicose	Choi; Lee (1999)
XL1-Blue (pJC3 e pJC4)	194,1	73	Batelada alimentada / recirculação de células 30,6h		Glicose	Choi; Lee; Han (1998)

*N/I: não informado.

Identificou-se, por cromatografia gasosa, que o biopolímero produzido pela *E. coli* recombinante ATCC 25922 (pRLC2) neste estudo foi o P(3HB), que segundo Sudesh, Abe e Doi (2000) e Ojumu e Solomon (2004), é um polímero com propriedades mecânicas similares ao polipropileno, possui elevada cristalinidade (55 a 80%), resistência a mistura, resistência a água, pureza ótica, boa estabilidade a radiação ultravioleta e barreira a permeabilidade de gases.

A Tabela 19 apresenta dados referentes a dois grupos com características distintas de cultivo: o primeiro conduzido em sistema de batelada onde não há suplementação adicional de substrato, e o segundo em sistema de batelada alimentada, onde ocorre a suplementação de substrato e a manutenção de sua concentração ao longo do cultivo.

Observa-se que, nos estudos realizados utilizando meio mineral suplementado com glicose, LB ou LB suplementado com glicose, os autores obtiveram percentuais de acúmulo entre 25,3 a 85,8% de PHAs, resultados compatíveis com os obtidos no presente estudo, que utilizou soro de queijo, um resíduo industrial de baixo custo.

Com o crescimento celular, a necessidade de oxigênio dissolvido aumenta e a concentração do substrato diminui, alterando o equilíbrio termodinâmico a cada nova condição, o que dificulta a produção de altas concentrações celulares. Com o aumento da concentração celular, pode ocorrer limitação do crescimento causada pela falta de oxigênio dissolvido. Segundo Rossi (2006), quando a quantidade de oxigênio dissolvido presente no meio de cultivo atinge seu limite crítico, a respiração é prejudicada e conseqüentemente o crescimento celular.

Os cultivos utilizando micro-organismos com altas velocidades específicas de crescimento apresentam altas velocidades específicas de respiração (ROSSI, 2006), necessitando de sistemas que possam fornecer quantidades de oxigênio dissolvido acima do limite crítico da célula, ou que permitam a recirculação celular, mantendo a concentração estável. Este resultado é possível em sistemas que utilizam fluxos contínuos, como o utilizado por Ahn, Park e Lee (2001) (Tabela 19). Em seus estudos, os autores utilizaram batelada alimentada com agitação e aeração, acoplado a um reator de membrana (*cut off* de 500.000 g·mol⁻¹). O sistema permitia a recirculação de células durante o cultivo, mantendo constantes a concentração celular, a taxa de transferência de oxigênio e, conseqüentemente, a respiração e crescimento do micro-organismo.

Ahn, Park e Lee (2001), utilizando o sistema descrito anteriormente, quando suplementado com solução de lactose de 210

$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, obtiveram, em 39 horas de cultivo, $150 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de MCS com 67% de acúmulo intracelular de P(3HB). Quando suplementado com solução de lactose de $280 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, os autores obtiveram em 36,5 horas de cultivo, $194 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de MCS com 87% de acúmulo intracelular de P(3HB), obtendo produtividades de $2,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ e $4,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, respectivamente. No estudo os autores acidificaram o soro de queijo a pH 4,5 com HCl (10 M) e esterilizaram em autoclave a $121 \text{ }^\circ\text{C}/15 \text{ min}$ para separar os agregados de proteínas, centrifugaram a $11.000\cdot\text{g}$, e corrigiram o pH do sobrenadante para 6,5 com NaOH (12 M), sendo submetido ao cultivo com suplementação constante de solução de lactose (210 e $280 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) durante a incubação.

Choi e Lee (1999) e Choi, Lee e Han (1998) utilizaram sistemas de batelada alimentada com suplementação constante de glicose mantendo-a em $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Os autores obtiveram com este protocolo, respectivamente, $194 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $158,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de MCS com 78,2 e 73% de acúmulo intracelular de P(3HB). No estudo os autores utilizaram meio mineral suplementado com glicose ($20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), tiamina ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), triptona ($2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), ácido oleico ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e em alguns ensaios, ácido propiônico. Corrigiram o pH do meio para 6,9, sendo submetido ao cultivo com suplementação constante de solução de glicose, mantendo a concentração em $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ durante a incubação.

Observa-se que, em sistemas de batelada não alimentada, a produção obtida neste estudo foi compatível com a produção descrita por outros autores (CHOI; LEE; HAN, 1998; CHOI; LEE, 1999; ANTONIO; STEINBUCHER; REHM, 2000; AHN; PARK; LEE, 2001; PARK; PARK; LEE, 2002; PARK; LEE, 2004; CARLSON; WLASCHIN; SRIENC, 2005; KANG; WANG; ZHANG, 2008) utilizando linhagens recombinantes de *E. coli*, sendo que, para obtenção de produção de MCS acima da obtida no estudo, são necessários reatores contínuos com controle do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio e suplementação contínua da fonte de carbono.

Considerando-se o objetivo geral do presente estudo, a redução de 10,5% no teor de lactose do rejeito, obtido com a produção de $3,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de MCS com 86,5% de acúmulo intracelular de P(3HB) utilizando a linhagem recombinante ATCC 25922 (pRLC2), mostrou-se viável.

4.2.3.3 Avaliação dos parâmetros cinéticos

Parâmetros cinéticos foram avaliados para caracterizar o comportamento da linhagem recombinante ATCC 25922 incubada em frascos de *Erlenmeyer* (frascos de sacrifício) e frasco de Duran com

aeração forçada. Com a utilização do modelo matemático de Gompertz modificado (Equação 9) obteve-se a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$ (h^{-1})) e o tempo de duração da fase *lag* (λ (h)). Também foram calculados os fatores de conversão de substrato em célula (MCS) ($Y_{x/s}$) (g/g), de substrato em PHAs ($Y_{p/s}$) (g/g) e a MCS residual (Xr). O Xr foi calculado pela diferença entre a MCS total ($g \cdot L^{-1}$) e a massa de PHAs ($g \cdot L^{-1}$), conforme Equação 12.

Nos cultivos em que foram obtidos dados cinéticos, as amostras foram coletadas em intervalos de 60 min até a 8ª hora, e em intervalos de 120 min após esse período. Os resultados do comportamento cinético dos cultivos obtendo como resposta a produção de MCS ($g \cdot L^{-1}$), de PHAs ($g \cdot L^{-1}$) e Xr ($g \cdot L^{-1}$) são apresentados na Figura 23 e Figura 24.

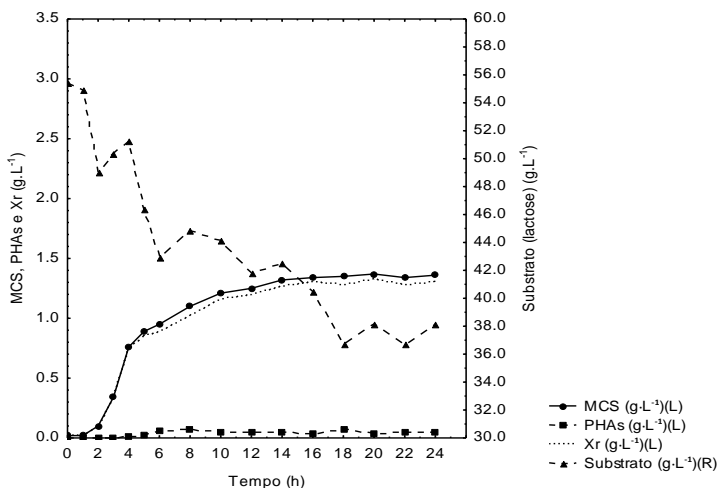


Figura 23 - Comportamento cinético da linhagem recombinante ATCC 25922 na produção de MCS ($g \cdot L^{-1}$), PHAs ($g \cdot L^{-1}$), Xr (MCS residual)($g \cdot L^{-1}$) e consumo de substrato (lactose)($g \cdot L^{-1}$) utilizando frascos de *Erlenmeyer* (frascos de sacrifício) durante 24 h de cultivo, temperatura de 37 °C e agitação de 200 rpm.

Quando se utilizam frascos de sacrifício para experimentos desta natureza, observa-se pequenas variações de comportamento entre frascos devido a variáveis não controladas, o que explica a oscilação na curva de consumo do substrato observada na Figura 23.

Observa-se que a linhagem recombinante ATCC 25922 atingiu velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$ (h^{-1})) entre a 3ª e 4ª hora de cultivo. Porém, acredita-se que com a exaustão da disponibilidade de oxigênio dissolvido no meio, a respiração celular

tenha sido prejudicada, atingindo $C_{crítico}$ (momento em que a respiração celular é afetada pela falta de oxigênio) entre a 5ª e 6ª hora de cultivo, levando ao início da fase estacionária mesmo com disponibilidade da fonte principal de carbono (lactose).

Segundo Rossi (2006), o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_La) para as células durante seu cultivo pode sofrer interferência de vários fatores, dentre eles o aumento de *pellets*, que impõe restrições à transferência de oxigênio quando em cultivos com fungos, e a concentração de sais, que reduz a solubilidade do oxigênio no meio de cultivo, sendo que a presença de sais aumenta a área superficial de interface líquido-ar. Com esta análise, acredita-se que com o aumento da densidade celular, o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio seja prejudicado pela aglomeração de células, visto que o cultivo foi conduzido sem aeração, e pelo aumento da demanda de oxigênio, necessário para atender a necessidade das células presentes.

A densidade celular aumentou em progressão geométrica até a 4ª hora de cultivo, mas não houve aumento da disponibilidade de oxigênio na mesma proporção. Se houvesse disponibilidade de oxigênio, como ocorreu no cultivo em frasco de Duran aerado (Figura 24), a fase de crescimento provavelmente seria mais longa.

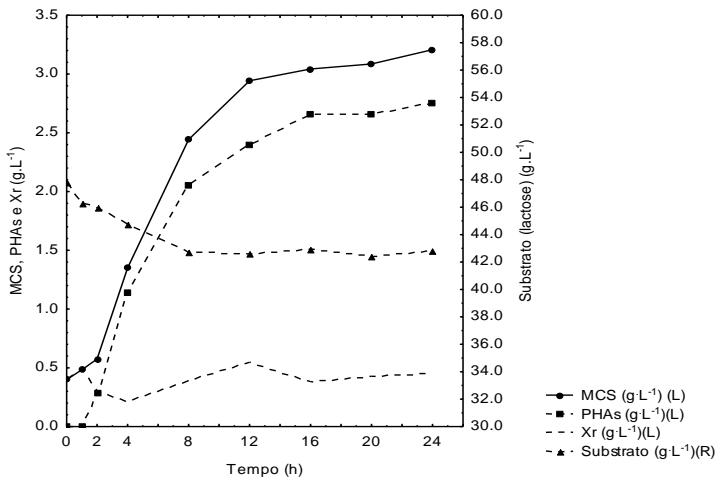


Figura 24 - Comportamento cinético da linhagem recombinante ATCC 25922 na produção de MCS ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), PHAs ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), Xr (MCS residual)($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e consumo de substrato ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) utilizando frasco de Duran aerado durante 24 h de cultivo à temperatura de 37 °C.

Os resultados cinéticos do cultivo realizado em frasco de Duran apresentaram fase *lag* de 0,92 horas, menor que no cultivo realizado em frascos de *Erlenmeyer* (1,06 h), porém, a duração da fase de crescimento foi maior. Observa-se na Figura 23, que após a 5ª hora de cultivo, a redução da disponibilidade de oxigênio provavelmente induziu a entrada na fase estacionária, enquanto na Figura 24 observa-se que a fase de crescimento continuou até a 12ª hora de cultivo, momento em que a disponibilidade de oxigênio pode ter interferido na redução da velocidade específica de respiração celular (Q_{o_2}).

Ambas as Figuras (23 e 24) mostram a disponibilidade do principal substrato carbônico (lactose), não sendo este o fator limitante, mesmo utilizando-se permeado de soro de queijo ultrafiltrado sem suplementação da fonte principal de carbono. Salienta-se que a *E. coli*, mesmo sendo considerada uma bactéria facultativa, apresenta crescimento potencializado pela presença de oxigênio.

A Tabela 20 contém dados comparativos de velocidade específica máxima na fase de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$), duração da fase *lag* (λ (h)) e coeficiente de correlação (R^2) do modelo de Gompertz modificado aos dados experimentais de ambos os cultivos realizados com a linhagem recombinante ATCC 25922.

Tabela 20 - Dados referentes à velocidade específica máxima na fase de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$), duração da fase *lag* (h) e coeficiente de correlação (R^2) do modelo de Gompertz modificado aos dados experimentais.

	$\mu_{m\acute{a}x}$ (h ⁻¹)	Fase <i>lag</i> (h)	R^2
Cultivo em frascos de <i>Erlenmeyer</i>	1,56	1,06	0,994
Cultivo em frasco de Duran aerado	0,38	0,92	0,997

Observa-se na Tabela 20 que, com uma fase *lag* de 1,06 horas (64 min), a linhagem ATCC 25922 iniciou a fase de crescimento atingindo $\mu_{m\acute{a}x}$ de 1,56 h⁻¹. Com um coeficiente de correlação (R^2) superior a 0,994, o modelo matemático de Gompertz modificado foi capaz de prever os dados experimentais observados nos cultivos cinéticos do estudo, o que é ilustrado na Figura 25 e Figura 26.

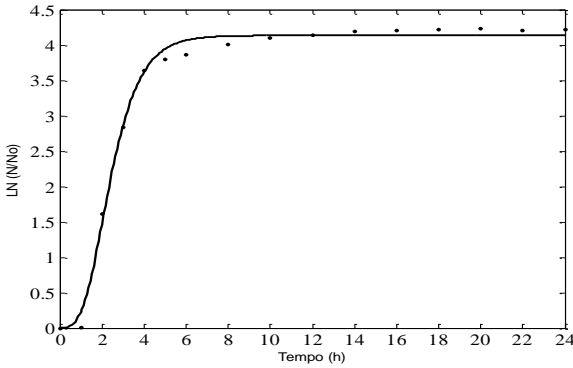


Figura 25 - Modelagem preditiva da linhagem recombinante ATCC 25922 realizada com modelo de Gompertz modificado - cultivo em frascos de Erlenmeyer.

Sabe-se que a bactéria *E. coli* possui genoma com tamanho de 4×10^6 pares de nucleotídeos, e que a DNA polimerase possui velocidade equivalente a 800 nucleotídeos \cdot s $^{-1}$, sendo necessários mais de 80 min para duplicar todo o seu genoma. Devido a várias moléculas de DNA polimerase iniciarem a replicação do DNA simultaneamente em diversos sítios do genoma, denominados sítios de origem de replicação, consegue-se duplicações em períodos entre 22 e 40 min, desde que haja condições favoráveis de crescimento (HELMSTETTER; COOPER, 1968).

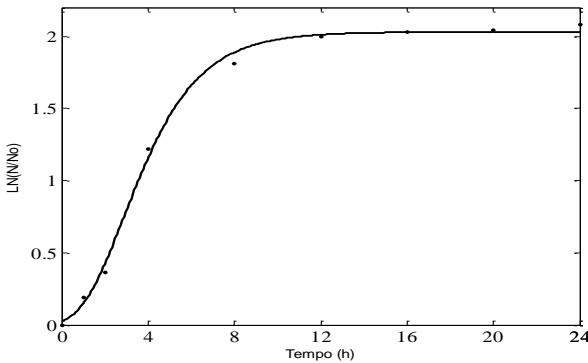


Figura 26 - Modelagem preditiva da linhagem recombinante ATCC 25922 realizada com modelo de Gompertz modificado – cultivo em frascos aerados.

Segundo Helmstetter e Cooper (1968), a idade em que ocorre a rodada de replicação do DNA celular é variável e depende da velocidade de crescimento, sendo constante o tempo de uma rodada completa de replicação, independente da velocidade de crescimento. Em *E. coli*, geralmente uma nova rodada de crescimento é iniciada antes do término da rodada anterior, reduzindo o tempo médio de replicação, ou seja, nem todas as células presentes no meio de crescimento se duplicam no mesmo momento, ampliando o tempo de geração médio, pois as células de *E. coli* podem apresentar tempos de geração variáveis, dependentes do substrato e das condições de cultivo.

Neste estudo, as células recombinantes de *E. coli* acumularam polímero simultaneamente ao seu crescimento, o que acarreta em crescimentos mais lentos, aumentando o tempo de geração e consequentemente, reduzindo a velocidade de crescimento celular. Nos cultivos em frascos de Duran, as células acumularam até 86,5% de sua MCS em PHAs, o que não ocorreu com as células do cultivo conduzido em frascos de *Erlenmeyer*, que produziram $6,01 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de MCS com incorporação de 34,28% de PHAs.

No cultivo realizado em frasco de Duran (**Figura 24**), após 12 horas de incubação, as células já apresentavam 81,4% de sua MCS em PHAs. Kang, Wang e Zhang (2008) observaram em seus estudos com *E. coli*, que as células bacterianas após 36 horas de cultivo se encontravam com vários grânulos de P(3HB). Os autores obtiveram $4,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de MCS com 85,8% (m/v) de P(3HB) ($3,52 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), utilizando meio mineral (M9) suplementado com 0,2% (m/v) de extrato de levedura e 1,5% (m/v) de glicose. Também desenvolveram um sistema induzido por estresse, introduzindo-se a região reguladora 5'- não traduzida do gene *rpoS* em *E. coli*, para a indução artificial da produção de P(3HB), sem a necessidade de utilização do IPTG. No cultivo realizado com a cultura controle (*E. coli* DH5a com plasmídeo pBHR68) e com indução por IPTG, os valores de MCS, concentração de P(3HB) e conteúdo final de P(3HB) foram de $2,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $0,98 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e 42,6%, respectivamente.

A indução da biossíntese de P(3HB) é uma preocupação relevante para utilização de *E. coli* recombinante em nível industrial. A produção de P(3HB) através da expressão constitutiva dos genes é uma sobrecarga para o micro-organismo, o que afetaria o crescimento celular e indiretamente a produção de P(3HB). Kang, Wang e Zhang (2008) desenvolveram um sistema de expressão induzido pelo estresse, e a aplicação deste sistema em *E. coli* levou à produção mais eficiente do polímero P(3HB), sem a necessidade de indução adicional, onde a produção observada foi similar aos níveis obtidos com a utilização de

micro-organismos que produzem P(3HB) naturalmente, sob limitação de nitrogênio ou fosfato.

Observou-se neste estudo que o aumento da densidade celular, aliado à queda do pH, provavelmente aumentam a necessidade de oxigênio em função da respiração celular, reduzindo seu crescimento. Esta observação pode ser relatada como uma desvantagem dos cultivos em batelada não alimentada. Porém, a limitação do crescimento celular potencializa a incorporação de PHAs, fato também observado nas atividades experimentais.

A **Tabela 21** apresenta a produtividade da linhagem recombinante ATCC 25922 e suas conversões de substrato em MCS e PHAs.

Tabela 21 - Produtividade de PHAs ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) e conversão de substrato em MCS ($Y_{x/s}$) (g/g) e em PHAs ($Y_{p/s}$) (g/g) da *E. coli* recombinante ATCC 25922 (pRLC2) em cultivos de 24 horas.

Cultivo	Produtividade ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	($Y_{x/s}$) [*] (g/g)	($Y_{p/s}$) ^{**} (g/g)
Cultivo em frascos de <i>Erlenmeyer</i>	0,002	0,08	0,003
Cultivo em frasco Duran aerado	0,11	0,64	0,55

* $Y_{x/s}$: fator de conversão de substrato em MCS.

** $Y_{p/s}$: fator de conversão de substrato em produto (PHAs).

Observa-se na **Figura 24** e na **Tabela 21** que a linhagem recombinante ATCC 25922 atingiu produtividade de $0,11 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ de PHAs em 24 horas de cultivo quando cultivada em frasco de Duran. A produtividade de P(3HB) obtida no estudo foi inferior à obtida por Wong e Lee (1998), de $1,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, por Choi, Lee e Han (1998), de $4,63 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, por Choi e Lee (2000), de $2,88 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ e por Ahn, Park e Lee (2001), que foi de $4,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Porém, todos esses autores utilizaram batelada alimentada ou reator contínuo. No entanto, se assemelha à produtividade de $0,09 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ obtida por Kang, Wang e Zhang (2008) e de $0,10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ obtida por Carlson, Wlaschin e Srienc (2005), utilizando glicose como fonte de carbono em batelada não alimentada, equivalente ao sistema utilizado no estudo.

Wong e Lee (1998), utilizando soro de queijo concentrado ($210 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) para suplementação de meio de cultivo para *E. coli* GCSC 6576 em batelada alimentada, obtiveram produção de $87 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de MCS com

80% de acúmulo intracelular de P(3HB) em 49 horas de cultivo. No estudo, os autores avaliaram a limitação de oxigênio e sua relação com o crescimento celular e a incorporação de PHAs. Observaram que, sob limitação de oxigênio, a energia é destinada à incorporação de PHAs, chegando a 80% da MCS, resultado não obtido em cultivos sem limitação.

Embora a *E. coli* não necessite limitação nutricional para incorporar PHAs, a limitação pode até inibir a incorporação do polímero devido ao direcionamento energético para crescimento celular. Park, Park e Lee (2002) obtiveram $55 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de MCS com 70% de PHAs com limitação da fonte de carbono em 2% para crescimento celular inicial. No estudo o pH foi corrigido para 6,9 no momento da inoculação e monitorado ao longo do cultivo.

Autores como Choi, Lee e Han (1998), Choi e Lee (2000), Ahn, Park e Lee (2001), Antonio, Steinbuchel e Rehm (2000), Park, Park e Lee (2002) e Carlson, Wlaschin e Srienç (2005) utilizaram a manutenção do pH ao longo do cultivo com solução de NaOH. Acredita-se que a manutenção do pH em níveis adequados ao crescimento bacteriano também contribua com o crescimento celular, mas não com o acúmulo de PHAs (BOSCO; CHIAMPO, 2010).

A variação do pH inicial (6,5 a 6,9) do meio de cultivo não apresentou efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$) na produção de MCS e PHAs realizado no estudo, pois segundo Hoffmann (2001) e Santos *et al.* (2003), a *E. coli* apresenta crescimento aceitável na faixa de pH entre 4,4 e 9,5, considerando seu pH ótimo para crescimento entre 6 e 7.

O comportamento médio do pH durante as 24 horas dos cultivos utilizando a linhagem recombinante ATCC 25922 (pRLC2) pode ser observado na Figura 27.

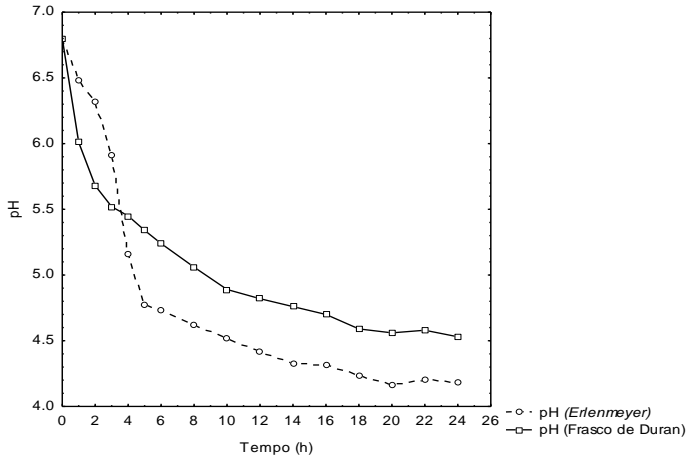


Figura 27 - Dados médios de pH em ambas as modalidades de cultivo da *E. coli* recombinante ATCC 25922 (pRLC2), durante 24 horas em temperatura de 37 °C.

Observa-se na **Figura 27** que em 12 horas de cultivo, utilizando frasco aerado, o pH atingiu 4,82, e nos experimentos conduzidos em *Erlenmeyer*, 4,36. Kang, Wang e Zhang (2008), em estudos com *E. coli*, observaram queda de pH para 5,2 nas primeiras 12 horas de cultivo, queda também observada neste estudo, porém, mais acentuada.

Kang, Wang e Zhang (2008) observaram em seus estudos com *E. coli* DH5 α (pQKZ103), que no início do cultivo a velocidade de acúmulo de P(3HB) era lenta, aumentando somente após a 12^a hora de cultivo, coincidindo com a queda do pH. Esse fato também foi reportado por Bosco e Chiampo (2010), que observaram aumento da produção de PHAs utilizando soro de queijo como meio de cultivo em culturas mistas quando o pH não foi corrigido. Este evento pode ser observado comparando o comportamento da produção de PHAs ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) mostrado na **Figura 24** e o comportamento do pH mostrado na **Figura 27**, onde após a 3^a hora de cultivo, o aumento percentual de acúmulo de PHAs coincide com a queda do pH.

Wong e Lee (1998), avaliando a utilização de soro de queijo na produção de PHAs, reportam a importância da utilização do rejeito industrial de queijaria na produção de PHAs com o objetivo de contribuir com o tratamento do efluente e de reduzir custos na produção dos biopolímeros, o que não ocorre em cultivos que utilizam glicose e/ou meio LB.

Observou-se no estudo que a utilização do permeado do soro obtido por ultrafiltração como meio de crescimento em *E. coli* recombinante (ATCC 25922) e, conseqüentemente, a utilização da lactose como principal fonte de carbono, permitiu a obtenção de dados de crescimento equivalentes a cultivos conduzidos utilizando glicose, indicando que a lactose do soro de queijo pode ser utilizada como substrato de baixo custo para produção de PHAs, seja como fonte de carbono (linhagem ATCC 25022) ou na indução de expressão gênica (linhagem JM 101).

Com o estudo, obtiveram-se linhagens recombinantes com características relevantes à produção e incorporação de PHAs utilizando o soro de queijo previamente tratado por processo de separação com membranas como meio de cultivo, contribuindo com a redução do custo de produção dos polímeros biodegradáveis (PHAs) e com o desenvolvimento de tecnologias limpas no tratamento de efluentes de rejeitos de queijarias, possibilitando seu envio com menor carga orgânica a sistemas de tratamento de efluentes e/ou corpos receptores. O pré-tratamento do soro de queijo mostrou-se viável para utilização como meio de cultivo em *E. coli* recombinante JM 101 e ATCC 25922 (pRLC2) para produção de PHAs.

5 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

5.1 CONCLUSÕES DO TRABALHO

Os resultados experimentais deste estudo sugerem uma alternativa ao aproveitamento da lactose presente no soro de queijo, um rejeito industrial altamente poluente e geralmente descartado na natureza como resíduo inútil. Com a realização de pré-tratamentos utilizando membranas filtrantes, o soro foi utilizado na produção de polímero plástico biodegradável.

Com base nos dados apresentados, conclui-se que:

- dentro de faixas adequadas de pressão, temperatura e vazão de alimentação, é viável a utilização de processos de separação com membranas como a ultra e a nanofiltração no pré-tratamento do soro de queijo. Como esperado, os componentes do soro levaram a uma significativa queda de fluxo permeado devido à polarização por concentração e *fouling*;
- a ultrafiltração do soro de queijo permitiu retenção de partículas em suspensão e reduziu a contagem de células somáticas (CCS), mostrando ser viável sua utilização na produção de PHAs por *E. coli* recombinante;
- a retenção parcial de proteínas e gordura do soro de queijo gerou correntes permeadas com redução da DQO, porém, insuficientes para envio a corpos receptores. Assim, ultra e nanofiltração não se mostraram soluções definitivas para o tratamento do rejeito de queijaria, mas uma opção para redução de sua carga orgânica;
- utilizando técnicas de engenharia genética foram obtidos isolados de *E. coli* recombinante com capacidade de utilizar a lactose monohidratada e/ou a lactose presente no soro de queijo na biossíntese de PHAs, utilizando o plasmídeo pRLC2;
- o permeado de soro de queijo, após ser utilizado como meio de cultivo em *E. coli* recombinante, apresentou teores reduzidos de lactose, sendo essa utilizada na produção de PHAs;
- constatou-se que a lactose, principal componente do soro de queijo, para *E. coli* recombinante linhagem JM 101

ancorando o plasmídeo pRLC2, é um indutor de operon *Lac*, pois impede a ligação da proteína repressora *LacI* ao DNA celular, permitindo a expressão dos genes e, conseqüentemente, o acúmulo intracelular de PHAs sem a necessidade do indutor comercial IPTG;

- a *E. coli* recombinante linhagem ATCC 25922 ancorando o plasmídeo pRLC2 demonstrou-se capaz de produzir e acumular intracelularmente PHAs, atingindo produtividade compatível com outras linhagens apresentadas na literatura, utilizando a lactose presente no soro de queijo como principal fonte de carbono;
- identificou-se que o biopolímero produzido pela *E. coli* recombinante, linhagens JM 101 e ATCC 25922, polimerizado pela PHA *sintase* de *C. violaceum*, clonado no plasmídeo pRLC2, foi o P(3HB); e
- a linhagem ATCC 25922 incorporou o polímero P(3HB-co-3HV) em presença de ácido propiônico.

Por fim, o estudo demonstrou a viabilidade técnica da utilização de processos de separação com membranas no pré-tratamento do soro de queijo, conjugado com a produção biotecnológica de polímero plástico biodegradável, utilizando-se isolados de *E. coli* recombinante a montante do plasmídeo pRLC2.

5.2 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como contribuição deste estudo, sugere-se:

- Otimizar as condições de cultivo do isolado recombinante ATCC 25922 com o plasmídeo pRLC2, objetivando alta densidade celular, podendo empregar biorreator em batelada alimentada.
- Ampliar os estudos com o isolado recombinante ATCC 25922 para obtenção do co-polímero P(3HB-co-3HV) sem suplementação (ácido propiônico ou ácido valérico).
- Realizar avaliação econômica da produção de PHAs por *E. coli* recombinante ATCC 25922 (pRLC2).

REFERÊNCIAS

- ABIA. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO. 2011. Disponível em:< <http://www.abia.org.br/deconpublicacoes.asp>,>. Acesso em: 8 nov., 2011.
- ABIQ. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO. Controle da poluição em indústria de queijo, 2007.
- ABIQ. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO, 2011.
- AIMUTIS, W.R. Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticariogenesis. *J. Nutr.*, 134: 989S-995S, 2004.
- AHN, W. S., PARK, S. J., LEE, S. Y. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from whey by cell recycle fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters.*, v. 23, p. 235-40, 2001.
- AHN, W. S; PARK, S. J; LEE, S. Y. Production of Poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* with a highly concentrated whey solution. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, p. 3624-7, 2000.
- ALVES, C. Efeito de variações sazonais na qualidade do leite cru refrigerado de duas propriedades de minas gerais. 2006. 65 p.. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG, Belo Horizonte/MG, 2006.
- ANDERSON, A.J.; DAWES, E.A. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiology Reviews*, v. 54, p. 450-72, 1990.
- ANDRADE, L., M. de. Avaliação de formas de preparação de estoques de trabalho na preservação de *Streptomyces clavuligerus* visando a produção de ácido clavulânico. 2009. 97 p. **Dissertação** (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, São Carlos/SP, 2009.

ANTÔNIO R. V.; STEINBÜCHEL, A.; REHM, B. H, A.. Analysis of in vivo substrate specificity of the PHA synthase from *Ralstonia eutropha*: formation of novel copolyesters in recombinant *E. coli*. *Microbiology Letters*. v. 182, p. 111-7, 2000.

AOAC. **Association of Official Agricultural Chemists. Official methods of analysis of the**. 16 ed, Gaithersburg, USA, Rhapsiter, v. 45, p. 16-7, 1997.

ARAÚJO, E.H. Redução na poluição dos laticínios, pela transformação da lactose do soro de queijo em etanol. In: XXIX CONGRESSO BRASILEIRO DE ENSINO DE ENGENHARIA. Uberlândia/MG, 2001.

ARAÚJO, D. G. Produção de poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) por *E. coli* recombinante a partir de glicose e ácido propiônico. 2005. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina/UFSC, Florianópolis/SC, 2005.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Embalagens plásticas degradáveis e/ou renováveis**. Parte 1: Terminologia. Rio de Janeiro: ABNT, 2006 (NBR 15.448-1).

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Embalagens plásticas degradáveis e/ou renováveis**. Parte 1: Biodegradação e compostagem. Rio de Janeiro: ABNT, 2006 (NBR 15.448-2).

AOAC INTERNATIONAL. Official methods of analysis. 16^a ed., 3^a rev. Gaithersburg: **Published by AOAC International**. 2, cap. 32, p. 1-43, 1997.

ATRA, R. *et al.*. Investigation of ultra- and nanofiltration for utilization of whey protein and lactose. *Journal of Food Engineering*. v. 67, p. 325-32, 2005.

BALLANEC, B. *et al.*. Treatment of dairy process waters by membrane operation for water reuse and milk constituents concentration. *Desalination*. v. 147, p. 89-94, 2002.

BAKKEN, A.P.; HILL, Jr., C. G.; AMUNDON, C. H. Hydrolysis of lactose in skim milk by immobilized beta-galactosidase in a spiral flow reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 33, n. 10, p. 1249-57, 1989.

BARBETTA, P. A.; REIS, M. M.; BORNIA, A. C. **Estatística para cursos de engenharia e informática**. 2 ed. 2 reimpr. São Paulo: Atlas, 2009. 410 p.

BARROS, S.T.D. Clarificação dos sucos de acerola e abacaxi por ultrafiltração: modelagem e simulação do fluxo do permeado e determinação dos mecanismos de fouling. 2002. **Tese** (Doutorado em Engenharia Química), Faculdade de Engenharia Química, FEQ/UNICAMP, Campinas, SP. 2002.

BASSETTI, F. de J.. Preparo e caracterização de membranas poliméricas microporosas assimétricas. 2002. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP, Campinas/SP, 2002.

BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do Leite**. 15ª Ed.. São Paulo: Nobel, 1987. 324 p.

BENTLEY Instruments, Inc. *Bentley 2000. Operator's manual*. Minnesota, 1994.

BERTANI, G. Studies on lysogeny. I. The mode of phage liberation by lysogenic *E. coli*. *J. Bacteriol*, v. 62, p. 293-300, 1951.

BEZERRA, L. F.; MATSUMOTO, T. Avaliação da remoção de matéria orgânica carbonácea e nitrogenada de águas residuárias em biorreator de membranas. *Eng. Sanit. Ambient.*, v. 16, n. 3, p. 253-60, 2011.

BOERLAGE S. F. E. *et al.*. BaSO₄ solubility prediction in reverse osmosis membrane systems. *Journal of Membrane Science*, v. 159, n. 1-2, p. 47-59, 1999.

BOSCO, F.; CHIAMPO, F. Production of polyhydroxyalcanoates (PHAs) using milk whey and dairy wastewater activated sludge

production of bioplastics using dairy residues. *Journal Bioscience Bioengineer*, v. 109, p. 418-21, 2010.

BUTYLINA, S.; LUQUE, S.; NYSTROM, M.. Fractionation of whey-derived peptides using a combination of ultrafiltration and nanofiltration. *Journal of Membrane Science*, v. 280, p. 418-26, 2006.

BRANDL, H. *et al.*. Pseudomonas oleovorans as a source of poly(beta-hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 54, n. 8, p. 1977-82. 1998.

BRAUNEGG, G.; SONNLEITNER, B.; LAFFERTY, R. M. Rapid gas-chromatographic method for determination of poly-beta-hydroxybutyric acid in microbial biomass. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 6, n. 1, p. 29-37. 1978.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 354, de 4 de setembro de 1997. Aprova o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do doce de leite. Brasília, DF, 1997.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 51, de 18 de setembro de 2002. Publicado no Diário Oficial da União em 20 de setembro de 2002, Seção 1, página 13. Aprova os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Brasília, DF, 2002.

BRESSAN, C. R. Clonagem gênica, expressão heteróloga e proposição de um modelo estrutural teórico para a polihidroxialcanoato sintase de *Chromobacterium violaceum*. 2007. 75 p.. **Dissertação** (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina/UFSC, Florianópolis/SC, 2007.

BRIÃO, V. B.; TAVARES, C. R. G.. Ultrafiltração como processo de tratamento para o reúso de efluentes de laticínios. *Engenharia Sanitária e Ambiental*. v. 12, p. 134-8, 2007.

BRITO, J.R.F; DIAS, J.C. **A qualidade do leite**. Juiz de Fora: Tortuga, 1998. 98 p.

BRONSTEIN, V.; MONTE ALEGRE, R. Estudo dos parâmetros da ultrafiltração de permeado de soro de queijo fermentado por *Lactococcus lactis subsp. lactis*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 18, n. 1, p. 93-8, 1998.

CARLSON, R.; WLASCHIN, A. ; SRIENC, F.. Kinetic Studies and Biochemical Pathway Analysis of Anaerobic Poly-(R)-3-Hydroxybutyric Acid Synthesis in *E. coli*. **Appl. Environm. Microb.** v. 71, n. 2, p. 713-20, 2005.

CARMINATTI, C.A. ; PETRUS, J.C.C. ; PORTO, L. M. . Desempenho de Reatores à Membrana e em Batelada na Hidrólise Enzimática da Lactose. In: 4º CONGRESSO IBERO-AMERICANO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MEMBRANAS, 2003, Florianópolis. Anais do 4º Congresso Íbero-americano em Ciência e Tecnologia de Membranas, p. 286-91, 2003.

CHERYAN, M. **Ultrafiltration and microfiltration handbook**. Pennsylvania, USA: Technomic Publishing Corporation, 1998a.

CHERYAN, M., Fouling and cleaning. In: ULTRAFILTRATION AND MICROFILTRATION HANDBOOK, TECHNOMIC PUBLISHING COMPANY LTD., Lancaster, 237-91, 1998b.

CHOI, J.; LEE, S. Y. Economic considerations in the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by bacterial fermentation. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 53, p. 646-9, 2000.

CHOI, J. I.; LEE, S. Y. High-level production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, 65, 4363-8, 1999.

CHOI, J.; LEE, S.Y.; HAN, K. Cloning of the *Alcaligenes latus* Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis Genes and Use of These Genes for Enhanced Production of Poly(3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli*, **Appl Environ Microbiol.**,v. 64, n. 12, p. 4897–903, 1998.

CONAMA. **Resolução nº 357**, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de

lançamento de efluentes, e dá outras providências. Ministério do Meio Ambiente Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), 2005.

CONSTENLA, D.T. and LOZANO, J.E. Hollow Fibre Ultrafiltration of Apple Juice: Macroscopic Approach. *J. Food Sci. & Technol.*, v. 30, p. 373-8, 1997.

CORDI, L. *et al.*. Intumescimento filamentoso no processo de lodos ativados aplicados ao tratamento de soro de queijo: caracterização e uso de flocculantes para melhorar a sedimentabilidade. *Engenharia ambiental.*, v. 4, p. 26-37, 2007.

CUARTAS-URIBE, B. *et al.*. Nanofiltration of sweet whey and prediction of lactose retention as a function of permeate flux using the Kedem–Spiegler and Donnan Steric Partitioning models. *Separation and Purification Technology*, v. 56, p. 38-46, 2007.

CUNHA, C. R. *et al.*. Estudo da microfiltração do leite desnatado visando à redução do teor de gordura residual. In: 4º CONGRESSO IBERI-AMERICANO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MEMBRANAS (CITEM). Florianópolis/SC, 2003.

DALCANTON, F. *et al.*. de. Produção de poli(3-hidroxiubutirato) por *Cupriavidus Necator* em meio hidrolisado de amido de arroz com suplementação de óleo de soja em diferentes temperaturas. *Quím. Nova.*, v. 33, n. 3, p. 552-6. 2010.

DE ROBERTIS, E. D. P.; DE ROBERTIS, E. M. F. **Bases da biologia molecular e celular**. Rio de Janeiro: Granabara Koogan, 1986.

DOI, Y.; KITAMURA, S.; ABE, H. Microbial synthesis and characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Macromol.*, v. 28, p. 4822-8, 1995.

EBERHART, R.J.; HUTCHINSON, L.J.; SPENCER, S.B. Relationships of bulk tank somatic cell counts to prevalence of intramammary infection and to indices of herd production. *Journal of Food Protection*, v. 45, n. 12, p. 1125-8, 1982.

EMBRAPA – Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Leite. **Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias**. Evolução da produção de leite

no Brasil, 1991-2007, 2011. Disponível em:

<<http://www.cnpqi.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabla0210.php>> . Acesso em: 16 de novembro de 2011.

ERKMEN, O. Mathematical modeling of *E. coli* inactivation under high-pressure carbon dioxide. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 92, p. 39-43, 2001.

FARRO, A. P. C.; VIOTTO, L. A. Redução do teor de gordura do soro de queijo pré-tratado por microfiltração. In: 4º CONGRESSO IBERI-AMERICANO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MEMBRANAS (CITEM). Florianópolis/SC, 2003

FASS, J. R. and BARNISHAN, J. Minimal inhibitory concentrations of 34 antimicrobial agents for control strains *E. coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.16, p. 622-4, 1979.

FINKLER, L. Produção de polihidroxialcanoatos por CUPRIAVIDUS NECATOR usando ácido acrílico como fonte de carbono. 2006. **Tese** (Doutorado em Ciências em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ, Rio de Janeiro/RJ, 2006.

FONSECA, G. G. Produção de polihidroxialcanoatos por “*E. coli*” recombinante. 2003. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina/UFSC, Florianópolis/SC, 2003.

GHALY A; KAMAL M, A.. Submerged yeast fermentation of acid cheese whey for protein production and pollution potential prevent. *Water research*, v. 38, p. 631-44, 2004.

GOMEZ, J. G. C. *et al.*; **Anais do 2º Congresso Brasileiro de Polímeros**, São Paulo, Brasil, 1993.

GOOSEN M. F.A. *et al.*. Effect of feed temperature on permeate flux and mass transfer coefficient in spiral-wound reverse osmosis systems, *Desalination*, v. 14, p. 367-72, 2002.

- GURIEFF, M.; LANT, P. Comparative life cycle assessment and financial analysis of mixed culture polyhydroxyalkanoate production. *Bioresour. Technol.*, v. 98, p. 3393-403, 2007.
- HABERT, A.C.; BORGES, C.P.; NOBREGA, R. **Processos de separação por membranas**. Rio de Janeiro/RJ: E-papers, 2006. 180 p.
- HANAHAN, D. Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, v. 166, p. 557-80, 1983.
- HAUSMANN, R. **História da biologia molecular**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1997.
- HARVEY, R.A., CHAMPE, P.C., FISCHER, B.D. **Microbiologia Ilustrada**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 236 p.
- HELMSTETTER, C. E. ; COOPER S.. DNA synthesis during the division cycle of rapidly growing *E. coli*. *Journal of Molecular Biology.*, v. 31, n. 3, p. 507-18, 1968.
- HICKEY, R. F.; OWENS, R. W. Methane generation from high-strength industrial waste with anaerobic biological fluidized bed. *Biotechnology and Bioengineering Symp.*, v. 11, p. 399-412, 1981.
- HOFFMANN, F. L., Fatores limitantes à proliferação de microorganismos em alimentos *Brasil Alimentos*, v. 9, jul-ag., 2001.
- HOSSEINI, M.; SHOJAOSADATI, S. A.; TOWFIGHI, J. Application of a bubble-column reactor for the production of a single-cell protein from cheese whey. *Ind. Eng. Chem. Res.*, v. 42, p. 764-6, 2003.
- HOMEM, G. R. Avaliação técnico-econômica e análise locacional de unidade processadora de soro de queijo em Minas Gerais. 2004. 230 p. **Tese** (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG: UFV, 2004.
- IAL - INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3ª ed., São Paulo, 1985.
- IBGE, **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Contagem da população 2007. Disponível em:

<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/contagem2007/default.shtm>. Acesso em: janeiro de 2010.

JUNIOR, A. F.. Produção de poli-hidroxicarboxilatos (PHS's). 2006. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina/UFSC, Florianópolis/SC, 2006.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

KANG, A. *et al.*. Construction of a stress-induced system in *E. coli* for efficient polyhydroxyalkanoates production. *Appl Microbiol Biotechnol.*, v. 79, p. 203-8, 2008.

KAZEMIMOGHADAM, M; MOHAMMADI, T. Chemical cleaning of ultrafiltration membranes in the milk industry. *Desalination*, v. 204, p. 213-8, 2007.

KLEIN, M. P.; JONG, E. V. de; REVILLION, J. P. P.. Utilização da β -galactosidase para prevenção da cristalização em doce de leite. *Ciênc. agrotec.*, v. 34, n. 6, p. 1530-5, 2010.

LACERDA, T.H.M.; OLIVEIRA, A.J.de; CARUSO, J.G.B.. Viabilidade do tratamento do soro de queijo com digestão anaeróbia. An. Esc. *Super. Agric.*, v. 47, n. 2, p. 557-73, 1990.

LEE, S. Y.; Plastic bacteria - Progress and prospect for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends Biotechnology*, v. 14, p. 431-8, 1996.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1995.

LEE, S.Y. Plastic bacteria: Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends Biotechnol.*, v. 14, p. 431-8. 1996.

LEE S Y.; CHANG H N. Production of poly(hydroxyalkanoic acid). *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnol.*, v. 52, p. 28-57, 1995.

- LEE, S., KIM, J., LEE, C.-H., Analysis of CaSO₄ scale formation mechanism in various nanofiltration modules, *Journal of Membrane Science*, v. 163, n. 1, p. 63-74, 1999.
- LENCASTRE, K. *et al.*. Potencial de bioaproveitamento do lactosoro para a produção de etanol. In: 4º SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOCOMBUSTÍVEIS – BIOCUM. Rio de Janeiro/RJ, 2011.
- LIRA, H. de L. *et al.*. Microfiltração do soro de leite de búfala utilizando membranas cerâmicas como alternativa ao processo de pasteurização. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 29, n. 1, p. 33-7, 2009.
- LIZIEIRI, R. S.; CAMPOS, O. F. de. Instrução técnica para o produtor de leite: soro de queijo *in natura* na alimentação do gado de leite. Pesagro-Rio e EMBRAPA gado de leite/EMBRAPA. 2ª ed., 2006.
- LO, K.V.; LIAO, P.H. Digestion of cheese whey with anaerobic rotating biological contact reactors. *Biomass*, v. 10, p. 243-52, 1986.
- LUZIER, W.D. Materials derived from biomass biodegradable materials. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 89, p. 839-42, 1992.
- MAIA, F. Indústria e comércio Ltda. Ficha de segurança da lactose mono hidratada PA ACS. 2007. De acordo com a norma NBR 14725 : 2001.
- MACHADO, P.F.; PEREIRA, A.R.; SARRIÉS, G.A. Efeitos da contagem de células somáticas na qualidade do leite e a atual situação de rebanhos brasileiros. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 54, n. 309, p. 10-6, 1999.
- MACHADO, R.M.G. *et al.*. Controle ambiental nas pequenas e médias indústrias de laticínios. **Projeto minas ambiente**. Belo Horizonte, 224 p., 2002.
- MAGALHAES, M. P. *et al.*. Conservação de água de coco verde por filtração com membrana. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25. p. 72-7, 2005.

MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. **Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia**. 9ª ed. São Paulo: Roca, 1998.

MANDEL, M.; HIGA, A.. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.*v. 53, p. 159-62, 1970.

MARSHALL, A.; DAUFIN, G..Physico-chemical aspects of membrane fouling by dairy fluids, international Dairy Federation, 9504 (Fouling and cleaning in pressure driven membrane processes), p. 8-35 (Special Issue), 1995.

MAZAL, G. Efeito da contagem de células somáticas do leite na fabricação de queijo Prato. 2005. **Dissertação** (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP, Campinas/SP, 2005.

METSÄMUURONEN, S. e NYSTRÖM, M. Enrichment of α -lactalbumin from diluted whey with polymeric ultrafiltration membranes. *Journ. of Membrane Science*, v. 337, p. 248-56. 2009.

MILKPOINT, 2011. Disponível em:<
<http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/espaco-aberto/soro-de-leite-em-po-brasil-caminha-para-autossuficiencia-71038n.aspx>>.
Acesso em: setembro de 2012.

MILKPOINT, 2010. Disponível em:
<<http://www.milkpoint.com.br/default.asp?>>. Acesso em: março de 2010.

MILKPOINT, 2009. Disponível em:<
<http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/giro-lacteo/sc-producao-de-leite-dobrou-em-oito-anos-52507n.aspx>> . Acesso em: setembro de 2012.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p., 426-8, 1959.

MINAS GERAIS. Comissão de Política Ambiental. **Deliberação Normativa e Conselho Estadual de Recursos Hídricos nº 01, de 05 de maio de 2008**. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as

condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário Executivo, Belo Horizonte, 13 de maio, 2008. *Apud* Saraiva 2008.

MINHALMA, M. *et al.*. Optimization of “Serpa” cheese whey nanofiltration for effluent minimization and by-products recovery. *Journal of Environmental Management*. v.82, p. 200-6, 2007.

MYERS, R. H; MONTGOMERY, D. C. Response Surface Methodology - Process na product optimization using designed experiments. Canada: *John Wiley & Sons*, 1995.

MULDER, M. Basic principles of membrane technology. *Center for Membrane Science and Technology*, University of Twente, Enschede, The Netherlands, 2000.

MÜLLER-HILL, Manno. The lac Operon - A Short History of a Genetic Paradigm. Paperback: Köln, Germany. 1996. 207 p.

NASCIMENTO, A. A. C. *et al.*. Tecnologia do DNA Recombinante. São Paulo: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP), 2003. Disponível no site: <http://morpheus.fmrp.usp.br/td/download_apostila.php>. Acesso em: 09 novembro de 2011.

OJUMU, T. V.; YU, J.; SOLOMON, B. O.. Production of polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. *Afri. J. Biotechnol.* v. 3, p. 18-24. 2004.

OUNIS, W. B. *et al.*. Utilization of tofu whey pre-treated by eletromembrane process as a growth medium for *Lactobacillus plantarum* LB17. *Desalination*, v. 229, p. 192-203, 2008.

OZDEN, H. O.; PURI, V. M. Computational analysis of fouling by low energy surfaces. *Journal of Food Engineering*. v 99, p. 250-6, 2010.

PARK, S. J.; PARK, J. P.; LEE, S. Y.. Production of poly (3-hydroxybutyrate) from whey by fed-batch culture of recombinant *E. coli* in a pilot-scale fermenter. *Biotechnology Letters*. v. 24, p. 185-9, 2002.

PARK, S. J.; LEE, S. Y. Biosynthesis of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by Metabolically Engineered *E. coli* Strains. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, p. 113-6, 2004.

PENA, A. L. B.; ALMEIDA, K. E. OLIVEIRA, M. N. Soro de leite: importância biológica, comercial e industrial – principais produtos. In: OLIVEIRA, M.N. R. Tecnologia de produtos funcionais. 1 ed. São Paulo: Atheneu, 2009, p. 251-76.

PELCZAR Jr., J. M.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R.. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. São Paulo: Makron Books, 1996.

PATTERSON, K. G.. GENE REGULATION IN THE LAC OPERON. 2009. **Dissertation** (Doctor of Philosophy in Mathematics) - Montana State University. Bozeman, Montana/USA. 2009.

PEREIRA JÚNIOR, F.N. Comparação de métodos de enumeração e de estimativa de microrganismos psicrotróficos em leite cru e avaliação do método de Moseley. 2002. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 2002.

PERRY, Katia S. P.. Queijos: aspéctos químicos, bioquímicos e microbiológicos. *Quim. Nova*, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.

PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S.C. Vencendo a luta contra a mastite. São Paulo: Westfalia Landtechnik do Brasil Ltda, 2002. 188 p.

PIEMOLINI, L. T. Modelagem Estrutural da PHA Sintase de *Chromobacterium violaceum* para Estudos de Mutação Sítio-Dirigida. 2004. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina/UFSC, Florianópolis/SC, 2004.

POULIOT, Y., P. Jelen, Pretreatments of dairy fluids to minimize long-term membrane fouling, *International Dairy Federation 9504 (1995) 80–92 (Special Issue)*.

PRUKSASRI . S., M. S. Production and separation of galacto - oligosaccharides from lactose by β -galactosidase immobilized on nanofiltration membranes. 2007. 204 p. **Dissertation** (The Degree

Doctor of Philosophy in the Graduate) - School of The Ohio State University. 2007.

RAMSAY, B. A. *et al.*. Production of poly(β -hidroxibutyric-co- β -hidroxivaleric) acids. *Applied Environmental Microbiology*, v. 56, p. 2093-8, 1990.

RIBEIRO, M. E. R.; ZANELA, M. B.; BARBOSA, R. S. Adequação do leite produzido no Rio Grande do Sul à Instrução Normativa 51 do MAPA. Comunicado técnico 143. ISSN 1806-9185. Novembro, Pelotas/RS, 2006.

RICE, G. *et al.*. Fouling of NF membranes by dairy ultrafiltration permeates. *Journal of Membrane Science*. , v. 330, p. 117-26, 2009.

RIISPOA, Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal. Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder executivo, de 07 de julho de 1952.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 1ª ed. Campinas: Casa do Pão, 2005.

RODRIGUES, H. S. R. e OLIVEIRA, A. C. Avaliação de uma proposta contextualizada sobre o ensino de polarimetria nos cursos de farmácia e engenharia de alimentos, na Universidade Federal do Ceará. *Quim. Nova*, v. 32, n. 1, p. 250-6, 2009.

ROMÁN, A. *et al.*. Experimental Investigation of the Sweet Whey Concentration by Nanofiltration. *Food Bioprocess Technol.* v. 4, p. 702-9, 2011.

ROSA, D. S.; CHUI, Q. S. H. Avaliação da Biodegradação de Poli-beta-(Hidroxibutirato), Poli-beta-(Hidroxibutirato-co-valerato) e Poli- ϵ -lactona em Solo Compostado. *Polímeros*, v. 12, n. 4, 2002.

ROSSI, J. R. Tecnologia para produção de inoculantes de fungos ectomicorrízicos utilizando cultivo submerso em biorreator airlift. 2006. **Tese** (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina/UFSC, Florianópolis/SC, 2006.

SANTOS, R. C. V. *et al.*. Prevalência e perfil de sensibilidade de microrganismos em infecções do trato urinário. **RBAC**, v. 35, n. 1, p. 27-8, 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 213 p.

SÁNCHEZ, J. *et al.*. Freeze concentration of whey in a falling-film based pilot plant: Process and characterization. **Journal of Food Engineering**. V. 103, p. 147-55. 2011.

SARAIVA, C. B.. Potencial poluidor de um laticínio de pequeno porte: um estudo de caso. 2008. 80 p. **Dissertação** (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa/UFMG, Viçosa/MG. 2008.

SHARMA, A. D.; SINGH, J.; GILL, P. K.. Ethanol mediated enhancement in bacterial transformation. *Electron. J. Biotechnol.*, v. 10, n. 1, p. 166-8, 2007.

SERPA, L. Concentração de proteínas de soro de queijo por evaporação a vácuo e ultrafiltração. 2005. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões-URI, Erechim/RS, 2005.

SCHNEIDER, C.H. Controle da drenagem ácida de minas na mineração de carvão de Santa Catarina: caso da Mina UM II - Verdinho. 2006. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia de Minas, Metalurgia e Materiais) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, 2006.

SCHNEIDER, A. L. D. S. Síntese, caracterização e biodegradação de poli-3-hidroxitbutirato - P(3HB) de *Rashtonia eutropha* e blends de P(3HB)/PCL (poli-E-caprolactona). 2006. **Tese** (Programa de Pós-graduação em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina/UFSC, Florianópolis/SC, 2006.

SCHNEIDER, R.P.; TSUTIYA, M.T. **Membranas filtrantes para o tratamento de água, esgoto e água de reuso**. São Paulo: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2001.

SGARBIERI, V.C. Proteínas em alimentos protéicos. São Paulo: Varela, 1996.

SIGMA. Reagentes bioquímicos e kits. 2012. Disponível em: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=pt&N4=I5502|SIAL&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC >. Acesso em: 03 de fevereiro de 2012.

SILVA, L. F. da *et al.*. Produção biotecnológica de poli-hidroxicanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. *Química Nova*, v. 30, p. 1732-43, 2007.

SILVA, D. J. P.. Diagnóstico do consumo de água e da geração de efluentes em uma agroindústria de laticínios e desenvolvimento de um sistema multimídia de apoio. **Tese** (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa/UFV, Viçosa/MG, 2006.

SILVEIRA, T.M.L. Comparação dos métodos de referência e de análise eletrônica na determinação da composição e da contagem de células somáticas do leite bovino. 2002. 42f. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG, 2002.

SIMMONS, M.J.H.; P; FRYER, Jayaraman, P.J. The effect of temperature and shear rate upon the aggregation of whey protein and its implications for milk fouling. *Journal of Food Engineering*. v.79, p 517-28, 2007.

SKELTON, R.. Membranes in food processing. *Filtration and Separation*. v. 37, n. 3, p. 28_30, 2000.

SOARES, D.S. *et al.*. Aproveitamento de soro de queijo para produção de iogurte probiótico. *Arg. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 63, n. 4, p. 996-1002, 2011.

- SOUZA, M.E. Fatores que influenciam a digestão anaeróbia. In: V SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÃO. 1982. Anais. Viçosa/MG, 1982.
- SOUZA, K. M.; ANDRADE, A. C.; ARAÚJO, E. H. Estudo da fermentação simultânea à hidrólise, de soro de queijo, utilizando lactase e *Saccharomyces cerevisiae*. In: VI CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2005.
- SQUIO, C. R.; ARAGÃO, G. M.F. de. Estratégias de cultivo para produção dos plásticos biodegradáveis poli(3-Hidroxitirato) e poli(3-hidroxitirato-co-3-hidroxitirato) por bactérias. *Quím. Nova*, v. 27, n. 4, 2004.
- SUDESH, K.; ABE, H.; Doi, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog. Polymer. Sci.*, v. 25, p. 1503-15, 2000.
- SUMNER, J. B. The estimation of sugar in diabetic urine using dinitrosalicilic acid. *Journal Biol. Chem.* v. 47, n. 5, 1921.
- STEINBÜCHEL, A. **Em polyhydroxyalkanoic acids**; Byrom, D. ed.; Macmillan Publishers: Basingstoke, 1991.
- STEINBÜCHEL, A. *et al.*. Synthesis and production of poly(3-hydroxyvaleric acid) by *Chromobacterium violaceum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v. 39, p. 443-9, 1993.
- STEINBÜCHEL, A., EVERSLOH, T. L. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*. v.16, p. 81-96, 2003.
- TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. 4ª ed. Guaíba: UFSM. 2010. 206p.
- YANG, S.; TANG, I.; OKOS, M. R. Defined Bacterial Culture Development for Methane generation from lactose. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 32, p. 28-37, 1998.

VALDUGA, E. *et al.*. Pré-tratamentos de melão de cana-de-açúcar e água de maceração de milho para a bioprodução de carotenóides. *Quím. Nova*, vol.30, n.8, p. 1860-6. 2007.

VEIGA, P. G.; VIOTTO, W. H.. Fabricação de queijo *petit suisse* por ultrafiltração de leite coagulado: efeito do tratamento térmico do leite no desempenho da membrana. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 21, p. 267-72. 2001.

VIEIRA, S. **Análise de variância: (ANOVA)**. São Paulo: Atlas, 2006. 204 p.

VIEGAS, C. P. R. Estudo da produção de polihidroxialcanoatos por *Chromobacterium violaceum*. 2005. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina/UFSC, Florianópolis/SC, 2005.

WALSTRA, P; JENNESS, R. **Química y Física Lactológica**. Zaragoza: Acribia, 1987.

WONG, H. H.; LEE, S. Y. Poly-(3-hydroxybutyrate) production from whey by high-density cultivation of recombinant *E. coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v. 50, 30-3, 1998.

WONG, Ming-Show *et al.* Visible-Light-Induced Bactericidal Activity of a Nitrogen-Doped Titanium Photocatalyst against Human Pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, n. 9, p. 6111-6, 2006.

ZUCCARI, M. L.; GRANER, C. A. F.; LEOPOLDO, P. R. Determinação da demanda química de oxigênio (DQO) em águas e efluentes por método colorimétrico alternativo. *Eneg. Agríc.*, v. 20, n. 4, p. 69-82, 2005.

ANEXOS

ANEXO 1 - CURVA DE CORRELAÇÃO ENTRE FREQUÊNCIA X VAZÃO DE ALIMENTAÇÃO DE ÁGUA PURA DA UNIDADE DE FILTRAÇÃO (MEMBRANA DE ULTRAFILTRAÇÃO).

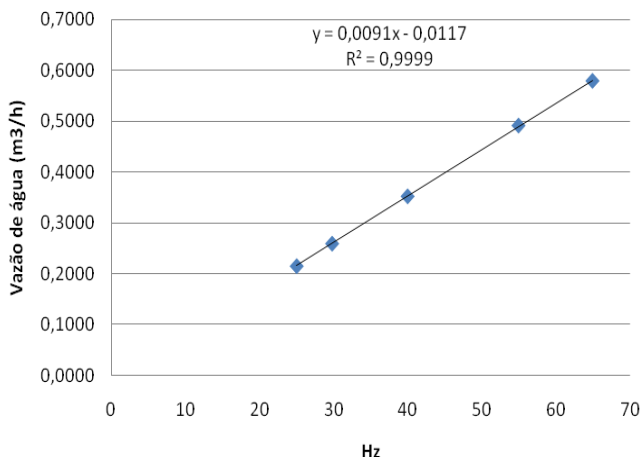


Figura 28 - Curva padrão da relação frequência (Hz) com a vazão de alimentação de água pura da unidade de filtração (membrana de ultrafiltração).

ANEXO 2 - PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

Procedimentos prévios

- Preparar placas com meio LB Agar estéril.
- Esterilizar materiais (ponteiras de 1 mL, ponteiras de 100 μ L, microtubos de 1,5 mL, tubos com tampa e rosca com meio LB, CaCl (1 M) gelado.
- Preparar gelo para banho de gelo.

Equipamentos

- Centrífuga para microtubos.
- Câmara de fluxo laminar.
- *Shaker*.
- Banho-maria.

Preparação de células competentes

- Cultivar as células por aproximadamente 3 horas em meio LB (ou *over night*).
- Coletar 3 mL (2 microtubos) e centrifugar a 4000·g, durante 15 min a 4 °C.
- Descartar o sobrenadante.
- Ressuspender em 3 mL de CaCl₂ 0,1 M gelado e esterilizado.
- Centrifugar novamente a 4000·g, durante 15 min a 4 °C.
- Descartar o sobrenadante.
- Ressuspender em 0,3 mL de CaCl₂ 0,1 M gelado e esterilizado.
- Adicionar 0,2 mL (200 μ L) em microtubo para inserção do DNA plasmidial.

Transformação

- Adicionar 5 μ L de DNA plasmidial e manter em banho de gelo por 30 min.
- Submeter a choque térmico a 42 °C por apenas 45 segundos.
- Resfriar novamente em banho de gelo durante 5 min.
- Adicionar 800 μ L de meio LB.
- Incubar a 37 °C durante 60 min para recuperação.
- Centrifugar a 4000·g, durante 10 min a 4 °C.
- Descartar o sobrenadante.
- Ressuspender em 100 μ L de meio LB.

- Inocular $50 \mu\text{L}$ em cada placa de petri (meio LB sólido com Ampicilina ($50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), glicose (5 %) e IPTG (0,5 mM)).
- Incubar a 37°C *over night* para crescimento.

ANEXO 3 - PROTOCOLO PARA DETERMINAÇÃO DE LACTOSE POR TÉCNICAS DE DNS – AÇÚCARES REDUTORES (SUMNER, 1921 adaptado por MILLER, 1959)

Introdução

Segundo Miller (1959), a metodologia tradicional utilizada para açúcares redutores pode sub quantificar a glicose em função da presença do “sal de Rochelle” (solução de tartarato duplo de sódio e potássio) na solução de DNS. Desta forma, o autor sugere a separação das soluções, obtendo-se uma solução “A” e uma solução “B”.

Solução “A” - DNS

- 1% de DNS (3,5-dinitro salicilato).
- 0,2% de fenol.
- 0,05% de sulfito de sódio.
- 1% de NaOH.
- Água destilada.

Para o preparo da solução “A”, deve-se preparar uma solução parcial com NaOH, para posterior adição do DNS e fenol.

Para preparação de 250 mL de solução “A”: adiciona-se 2,5 g de NaOH em 200 mL de água destilada sob aquecimento e agitação. Adiciona-se à esta solução, 2,5 g de DNS e 0,5 g de fenol. Após homogeneização, transfere-se para um balão de 250 mL e completa-se com água destilada.

O sulfito de sódio deve ser adicionado previamente ao uso na fração de solução a ser utilizada. Após a adição do sulfito de sódio, a solução não deve ser armazenada.

Solução “B” - Sal de Rochelle

- 40% de tartarato duplo de sódio e potássio.
- Água destilada.

Para preparação de 250 mL de solução “B”: adiciona-se 100 g de tartarato duplo de sódio e potássio em 100 mL de água destilada sob agitação. Após homogeneizar, transfere-se para um balão de 250 mL e completa-se com água destilada.

Observações

- As soluções devem ficar homogêneas após o preparo.
- Devem-se manter as soluções em frascos âmbar e/ou ao abrigo da luz, calor e umidade.

Análise de Lactose por DNS

- Transferir para tubos de ensaios 1,5 mL de cada amostra previamente diluída, incluindo a solução padrão. Adicionar 1,5 mL de solução de DNS e homogeneizar vigorosamente.
- Levar os tubos para banho-maria com água em ebulição e/ou em bloco de aquecimento para manutenção da temperatura em 100 °C.
- Após 15 min, retirar os tubos do aquecimento, adicionar 0,5 mL da solução “B” (tartarato duplo de sódio e potássio), resfriar em recipiente com água à temperatura ambiente e/ou banho-maria.
- Após resfriamento, ler em espectrofotômetro a 575 nm.
- A adição do fenol pode ampliar a faixa de leitura em 2,5 vezes.

Curva Padrão – Lactose

Tabela 22 - Curva padrão de lactose - DNS.

Identificação das amostras Solução padrão (100 g·L ⁻¹)	Quantidade de solução padrão 10 g·L ⁻¹	Quantidade de H ₂ O destilada	Quantidade e de DNS	Concentração obtida (g·L ⁻¹)
Branco	0 µL	1000 µL	1000 µL	0
I	100 µL	900 µL	1000 µL	10
II	200 µL	800 µL	1000 µL	20
III	300 µL	700 µL	1000 µL	30
IV	400 µL	600 µL	1000 µL	40
V	500 µL	500 µL	1000 µL	50
VI	600 µL	400 µL	1000 µL	60
VII	700 µL	300 µL	1000 µL	70
VIII	800 µL	200 µL	1000 µL	80
IX	900 µL	100 µL	1000 µL	90
X	1000 µL	0 µL	1000 µL	100
Teste	500µL	0 µL	500 µL	100