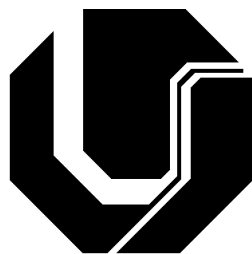


UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Produção de probióticos com *Lactobacillus*
imobilizados em alginato de cálcio
empregando soro de queijo**

**Paula Rúbia Ferreira Rosa
Uberlândia - MG
Fevereiro 2010**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Produção de probióticos com *Lactobacillus*
imobilizados em alginato de cálcio
empregando soro de queijo**

Paula Rúbia Ferreira Rosa

Orientador: Vicelma Luiz Cardoso

Co-Orientador: Ubirajara Coutinho filho

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Uberlândia – MG

2010

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM 12//02/2010.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^ª. Dra. Vicelma Luiz Cardoso
(Orientadora - PPGEQ/UFU)

Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho
(Co-Orientador PPGEQ/UFU)

Prof^ª. Dra. Fernanda Ferreira Freitas
(FEQ/UFU)

Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro
(PPGEQ/UFU)

Prof^ª. Dra. Mônica Lopes Aguiar
(PPGEQ/UFSCar)

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

R788p Rosa, Paula Rúbia Ferreira, 1981-
Produção de probióticos de *Lactobacillus* imobilizados em
alginato de cálcio empregando soro de queijo / Paula Rúbia
Ferreira Rosa. - 2010.

108 f. : il.

Orientador: Vicelma Luiz Cardoso.
Co-orientador: Ubirajara Coutinho Filho.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Química.

Inclui bibliografia.
1. Fermentação - Teses. I. Cardoso, Vicelma Luiz II.
Coutinho Filho, Ubirajara. III. Universidade Federal de
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Química. IV. Título.

CDU:

663.15

Dedico esta dissertação

Aos meus pais que sempre estiveram presentes e apoiando-me em toda minha vida acadêmica, meu irmão e cunhadinha, ao meu amor Octavio e à minha princesa Giovanna pelo amor e confiança durante a realização deste trabalho.

Agradecimentos

Acima de tudo, a bondade e a força infinita de Deus que é a Verdade, o Caminho e a Vida.

Aos meus queridos pais, Tânia Rosa e Vicente Rosa, agradeço pelo incomensurável amor, o incentivo e pela educação a cada dia. Amo vocês.

A meu marido, pela compreensão de permanecer distante durante este período, e apoio pelos valiosos incentivos.

A meu irmão Vicente Carvalho Rosa Jr e minha cunhada – irmã Mariana Dias Almeida, pela ajuda, dedicação e compreensão durante este período. Claro que, nesta hora de desfecho não poderia me esquecer de agradecer e reconhecer o quanto vocês foram importantes para que eu chegasse até aqui.

À minha prima do coração, Fernanda Ferreira Freitas, por todos os momentos em que compartilhamos todos os detalhes, nossas tristezas e as comemorações das nossas vitórias. Sua presença e colaboração foram essenciais para a realização deste trabalho.

À minha orientadora Prof^a Vicelma Luiz Cardoso obrigada pela orientação, amizade, dedicação, confiança em mim depositada durante todos estes anos de trabalho juntas. É uma pessoa que merece todo meu respeito e carinho pela sua simplicidade, competência e afeto dispensado durante toda convivência. A você, meus sinceros agradecimentos pela sua orientação e amizade.

Ao Prof. Ubirajara Coutinho Filho, co-orientador deste trabalho, pelo apoio, incentivo, amizade e compreensão no desenvolvimento deste trabalho, sua dedicação foi essencial nesta etapa final. Serei eternamente grata.

Ao Engenheiro Édio José pelo apoio e empenho nesta etapa final. Muito obrigada.

Aos meus familiares, obrigada pela força, por todos os momentos felizes e pelo carinho especial.

As alunas de iniciação científica Elisângela Maia e Laiane Andrade por terem dedicado tanto tempo a este trabalho e por alegrarem nosso ambiente de trabalho. Meus sinceros muito obrigado pela amizade adquirida ao longo destes anos, e sucesso na carreira futura.

Às companheiras de laboratório: Thályta, Christiane, Juliana, Maurielem e Carla pela dedicação à pesquisa .

Ao Silvino Corrêa, Cleide Lúcia, José Henrique e Tiago pela eficiência e por estarem sempre prontos a ajudar.

Às funcionárias Zuleide Fereira, Roberta Alves, Cleuzilene Vieira da Silva e Lúcia Helena da Silva pelo auxílio no laboratório.

Ao Curso de Mestrado da Faculdade de Engenharia Química pela oportunidade e incentivo no meu crescimento profissional e pessoal.

À Cooperativa Agropecuária Ltda de Uberlândia (CALU), e Cargill pelo fornecimento do soro de queijo

Ao CNPq pela concessão de bolsa de estudo.

.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE SIMBOLOS	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT	vi
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 – A PRODUÇÃO DE LEITE	4
2.2 – SORO DE QUEIJO	7
2.2.1 - Alternativas para o aproveitamento do Soro de Queijo.....	9
2.2.2 - Qualidade do soro de queijo.....	13
2.2.3 - Uso de soro na alimentação animal	14
2.2.4 - Fabricação de soro em pó	16
2.2.5 - Crescimento celular em fermentações com soro de queijo em reator batelada	21
2.3 – PROBIÓTICOS, PREBIÓTICO E SIMBIÓTICOS.	222
2.3.1 - Formulações probióticos e simbióticas de acordo com a legislação	25
2.3.2 - Qualidade e eficácia dos probióticos	27
2.4– IMOBILIZAÇÃO CELULAR	28
Estudo da estabilidade das células imobilizadas e sobrevivência a baixos valores de pH.	
.....	30
2.5 – RAÇÃO PARA ALIMENTACAO ANIMAL	31
2.5.1- Aproveitamento de subprodutos e resíduos agroindustriais na produção de rações	
destinadas a alimentação de animais de estimação	31
2.5.2 - Processo de fabricação da ração	34
CAPÍTULO 3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1 - MICRO-ORGANISMOS	36
3.2 – MEIO DE CULTURA	36
3.3 – TESTES PRELIMINARES PARA AVALIAR O TEMPO DE FERMENTAÇÃO ..	37
Determinação da biomassa	38
3.4 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	38
Influência do pH, concentração de proteína e lactose no crescimento de micro-	
organismos viáveis.	40
3.5 – ESTUDO DE REPRODUTIVIDADE.....	444

3.6 – ESTUDO CINÉTICO	44
3.7 – IMOBILIZAÇÃO CELULAR	45
3.7.1 – Testes para a simulação da passagem pelo trânsito gastro- intestinal	46
3.7.1.1- Cálculo da taxa de sobrevivência na simulação das condições gástricas	47
3.7.2 – Estudo da qualidade do produto	47
3.8 – FORMULAÇÃO DA RAÇÃO	47
3.9 – MÉTODOS ANALÍTICOS.....	48
3.9.1 – Contagem de células viáveis	48
3.9.2 – Análise de lactose	50
3.9.3 – Análise de proteína	50
3.9.4 - pH	50
3.9.5 – Análise da composição da ração.....	51
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	52
4.1 - CARACTERIZAÇÃO DO SORO DE QUEIJO “ <i>IN NATURA</i> ”	52
4.2. TESTE PRELIMINAR	53
4.3. ANÁLISE DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL NO ERLLENMEYER	55
4.4. ANÁLISE DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL NOS FRASCOS DE PENICILINA	61
4.5 - ESTUDO DA REPRODUTIBILIDADE	69
4.6 - ANÁLISE CINÉTICA NA CONDIÇÃO OTIMIZADA	70
4.7 - IMOBILIZAÇÃO CELULAR.....	79
4.7.1 - O processo de imobilização	79
4.7.2- Avaliação da estabilidade das células imobilizadas pela resistência a acidez	80
4.7.3 Estudo da desativação térmica em condição otimizada	81
4.8 – FORMULAÇÃO DA RAÇÃO	82
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES	86
CAPÍTULO 6- SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	88
ANEXOS	889
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

FIGURAS

Figura 2.1 - Distribuição percentual de produtores e da produção de leite no Brasil (Fonte IBGE 2009).....	4
Figura 2.2- Distribuição dos estados produtores de leite no Brasil em milhões de litros por ano.	5
Figura 2.3 - Taxas anuais de crescimento da produção de leite na região Sudeste, no período de 1994 a 2003 (SEBRAE MG 2005).....	6
Figura 2.4 - Possibilidades de utilização do soro de queijo.....	11
Figura 2.5 - Fluxograma da fabricação de soro em pó (PISECKY E SORENSE, 1976).....	18
Figura 2.6 - Concentração de células em função do tempo de fermentação.	21
Figura 2.7 - Modelo da estrutura do gel de alginato de cálcio (ROUSSEAU et al, 2004).....	29
Figura 2.8 - Movimentação do setor (Alfa Pet 2005)	32
Figura 3.1 - <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i> e <i>Streptococcus thermophilus</i>	36
Figura 3.2- Foto do fermentador Biostat-B utilizado para realizar os ensaios.....	45
Figura 3.3 - Frascos contendo células imobilizadas em cloreto de cálcio.	46
Figura 3.4 - Células secas e imobilizadas.....	46
Figura 3.5 - Células imobilizadas secas	46
Figura 3.6 - Diluições feitas com MRS tubos (marrom) e com meio redutor (rosa), as setas indicam transferência de material com seringa para os diferentes frascos.....	49
Figura 3.7 - Série de doze metodologia de NMP.....	50
Figura 4.1 - Células de <i>Lactobacillus</i>	53
Figura 4.2 - Concentração de lactose, proteína e crescimento microbiano em função do tempo em erlenmeyer.....	54
Figura 4.3 - Concentração de lactose, proteína e crescimento microbiano em função do tempo em frascos de frascos de penicilinas	54
Figura 4.4 - Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta crescimento celular em erlenmeyer	58
Figura 4.5 - Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica a normalidade para a resposta crescimento celular em erlenmeyer	588
Figura 4.6 - Superfície de resposta e curva de contorno para o crescimento de micro-organismos em função da concentração de lactose e do pH nos reatores tipo erlenmeyer.....	59
Figura 4.7 - Superfície de resposta e curva de contorno para o crescimento de micro-organismo em função da concentração de lactose e de inóculo nos reatores do tipo erlenmeyer	60
Figura 4.8 - Superfície de resposta e curva de contorno para o crescimento de micro-organismo em função do pH e da concentração de inóculo nos reatores do tipo erlenmeyer..	61
Figura 4.9- Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta crescimento celular para reatores frascos de penicilina.....	64
Figura 4.10 - Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica a normalidade para a resposta crescimento celular para reatores frascos de penicilina.....	65
Figura 4.11 - Superfície de resposta e curva de contorno para o crescimento de micro-organismo em função da concentração de lactose e pH nos reatores do tipo frascos de frascos de penicilina.....	66
Figura 4.12 - Superfície de resposta e curva de contorno para o crescimento de micro-organismo em função da concentração de lactose e de inóculo nos reatores do tipo frascos de frascos de penicilina	67

Figura 4.13 - Superfície de resposta e curva de contorno para o crescimento de micro-organismo em função de pH e da concentração de inóculo nos reatores do tipo frascos de frascos de penicilina	68
Figura 4.14 - Perfil da concentração celular, concentração de proteína e concentração de lactose utilizando reator do tipo frasco erlenmeyer empregando como meio soro em pó diluído	71
Figura 4.15 - Perfil da concentração celular, concentração de proteína e concentração de lactose utilizando fermentador tanque agitado como meio soro em pó diluído	71
Figura 4.16 - Perfil da concentração celular, concentração de proteína e concentração de lactose utilizando fermentador tanque agitado como meio soro <i>in natura</i>	71
Figura 4.17- Ajustes dos diferentes modelos para reatores tipo erlenmeyer de 250 mL.....	73
Figura 4.18- Ajustes dos diferentes modelos no reator de 1800 mL com soro em pó.....	74
Figura 4.19- Ajustes dos diferentes modelos no reator de 1800 mL com soro <i>in natura</i>	74
Figura 4.20 - Esferas de alginato de cálcio úmidas com células imobilizadas.....	79
Figura 4.21 - Taxa de sobrevivência das células encapsuladas para diferentes tempos em condições ácidas pH=2,5 a $37 \pm 1^{\circ} \text{C}$	80
Figura 4.22 - Ensaio de desativação térmica, que mostra a redução do número de células viáveis em função do tempo para as temperaturas de 40, 60 e 70°C	82
Figura 4.23 - Ração fabricada.....	83
Figura 4.24 - Curva de umidade e perda de água em função do tempo para a Ração 1.	83
Figura 4.25 - Curva de umidade e perda de água em função do tempo para a Ração 2.	83
Figura A1 - Curva de calibração Lactose.....	90
Figura A2 - Curva de calibração com solução de BSA.....	92

TABELAS

Tabela 2.1 - Produção de Leite por Regiões.....	5
Tabela 2.2 - Composição média do leite de várias espécies.....	7
Tabela 2.3 - Principais componentes do extrato seco do soro de queijo " <i>in natura</i> ".....	8
Tabela 2.4 - Massa molecular das proteínas do soro de queijo.	8
Tabela 2.5 - Composição dos principais produtos do soro (%).....	9
Tabela 2.6 - Proporções para a mistura da ração com soro de leite integral (litros) para suínos em crescimento, com fornecimento de ração restrita, substituindo-se 20 ou 30% da ração por soro (quantidade a ser fornecida por animal por dia).....	15
Tabela 2.7 - Proporções para mistura da ração (kg) com soro de leite integral (litros) para porcas em gestação, substituindo-se 25% ou 50% da ração por soro (quantidade a ser fornecida por porca por dia)	16
Tabela 2.8 - Principais constituintes do soro de queijo em pó, em 100g de amostra.	17
Tabela 2.9 - Exemplos de modelos de crescimento celular.....	22
Tabela 2.10 - Micro-organismos utilizados comercialmente em probióticos	24
Tabela 2.11 - Dados do Setor Produtivo	32
Tabela 2.12 - Parâmetros físicos- químicos das rações.....	33
Tabela 3.1- Meio de cultura MRS.....	37
Tabela 3.2 - Esquema do Planejamento Composto Central a dois níveis com três variáveis.	39
Tabela 3.3 - Especificações do Soro em pó.....	41
Tabela 3.4 - Informação nutricional (porção de 100 gramas)	41
Tabela 3.5 - Matriz do Planejamento Composto Central da concentração de lactose, pH e concentração de inóculo no crescimento de micro-organismos viáveis.	422
Tabela 3.6 - Fórmula da Ração.....	48
Tabela 4.1 - Caracterização do soro de queijo " <i>in natura</i> " proveniente do queijo mussarela.....	52
Tabela 4.2 - Resultados de crescimento celular no erlenmeyer em NMP/mL em diferentes condições experimentais da matriz do planejamento composto central	56
Tabela 4.3 - Valores das variáveis obtidos com a regressão múltipla para o crescimento celular no erlenmeyer.....	57
Tabela 4.4 - Resultados de crescimento celular em diferentes condições experimentais de acordo com a matriz do planejamento composto central para a frascos de penicilina	62
Tabela 4.5 - Valores das variáveis obtidos com a regressão para o crescimento celular na frascos de penicilina.....	63
Tabela 4.6 - Ajustes dos diferentes modelos aos resultados de crescimento celular - reator de 250 mL.....	75
Tabela 4.7 - Ajustes dos diferentes modelos aos resultados de crescimento celular - reator de 1800 mL.....	76
Tabela 4.8 - Ajustes dos diferentes modelos aos resultados de crescimento celular - reator de 1800mL com soro <i>in natura</i>	77
Tabela 4.9 - Resultados das análises das Rações.....	84
Tabela A.2- Diluições a partir da solução mãe.....	92

Lista de Símbolos

$Y_{x/s}$	Coefficiente estequiométrico de conversão de substrato em células (g/g)
$Y_{p/S}$	Coefficiente estequiométrico de conversão de substrato em produto (g/g)
m	Coefficiente de manutenção (h^{-1} , s^{-1})
X	Concentração Celular g/L
S	Concentração de substrato (g/L)
k	Constante cinética de velocidade (s^{-1})
B	Constante de saturação de Contois (g/g)
R	Constante universal dos gases ($R=8,314J/mol.K$)
E_a	Energia de ativação de morte celular(J/mol)
A	Fator de frequência (s^{-1} , min^{-1})
k_0	Fator de frequência da lei de Arrhenius (s^{-1})
N	Número de células por volume (NMP/mL)
N_0	Número inicial de células (NMP/mL)
X_m	População celular de equilíbrio (g/L)
T	Temperatura absoluta (K)
t	Tempo (min, s)
D	Valor D de redução decimal (min, h)
μ	Velocidade específica de crescimento (h^{-1})
q_p	Velocidade específica de formação de produto (h^{-1})
α	Velocidade específica de morte celular (h^{-1})
μ_m	Velocidade máxima de crescimento celular (h^{-1})

RESUMO

O presente trabalho tem como objetivo produzir probióticos a partir de soro de queijo empregando culturas superconcentradas de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus thermophilus*, encapsuladas em alginato de cálcio e retidas em mistura nutritiva sólida com composição nutricional adequada para consumo animal como ração. Foram avaliadas as etapas que antecedem a produção da mistura sólida: fermentação e imobilização. Na fermentação do soro de queijo foi feita a otimização das variáveis concentração de lactose, pH e concentração de inóculo aplicando um planejamento composto central. Os experimentos foram realizados em reatores tipo erlenmeyer de 250 mL e frascos de penicilina de 50 mL, em mesa agitadora (100 rpm) e temperatura ambiente ($28 \pm 3^{\circ}\text{C}$). Nos testes preliminares utilizou-se soro *in natura* e no planejamento estatístico soro em pó. Os resultados dos testes preliminares mostram que o melhor tempo de fermentação foi de 36 horas para o erlenmeyer e 48 horas para os frascos de penicilina. Utilizando a técnica de superfície de resposta, para fermentações em erlenmeyer a concentração de lactose na região de otimização variou de 27 a 35 g/L, inóculo de 0,8 a 1,2 g/L e o pH 6 a 7. Já para reatores tipo frascos de penicilina a concentração de lactose na região de otimização variou de 30 a 38 g/L, inóculo de 1 a 1,4 g/L e pH de 6 a 7. Foi avaliada também a cinética da reação em uma condição da região otimizada (lactose = 33 g/L, pH = 6,5 e inóculo 1 g/L) em reatores tipo erlenmeyer e tanque tipo agitado, obtendo como resposta a concentração de 10^{10} NMP/mL de células viáveis. Os resultados obtidos mostraram comportamentos cinéticos muito próximos em relação ao crescimento celular, tendo assim uma boa reprodução dos dados. No processo de imobilização em alginato de sódio, foi obtida uma concentração de células viáveis da ordem de 10^{11} NMP/g. O estudo da estabilidade das células imobilizadas sob a ação de meio ácido mostrou que estas resistiram ao teste de acidez apresentando um valor D (tempo de redução decimal) de 62,5 min no pH 2,5 o que é suficiente para garantir a sobrevivência destas células até atingirem o intestino. O estudo da estabilidade térmica mostrou que as células tiveram uma energia de ativação da reação de morte celular de 73,76 kJ/mol. Quanto a avaliação das preparações nutricionais geradas, da combinação de nutrientes, tempo e temperatura de secagem necessários para que a ração produzida tenha especificação adequada para a comercialização mostrou que as células imobilizadas resistem às condições necessárias para o preparo destas formulações.

Palavras-chave: *Lactobacillus acidophilus*, imobilização, probiótico, soro de queijo, ração.

ABSTRACT

The purpose of the present study is to explore the use of cheese whey fermentation for the production of probiotic from super concentrated cultures of *Lactobacillus acidophilus* entrapped within dried calcium alginate gel beads and placed inside a nutritive solid medium which constitute an animal feed. The two steps before the animal feed production (fermentation and immobilization) were evaluated. Preliminary experiments in 50mL penicillin flasks reactor and 250 mL erlenmeyer reactors were realized in a rotary shaker at 100 rpm and a temperature of $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$. The best time for these experiments were 36h for the fermentation in 250 mL erlenmeyer reactor and 48h for the fermentation in 50 mL penicillin flasks reactor. The fermentation of cheese whey from powder cheese whey and in natura cheese whey were optimized through response surface methodology (central composite design) for concentration of lactose, pH, and inoculum size. The experiments in 250 mL reactor resulted in optimized variables: lactose concentration of 27-35 g/L, inoculum concentration of 0.8-1.2 g/L and pH 6 -7. The experiments in 50 mL reactor resulted in optimized variables: lactose concentration of 30-38 g/L, inoculum concentration of 1.0-1.4 g/L and pH 6 -7. In addition, the kinetics of reaction in optimized conditions (33 g/L of lactose, pH 6.5, and 1.0 g/L of inoculum) in 250mL erlenmeyer reactor and 1800 mL batch stirred tank reactor were evaluated. It was found the concentration of viable cells of 10^{10} MPN/mL in 1800 mL reactor and a close kinetic behavior, in relation to cellular growth, in 250 mL reactor shown the agreement of the results obtained by 250 mL fermentation and by 1800 mL fermentation. The dried calcium alginate immobilized cells presented $1.93 \cdot 10^{11}$ MPN/g of cells. Stability studies in acid conditions indicated that the immobilized cell at pH 2.5 presented D value of 62.5 min which allows these cells to survive from stomach fluid. The thermal stability study shows that the immobilized cells presented an activation energy of cell death of 73.76 kJ/mol. In respect to the study of animal feed preparation, the combined evaluation of nutrients, temperature, number of cells and drying time demonstrated that the preparation with immobilized cells have reached quality standards necessary for their designated category.

Key-words: *Lactobacillus acidophilus*, immobilization, probiotic, cheese whey, animal feed.

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

O Brasil é o sétimo maior produtor mundial de queijos com o total em 2005 de 480.000 toneladas, gerando aproximadamente 4,3 milhões de toneladas de soro de queijo (USDA, 2009) que, geralmente não é devidamente utilizado, podendo até representar problemas quando descartado sem tratamento. A produção mundial de soro de queijo é de aproximadamente 145 milhões de toneladas anuais, e no Brasil, a produção de soro em 2002 já ultrapassava os 3 milhões de toneladas de soro e é responsável pela geração em torno de 202.500 toneladas de lactose, 40.500 toneladas de proteínas, 13.500 toneladas de gorduras e 27.000 toneladas de sais minerais (SOUZA, 2007; DUMAIS et al 1991; RICHARDS, 1997; GIRALDO-ZUNIGA et al., 2002).

O soro de queijo tem basicamente três destinos principais. O primeiro é o processamento do mesmo a produtos como bebidas lácteas, produção de doces, salames e outros derivados que utilizam pequenas quantidades do mesmo pelo alto custo e a dificuldade de processá-lo. O segundo destino refere-se ao uso na alimentação animal, podendo ser utilizado na forma líquida ou seca. Finalmente, o terceiro destino seria o seu tratamento para posterior despejo no esgoto (CARMINATI, 2001).

Devido ao alto volume gerado de soro torna-se importante a busca de novas alternativas para reduzir o potencial de poluição do soro e os custos associados ao tratamento do mesmo como efluente. Entre atividades está o uso do soro em fermentação, pois o mesmo tem uma composição nutricional bastante apropriado para o metabolismo de diversos micro-organismos que consomem os nutrientes do soro de forma a reduzir a alta demanda química de oxigênio (DQO), cerca de 30.000 a 50.000 mg de oxigênio/L (aproximadamente 100 vezes maiores que o de um esgoto doméstico) e o volume gerado quando o soro torna efluente (RICHARDS, 2002).

Uma fábrica que produz em média 10.000 litros de soro por dia poderá poluir, o equivalente a uma população de 5.000 habitantes, pois o soro resultante da indústria queijeira é, na maioria das vezes, simplesmente descartado nos esgotos ou mananciais, ou utilizado esporadicamente como alimento animal e, no caso do descarte, gera uma poluição equivalente a população citada (RICHARDS, 2002).

Assim, pode-se inferir que o soro, antes de ser considerado apenas mais um componente dos efluentes das indústrias laticinistas, pode e deve ser aproveitado como complemento na alimentação humana e animal de diversas formas como na produção de probióticos. Estes representam formulações contendo micro-organismos vivos que exercem ação benéfica na flora microbiana de animais e humanos por estimularem a multiplicação de micro-organismos necessários ao bom funcionamento do organismo, inibirem a proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais e reforçarem os mecanismos naturais de defesa (STROMPFOVA et al, 2006; SCHAREK et al, 2005).

O uso de probióticos na alimentação animal é cada vez maior. Entre as diversas razões para este fato podem ser citadas a capacidade das células probióticas terem de melhorar o sistema imune animal, a melhora no ganho de peso por quilograma de ração consumida e a redução do uso de antibióticos e medicamentos na criação dos animais (TEIXEIRA et al, 2003, FEDALTO et al, 2002).

Um dos modos de utilização das células probióticas é a forma encapsulada que pode ser diretamente adicionada em rações. O uso de células probióticas encapsuladas reduz as mortes celulares e conseqüentemente na redução da viabilidade celular devido as condições de armazenamento, condições adversas do processamento do alimento e durante a própria ingestão dos alimentos. O processo de imobilização de probióticos surge como uma alternativa, pois as células imobilizadas apresentam uma maior resistência a ação dos fluidos biológicos associados ao processo digestivo, tem reduzida interação entre os micro-organismos e outros constituintes da preparação probiótica como, também, reduzida susceptibilidade a contaminação (KURTMANN et al 2009; PRASAD et al 2003; WANG, BOLEN, 1997; BASKAKOV, BOLEN, 1998).

Além da criação de animais destinados ao abate e produção de leite, o interesse no uso das células probióticas em rações também atinge a criação de animais de estimação. O mercado de alimentos para cães e gatos já movimenta hoje cerca de dois bilhões de reais no Brasil. Segundo a Associação Nacional dos Fabricantes de Alimentos para Animais (ANFAL, 2005), a produção de alimento industrializado para cães e gatos passou de 220 mil toneladas no ano de 1994 para 1.428.000 toneladas de ração em 2004; o valor previsto para 2005, de 1.502.000 toneladas, e o setor foi responsável por 12.000 empregos diretos somente na indústria.

Diante desse cenário nacional, a indústria é carente de informações referentes aos ingredientes das rações disponíveis no País. Dentre os principais ingredientes da ração estão: farinha de carne, farinha de osso, óleo vegetal, sais minerais e amido.

Capítulo 1 - Introdução

Neste contexto esse trabalho consiste na produção de probióticos a partir de soro de queijo empregando uma cultura contendo *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus thermophilus* encapsuladas em alginato de cálcio e retidas em mistura nutritiva sólida com composição nutricional adequada para consumo animal como ração.

Em decorrência, os objetivos específicos foram:

- estabelecer uma composição nutritiva e condições de fermentações adequadas para o uso do soro na produção das células probióticas;
- estudar a cinética da fermentação submersa destes micro-organismos em reatores com agitação mecânica;
- imobilizar as células em alginato de sódio ;
- avaliar a estabilidade das células imobilizadas em relação ao tempo de estocagem e ao trânsito intestinal;
- estudar a retenção das células imobilizadas em mistura nutritiva sólida com composição nutricional adequada para consumo animal como ração.

CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo são apresentados os fundamentos e alguns dos principais trabalhos publicados na literatura, relacionados a este estudo. Inicialmente é feita uma apresentação da produção de soro de queijo e das características do mesmo. Em seguida, são apresentados os probióticos bem como a descrição dos fundamentos relevantes ao seu processo de imobilização. Finalmente são mostrados os processos de fabricação das rações para animais de estimação.

2.1 – A PRODUÇÃO DE LEITE

A produção de leite registrou significativo crescimento nas últimas três décadas. O Brasil desponta hoje como o sexto maior produtor de leite do mundo, produzindo mais de 23 bilhões de litros por ano. Cerca de 66% do volume total de leite produzido no Mercosul é brasileiro. A perspectiva de manter o índice de crescimento nos próximos anos cria condições para o país mudar o perfil de importador para exportador de produtos lácteos (EMBRAPA, 2008).

A região Sudeste é a maior produtora de leite do país, seguida das regiões Sul, Nordeste, Centro-Oeste e Norte. A Figura 2.1 apresenta a distribuição percentual da produção do leite no Brasil e a Tabela 2.1 a produção de leite por regiões.

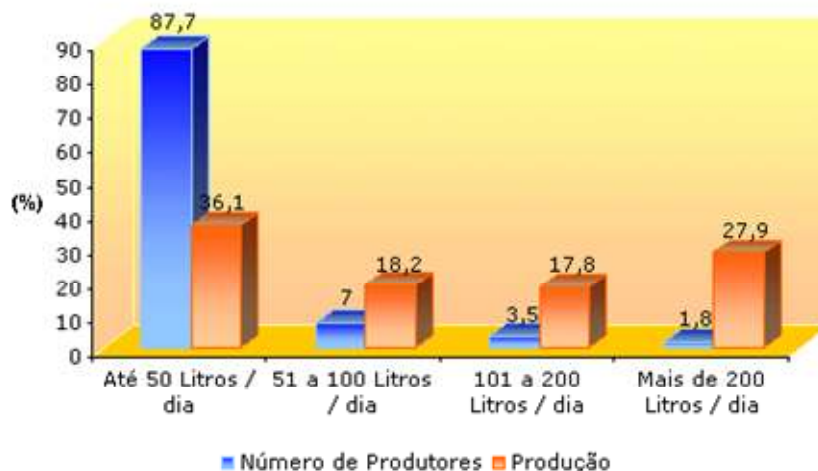


Figura 2.1 - Distribuição percentual de produtores e da produção de leite no Brasil
(Fonte IBGE 2009)

Tabela 2.1 - Produção de Leite por Regiões

REGIÃO	ATÉ 50 LITROS/DIA		51 A 100 LITROS/DIA		101 A 200 LITROS/DIA		MAIS DE 201 LITROS/DIA	
	%	%	%	%	%	%	%	%
	Produtores	Produção	Produtores	Produção	Produtores	Produção	Produtores	Produção
Norte	90,9	54,3	6,4	22,7	2,1	14,3	0,6	8,7
Nordeste	95,9	53,8	2,5	15	1,1	17,7	0,5	13,5
Sudeste	73,1	21,1	13,3	17	8,2	20,6	5,4	41,3
Sul	92,9	57,1	4,8	17,7	1,6	11,8	0,7	13,4
Centro Oeste	72,6	28,2	15,8	23,6	8,2	23,7	3,4	24,5
Brasil	87,7	36,1	7	18,2	3,5	17,8	1,8	27,9

Fonte IBGE 2009- Censo Agropecuário

Como o leite é um produto perecível, existe uma tendência de concentrar as indústrias de laticínios em regiões onde há um maior contingente populacional e, conseqüentemente, uma maior produção e consumo de leite. Neste contexto, as regiões do Triângulo e Alto do Paranaíba são potenciais candidatas a aumentar o número de laticínios instalados. Especificamente na cidade de Uberlândia, localizada na região do Triângulo Mineiro, predominam atividades agropecuárias. Nesta cidade, a Cooperativa Agropecuária Ltda de Uberlândia (CALU) é a maior produtora de leite da cidade e processa 200.000 litros de leite por dia, no período de safra, tendo como principais produtos finais: o leite dos tipos C e B (integral e desnatado); manteiga; queijo dos tipos mussarela, minas frescal, ricota, prato e parmesão (Jornal Correio de Uberlândia, 2009).

A Figura 2.2 apresenta a produção de leite por estado do país no ano de 2004 (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E DO ABASTECIMENTO, 2008, citando o INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2006).

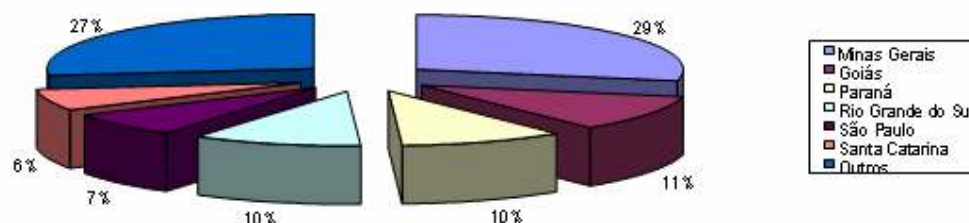


Figura 2.2- Distribuição dos estados produtores de leite no Brasil em milhões de litros por ano.

Entre os estados da região Sudeste, Minas Gerais teve a maior taxa de crescimento no período de 1994 a 2003, 3,01% ao ano, conforme mostra a Figura 2.3. Vale destacar que o Estado de São Paulo apresentou taxa de crescimento negativo (-1,83% ao ano), nesse período. Enquanto Minas consolidava sua posição de líder, São Paulo perdia posição na lista dos maiores produtores de leite. Na raiz deste fenômeno está o elevado custo de produção de leite em São Paulo, dado o alto custo de oportunidade da terra. Em contrapartida, Minas ampliava sua produção ao priorizar modelos de menor custo e dar ênfase à alimentação do gado à base de pasto (SEBRAE/MG - DIAGNÓSTICO DA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS DO ESTADO DE MINAS GERAIS, 2005).

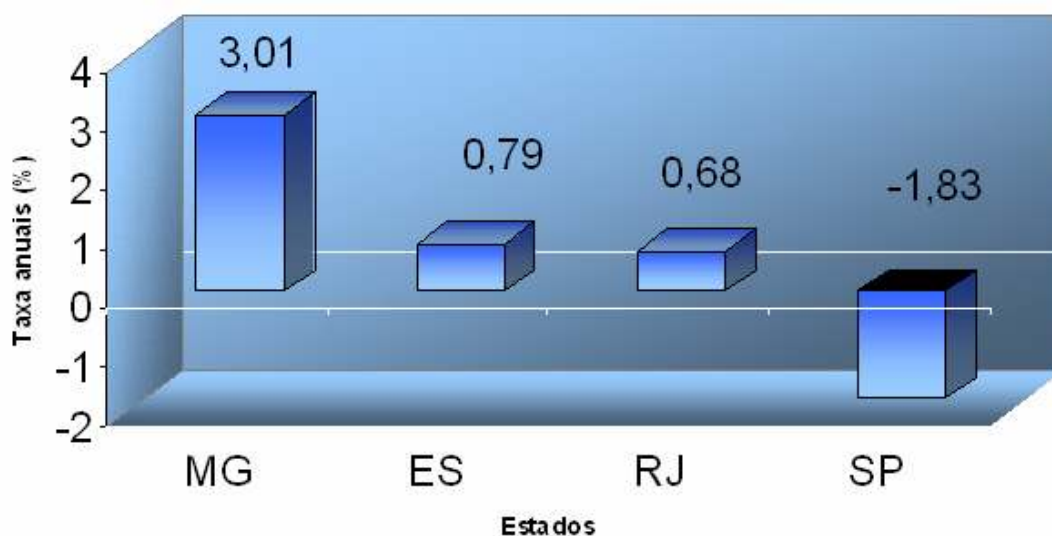


Figura 2.3 - Taxas anuais de crescimento da produção de leite na região Sudeste, no período de 1994 a 2003 (SEBRAE MG 2005).

Entre todos os estados brasileiros, Goiás apresentou a maior taxa de crescimento na produção de leite no período de 1994 a 2003, ou seja, 6% ao ano. Este estado sobressaiu-se por produzir leite a baixo custo pelas seguintes razões: baixo preço da ração concentrada, abundância de grãos e baixo custo de oportunidade da terra (SEBRAE/MG - DIAGNÓSTICO DA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS DO ESTADO DE MINAS GERAIS, 2005).

A produção de leite no estado de Goiás foi maior que seu consumo, o que resultou na exportação para outros estados. A proximidade de Minas com Goiás facilitou a exportação de leite goiano para indústrias laticinistas mineiras, assim como a presença de indústrias de grande porte que captam leite nos dois estados, como a DPA (Dairy Partners Americas) e a

Itambé (SEBRAE/MG - DIAGNÓSTICO DA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS DO ESTADO DE MINAS GERAIS, 2005).

A composição do leite varia de acordo com a espécie, raça, individualidade, alimentação, entre outros fatores. Em média o leite é formado por 7/8 de água e 1/8 de substâncias sólidas, conhecido como extrato seco, onde se encontram as substâncias nutritivas do leite. A Tabela 2.2 mostra uma composição aproximada do leite para diferentes tipos de espécies animais.

Tabela 2.2 - Composição média do leite de várias espécies.

Espécie	Proteína (%)	Gordura (%)	Lactose (%)	Cinzas (%)
Humana	1,2-1,5	3,5-3,8	7,0	0,2
Bovina	3,5	3,7-3,8	4,8-5,0	0,7
Caprina	3,6-4,0	4,0-4,1	4,7-4,8	0,8
Ovina	5,4-5,8	7,9-8,2	4,5-4,8	0,8-0,9
Eqüina	2,2-2,6	1,6-1,7	6,1-6,2	0,4-0,5
<i>Búfala</i>	<i>4,0-4,1</i>	<i>7,5-7,7</i>	<i>4,8</i>	<i>0,7</i>

Fonte: AQUARONE et al. 2001; DAIRY PROCESSING HANDBOOK, 1995

Os principais produtos derivados do leite que podem contribuir como uma fonte alternativa de consumo e comercialização são: iogurte, requeijão, diversos tipos de queijos, manteiga e doce de leite.

2.2 – SORO DE QUEIJO

O soro é um subproduto do leite, obtido durante a produção de queijo ou de caseína. Consiste em cerca de 80-90% do volume de leite utilizado para a produção de queijo e contém cerca de 50% dos nutrientes do leite que o originou, tais como: proteínas solúveis, lactose, vitamina e minerais (DAIRY PROCESSING HANDBOOK, 1995).

O soro tem composição global semelhante à do leite privado de caseína. É um produto líquido cujo teor em água varia entre 91 e 95%. A quantidade de extrato seco do soro de queijo é reduzida e representa em média 7% do peso total. Este extrato, no entanto, é bastante rico e sua composição média em peso é mostrada na Tabela 2.3.

Tabela 2.3 - Principais componentes do extrato seco do soro de queijo “*in natura*”.

Componente	Composição (em peso)
Lactose	70 a 80%
Compostos nitrogenados	10 a 14%
Sais minerais	1,5 a 4,0%
Lipídeos	0,05 a 0,6%

Fonte: (VILANI, 2001)

As frações protéicas do soro são heterogêneas, como mostra a Tabela 2.4. Normalmente, o soro é constituído de 12,0% de α -lactoalbumina, 50,0% de β -lactoglobulina, 5,0% de albumina do soro bovino, 10,0% de imunoglobulina e 20,0 % de protease-peptona, que são produtos da degradação proteolítica da caseína. O soro de queijo é constituído de outros tipos de proteínas, sendo a lactoferrina, serotransferrina e β -microglobulina as mais significantes (RIBEIRO, 2000).

Tabela 2.4 - Massa molecular das proteínas do soro de queijo.

Constituintes	Massa Molecular (Daltons)
A -lactoalbumina	14.200
A -lactoglobulina	18.400
Albumina do Soro Bovino	66.000
Imunoglobulina G	160.000
Protease-peptona 8f	41.00
Protease-peptona 8s	99.00
Protease-peptona 5	12.300
Protease-peptona 3	22.000

Fonte: (VILANI, 2001)

As matérias minerais mais importantes do soro são: cálcio (500 a 725 mg/100g), sódio (650 a 950 mg/100g), magnésio (880 a 1600 mg/100g), potássio (2.400 a 2.900 mg/100g) e fósforo (700 a 800 mg/100g) (VILANI, 2001).

O soro é também bastante rico em vitaminas hidrossolúveis, tais como: riboflavina (1,37 a 1,86 mg/L), ácido pantotênico (3,85 a 4,26 mg/L), tiamina (0,38 a 0,40 mg/L), piridoxina (0,39 a 0,44 mg/L) e ácido ascórbico (0,20 a 0,26 mg/L) (AGUILERA, 1995).

A composição do soro varia com a natureza do leite utilizado, com as perdas dos seus constituintes durante a fabricação do queijo, com o tipo de queijo a ser produzido, com o tratamento térmico, com o processamento e outros fatores (SPURGEON, 1976). A Tabela 2.5

apresenta a variação da composição dos principais produtos do soro de queijo disponíveis comercialmente.

Tabela 2.5 - Composição dos principais produtos do soro (%).

Produto	Proteína	Gordura	Lactose	Cinzas
Soro doce em pó	11,0-14,5	1,0-1,5	63,0-75,0	8,2-8,8
Soro ácido em pó	11,0-13,5	0,5-1,5	61,0-70,0	9,8-12,3
Soro des-lactosado	18,0-24,0	1,0-4,0	52,0-58,0	11,0-22,0
Concentrado protéico	34,0-82,0	0,2-10,0	4,0-5,2	4,0-8,0
Lactose	0,01-1,0	0,0-0,1	Mínimo 98,0	0,03-0,5
Isolado protéico	90,0-92,0	0,5-1,0	0,5-1,0	2,0

Fonte: USDEC, 2009

2.2.1 - Alternativas para o aproveitamento do Soro de Queijo

O termo soro de leite designa produtos com características variáveis de acordo com a forma que o mesmo foi originado. Há soros gerados como subprodutos do processamento de queijos, da caseína e de outros produtos lácteos acidificados, sendo que no Brasil o da fabricação de queijos constitui a quase totalidade do soro produzido. O tipo de soro disponível orienta o seu aproveitamento. Basicamente, os principais tipos de soro são (DAIRY PROCESSING HANDBOOK, 1995):

- soro da fabricação de queijos frescos (o menos afetado pelas culturas lácticas): possui intacta toda a lactose e é pobre em enzimas e substâncias aromáticas. Este tipo de soro é considerado, normalmente, o mais nobre;
- soro da fabricação de queijos de massa lavada: basicamente constituído de dois tipos. O primeiro retirado antes da adição de água e o segundo com adição de água (uma quantidade variável de até 35%);
- soro da fabricação de queijos de leite pré-maturado, acidificado pela adição de cultivos lácticos durante o processo de fabricação. Estes tipos de soros variam muito, dependendo dos processos fermentativos, com cultivos mais ou menos ativos, proteolíticos e suas condições no momento de aproveitamento e modo de processá-los;

- soro da produção de caseinatos;
- soro da produção de massa para requeijões, Quark, Petit suisse, etc. Este soro é muito ácido e pode ser destinado à alimentação animal (aproveitamento menos nobre), ou ser aproveitado com o uso de tecnologias apropriadas para produção de ricota e bebidas lácteas, lactose e concentrados protéicos destinados ao uso humano direto ou ao uso como matéria-prima em indústrias diversas.

O soro ácido é mais rico em cálcio e fosfato do que o soro doce, devido à ação dissolvente dos íons de hidrogênio sobre o fosfato de cálcio da caseína (VILANI, 2001).

Os produtos obtidos a partir do soro de queijo podem, de acordo com o tipo de processo a que são submetidos, ser designados como líquido, concentrado, seco (em pó) e modificado. O soro concentrado é a substância resultante obtida a partir da remoção total ou parcial da água. O soro modificado constitui uma classe de produtos obtidos a partir do soro, por meio de diferentes processos e procedimentos (SOUZA, 2007).

Antunes (2003) descreve vários produtos de soro comercialmente disponíveis:

- concentrado de soro com lactose reduzida: são produtos especiais com menos de 1% de lactose, obtidos por hidrólise enzimática ou por separações físicas, como precipitação ou filtração;
- soro com minerais reduzidos: produto obtido pela remoção seletiva de uma parte dos minerais do soro. O produto seco não pode ter mais que 7% de cinzas. Os processos utilizados para a obtenção destes produtos são a trocas iônicas, eletrodialise ou filtração por membranas;
- concentrados protéicos de soro de queijo: produto obtido pela remoção de constituintes não protéicos do soro, de forma que o produto final contenha pelo menos 25% de proteína;
- isolados protéicos do soro de queijo: é a forma mais pura das proteínas encontrada comercialmente e contém cerca de 90 a 95% de proteínas. É produzido por processo de troca iônica como pré tratamento, realizado antes do processo de ultrafiltração.

A crescente preocupação em melhor aproveitar os recursos naturais evitando prejuízos ao meio ambiente faz com que haja uma busca sempre maior na introdução de novos produtos e novas tecnologias que visam à melhoria de processos, diminuindo os custos de produção e agregando valores aos resíduos de potencial comercial.

A utilização de proteínas do soro como ingredientes funcionais é um exemplo destas novas tecnologias que torna possível desenvolver produtos com características especiais e agregar valores a subprodutos que com frequência representam problema para as indústrias, como é o caso do soro de queijo. No Brasil, por exemplo, o soro resultante da indústria queijeira é, na maioria das vezes, simplesmente descartado nos esgotos ou mananciais, ou utilizado esporadicamente como alimento animal. Além de representar um problema em termos de poluição ambiental, deixa-se de empregar um produto nobre em aplicações que lhe agregariam maior valor comercial (ANTUNES, 2003).

A Figura 2.4 mostra as diversas possibilidades de utilização do soro de queijo na indústria alimentícia e farmacêutica. Estas formas de aproveitamento do soro de queijo são importantes do ponto de vista econômico e nutricional, e freqüentemente pode ser operada com menor custo (RIBEIRO, 2000).

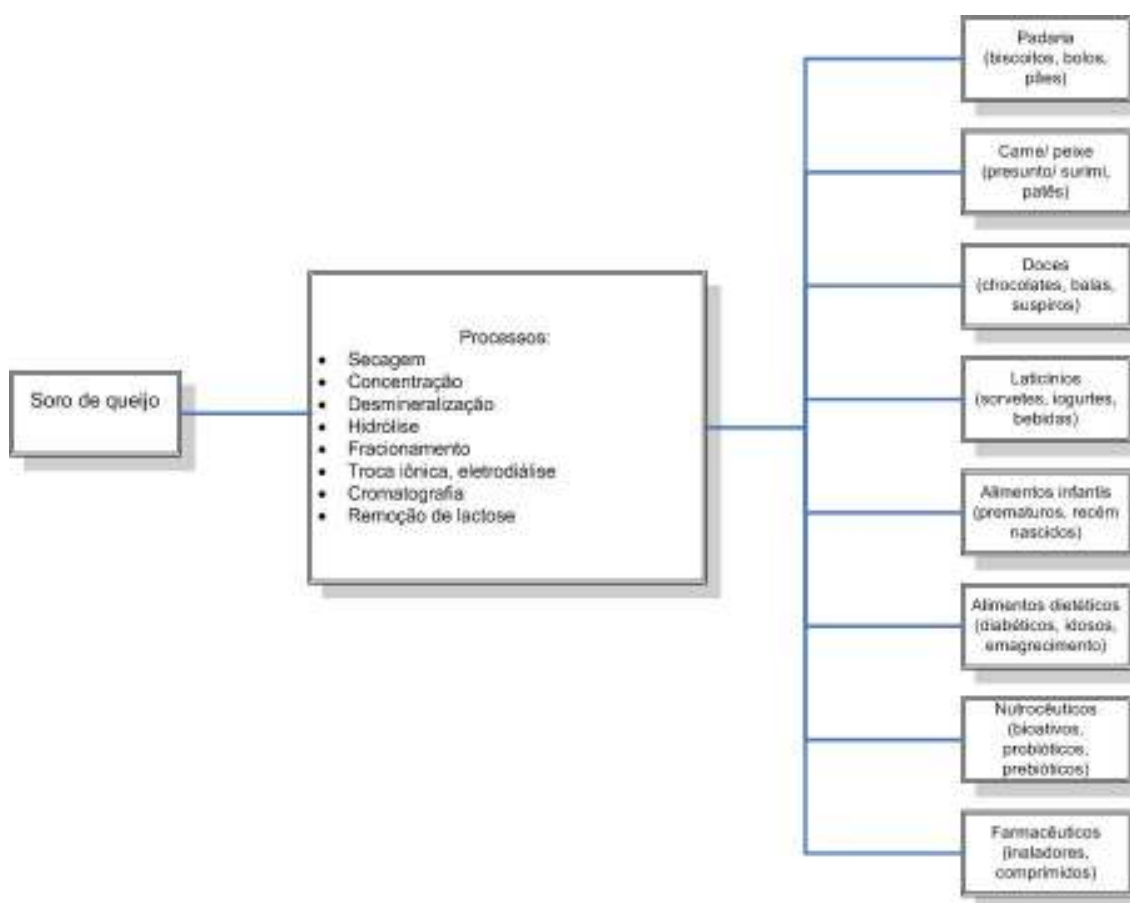


Figura 2.4 - Possibilidades de utilização do soro de queijo.

Ingredientes alimentares são usados para acrescentar e/ou aumentar valor nutricional, sabor ou funcionalidade. As proteínas do soro têm sido usadas como suplemento nutricional, pois possuem alto valor biológico. Os componentes não protéicos, tais como lactose, têm, também, propriedades nutricionais e funcionais. A lactose aumenta a viscosidade e altera a textura de vários alimentos (MADRONA, 2007).

Algumas das razões que promoveram a utilização cada vez mais frequente das proteínas de soro na fabricação de produtos nutricionais, energéticos e de produtos lácteos fermentados acidificados são (DALLAS e LAGRANGE , 1998) :

- a alta digestibilidade;
- o equilibrado perfil de aminoácidos em sua composição;
- os elevados níveis de aminoácidos essenciais;
- a ausência de substâncias tóxicas;
- os efeitos fisiológicos excepcionais e desejáveis;
- sua funcionalidade superior em alimentos lácteos acidificados;
- sabor e aroma suave.

A forma mais comum de utilização deste subproduto da fabricação de queijos nos países desenvolvidos é a produção de soro em pó ou ingredientes como lactose, concentrados protéicos de soro, etc. Em muitos países os principais destinos do soro são: para alimentação animal, bombeado para os esgotos e utilizado para irrigação do solo (DALLAS e LAGRANGE, 1998).

Os componentes do soro são indicados para todos os produtos lácteos por possuírem propriedades funcionais como a capacidade de formação de gel, viscosidade, poder emulsificante, capacidade de retenção de água, que conferem uma série de benefícios estruturais e nutricionais ao produto final (BELLARDE et al, 1996).

GIROTO e PAWLOWSKY (2001) avaliaram as alternativas para o beneficiamento do soro de leite e concluíram que os laticínios do Estado do Paraná utilizaram o soro de leite apenas na produção de bebidas lácteas e na produção de soro de leite em pó, demonstrando que não o utilizam na sua totalidade. As indústrias de laticínios do estado do Paraná, caso utilizassem mais este derivado lácteo na produção de soro em pó ou seus derivados, poderiam incorporar em seus ganhos valores consideráveis, bem como contribuiriam para a redução de importação.

Os valores de DBO do soro alcançam 30.000 - 60.000 mg/L, dependendo do processamento específico utilizado na fabricação de queijo e do conteúdo de lactose (REVILLION, 2002). Comparativamente, cada 5.000 litros de soro de queijo processados em uma Estação de Tratamento de Esgotos equivalem ao tratamento de despejos de 2.000 pessoas (PONSANO et al, 1995).

2.2.2 - Qualidade do soro de queijo

Para que se possa aproveitar o soro de queijo produzido são necessários cuidados no sentido do atendimento às exigências de qualidade das indústrias processadoras de soro.

Não existe via de regra no Brasil uma preocupação, por exemplo, com a aplicação de baixas temperaturas ou concentração com o objetivo de buscar uma maior conservação e estabilidade do mesmo. As indústrias não percebem o soro como provável fonte de renda. Ao contrário, ele é visto como fator de custo, o que impede qualquer ação de incorporação tecnológica e orienta para a simples deposição ou descarte deste material (DALLAS e LAGRANGE, 1998).

Os valores fixados na análise média para o soro são, certamente, os ideais para a fabricação de concentrados protéicos e lactose. Uma variação de $\pm 0,5\%$ é normal. As especificações citadas abaixo são as usadas em uma grande indústria alemã de laticínios (DALLAS e LAGRANGE, 1998):

- teor de gordura: máx 0,2%;
- massa seca: min 6,2%;
- pH: min 6,1;
- acidez: máximo 5,0 Soxlet;
- temperatura: $< 10^{\circ}\text{C}$ na entrega;
- nitrato: negativo;
- nitrito: negativo;
- sódio: máx 45mg/100g;
- *Bacillus cereus*: máx 10/mL;
- exigências gerais: livre de pó de caseína;
- exigências visíveis: o soro não pode mostrar qualquer alteração significativa

em seu aspecto externo, cheiro ou gosto.

É necessário que os laticínios brasileiros comecem a se preocupar com a qualidade deste subproduto. A caracterização do soro de queijo e sua padronização são importantes para que se possa utilizá-lo como matéria-prima de qualidade.

2.2.3 - Uso de soro na alimentação animal

A forma mais simples de utilização do soro de queijo é sem dúvida a do fornecimento direto deste produto aos animais, principalmente suínos. Entretanto, esta utilização deve seguir alguns cuidados e orientação tecnológica adequada, já que o produto pode passar de adequado a inadequado, acarretando problemas de ordem fisiológica e em casos extremos, até a morte do animal (OLIVEIRA, 1978).

A utilização do soro para alimentação animal já é praticada de forma tradicional. É comum ser observado nas visitas as unidades produtivas mais antigas, a construção das pocilgas, em áreas próximas aos laticínios, já se pensando no descarte do soro gerado. Muitos estudos têm sido desenvolvidos buscando melhor identificar formas mais adequadas de utilização do soro na alimentação, bem como o volume máximo a ser ofertado por cabeça. As características energéticas do soro e o alto valor biológico de suas proteínas recomendam o seu uso, embora com algumas restrições.

As vantagens e desvantagens desta utilização podem ser resumidas da seguinte forma (BERTOL e SANTOS FILHO, 1996):

Vantagens:

- o soro é um alimento altamente nutritivo, com digestibilidade da proteína superior à do milho e do farelo de soja;
- o soro apresenta alta palatabilidade, sendo consumido voluntariamente em grandes quantidades;
- com a utilização do soro poderá ocorrer melhora na qualidade da carcaça, desde que o seu fornecimento seja acompanhado por dietas adequadamente balanceadas;
- poderá ocorrer redução substancial do custo da alimentação com a utilização do soro, dependendo do meio de transporte utilizado; da distância entre a granja e o laticínio e da quantidade de soro transportada.

Desvantagens:

- caso as instalações não permitam o fornecimento automático do soro, há aumento da mão-de-obra;
- maior depreciação das instalações, pois o soro dissolve o concreto e corrói o metal, sendo esta corrosão tanto maior quanto mais ácido for o soro;
- maior umidade no ambiente o que aumenta o desconforto dos animais na época fria;
- pode aumentar a ocorrência de mortes de animais próximo à idade de abate, por torção do mesentério, em função da alta produção de gases no intestino, e pela síndrome das vísceras hemorrágicas;
- aumento do teor de água das fezes, o que eleva o volume e reduz a consistência dos dejetos podendo aumentar a poluição ambiental;
- redução do consumo volumétrico de soro em épocas frias. Com isso, os animais submetidos à restrição de ração poderão ter seu consumo de matéria seca reduzido, prejudicando o desempenho.

As Tabelas 2.6 e 2.7 mostram os resultados obtidos em pesquisas realizadas com porcas em gestação e animais em crescimento e terminação para o uso de soro integral em substituição parcial da ração ofertada/dia (BERTOL e SANTOS FILHO, 1996).

Tabela 2.6 - Proporções para a mistura da ração com soro de leite integral (litros) para suínos em crescimento, com fornecimento de ração restrita, substituindo-se 20 ou 30% da ração por soro (quantidade a ser fornecida por animal por dia).

Peso vivo do animal (kg)	100% da ração (kg)	80% ração/20% soro		70% ração/30% soro		Número de dias
		Ração(kg)	Soro(L)	Ração(kg)	Soro(L)	
25 - 35	1.500	1.200	5	1.050	7	15
35 - 45	1.500	1.500	6	1.350	8	15
45 - 55	2.200	1.750	7	1.550	10	15
55 - 65	2.600	2.100	8	1.800	12	12
65 - 75	2.900	2.300	9	2.050	13	12
74 - 85	3.200	2.550	10	2.250	14	12
85 - 95	3.500	2.800	11	2.450	15	12

Fonte: BERTOL e SANTOS FILHO, 1996

Tabela 2.7 - Proporções para mistura da ração (kg) com soro de leite integral (litros) para porcas em gestação, substituindo-se 25% ou 50% da ração por soro (quantidade a ser fornecida por porca por dia).

Dias de gestação	100% ração	75% ração/25% soro		50% ração/50% soro	
		Ração(kg)	Soro(L)	Ração(kg)	Soro(L)
1 - 90	2.000	1.500	7	1.000	14
91 - 105	2.500	1.900	9	1.250	18
106	2.500	2.000	7	1.500	14
107	2.500	2.100	6	1.750	11
108	2.500	2.200	4	2.000	7
109	2.500	2.300	3	2.250	4
110 - 114	2.500	2.400	2	2.400	2

Fonte: BERTOL e SANTOS FILHO, 1996

Os estudos realizados até o momento apontam de uma forma mais global que são necessárias aproximadamente de 2.000 a 2.500 cabeças para o consumo de um volume de aproximadamente 36.000 litros de soro/dia.

2.2.4 - Fabricação de soro em pó

Segundo dados da SOORO (2008), o consumo de soro de queijo em pó no Brasil é cerca de 62.000 toneladas por ano. A produção nacional é de 22.000 toneladas, correspondendo a 35,5% do consumo total, o que leva a uma importação de 64,5% do produto final.

O soro de queijo, matéria prima de grande valor nutritivo é perecível e requer um tratamento específico por parte das indústrias que o geram. De seu tratamento adequado pode resultar a sua melhor utilização e maior conservação. A secagem do soro tem como objetivo maior a sua conservação já que a redução da umidade pode inibir crescimentos bacterianos e reações químicas, permitindo a sua conservação por longo período (DALLAS e LAGRANGE, 1998). Decorre também o fator econômico no que se refere ao custo de transporte, já que é expressiva a redução de volume do material como um todo.

A diferença básica na composição do soro fresco e do soro em pó é que o soro fresco apresenta uma relação proteína: lactose aproximada de 1:5 a 1:6, enquanto o soro em pó tem relação 1:7,2 (BANYs et al., 2001).

Na Comunidade Econômica Européia, aproximadamente 45% do soro gerado tem sido utilizado na forma líquida, 30% na forma de soro de leite em pó, 15% como lactose e

derivados desta e 10% usado na produção de proteína concentrada. Os Estados Unidos da América são os maiores produtores mundiais de soro em pó e derivados (GIROTO e PAWLOWSKY, 2001).

BRIÃO e TAVARES (2005) estudaram a geração de efluentes na indústria de laticínios e observaram que os produtos secos (leite em pó e soro em pó) são os maiores geradores de DBO, nitrogênio e fósforo, enquanto os produtos apresentados sob a forma fluida (leite longa vida UHT, formulados UHT, leite pasteurizado, creme de leite pasteurizado) e manteiga produzem óleos e graxas em maior quantidade.

A Tabela 2.8. apresenta a composição centesimal do soro de queijo em pó. Na Figura 2.5 encontra-se o fluxograma de produção de soro em pó.

Tabela 2.8 - Principais constituintes do soro de queijo em pó, em 100g de amostra.

CONSTITUINTES	SORO DE QUEIJO
Calorias (kcal)	350
Proteínas (g)	11
Matéria graxa (g)	1
Lactose (g)	74
Cálcio (mg)	796
Sódio (mg)	1080
Ferro (mg)	0,9

Fonte: ALIBRA (2006)

Na fabricação de soro em pó têm-se as seguintes etapas (DENDER, 1997):

I – Recepção do soro

O soro produzido em condições higiênicas adequadas é transportado para a indústria de beneficiamento em caminhões-tanque com controle de temperatura, após a sua pasteurização e resfriamento. Quando da sua chegada na recepção, efetiva-se o controle de sua qualidade através da realização de ensaios químicos e físicos (controle da temperatura e verificação do pH).

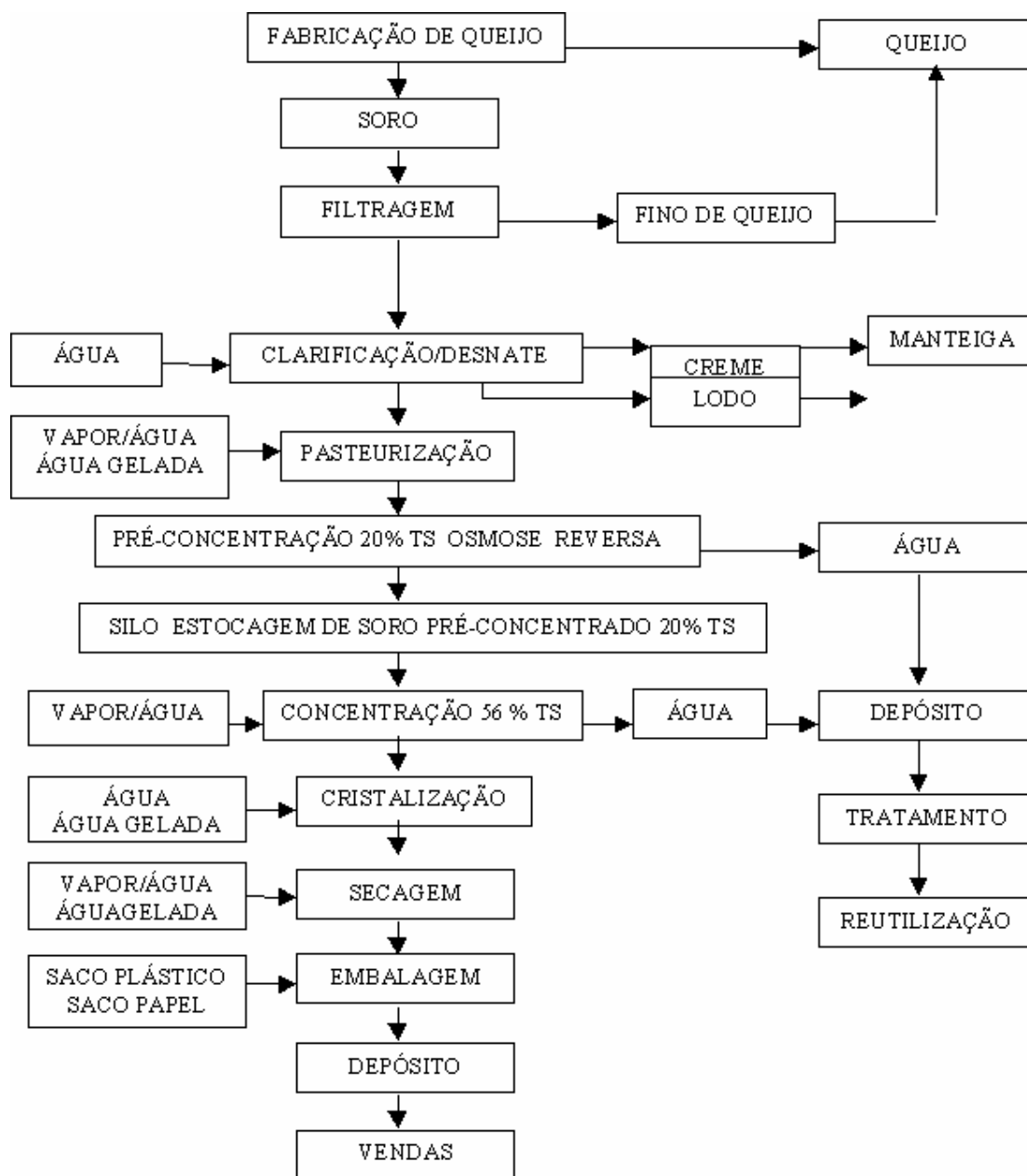


Figura 2.5 - Fluxograma da fabricação de soro em pó (PISECKY E SORENSE, 1976)

II – Beneficiamento do soro

Após o controle, o soro é bombeado para o filtro rotativo onde se faz a separação do líquido e dos sólidos (finos de queijo) em suspensão. O soro uma vez filtrado é depositado em um tanque de equilíbrio do filtro, através de uma saída na parte inferior do filtro rotativo. Os finos de queijo são então expurgados pela parte superior, para um tanque de aço inox. O soro

filtrado é então bombeado do tanque de equilíbrio para o silo isotérmico de estocagem e a massa de fino de queijo, é destinada à unidade de processo para a fabricação de queijo.

Do silo isotérmico de estocagem o soro filtrado é bombeado para o tanque de equilíbrio do pasteurizador, e então é bombeado ao pasteurizador e a seguir para as pré-clarificadoras/desnatadeiras onde é removido a quase totalidade de sua gordura. Em condições normais, o soro assim desnatado, apresenta um conteúdo médio de 0,03% de gordura. Todo creme removido nesta operação é estocado para posterior aproveitamento para a produção de manteiga.

Durante esta fase do processo são efetivados controles para a avaliação do percentual de gordura do soro que sai das desnatadeiras, que não deve ser superior a 0,1%. Também são controladas as condições de funcionamento dos equipamentos, como número de rotações da desnatadeira (5800 rpm), e as condições higiênico sanitárias das bombas, linhas, tanques, etc., promovendo a parada dos mesmos a cada 6 horas para a limpeza dos discos. Ao final da operação, verifica-se o volume total do creme obtido e o seu teor de gordura.

Após o desnate, o soro retorna ao trocador de calor para ser pasteurizado a 75°C por 20 segundos e posteriormente, é resfriado a 5°C, quando então é bombeado para o tanque de estocagem de soro beneficiado.

Nesta fase o controle dos registros de temperatura no termógrafo do pasteurizador é fundamental, para que o processo de pasteurização seja bem conduzido. As temperaturas registradas durante todo o processo devem estar entre 72 e 75°C. O controle da temperatura do soro resfriado também deve ser realizado e após a passagem pelo pasteurizador deve estar na faixa de 5°C.

A limpeza do pasteurizador deve ser feita a cada 80 mil litros processados, em circuito fechado, através da circulação controlada de uma solução alcalina a 1,5% por aproximadamente 40 minutos, seguida de enxague, por 10 minutos. Posteriormente, por uma solução ácida a 1,0%, por 40 minutos; a uma temperatura de 85 a 90°C. Após a circulação destas soluções é feito o enxágue com água pura e posterior circulação de solução sanitizante que pode ser à base de iodo ou amônia quaternária, por 10 minutos à temperatura ambiente.

III – Pré-concentração

O soro beneficiado e estocado é bombeado para o sistema de osmose reversa onde ocorre a sua pré-concentração de 6 para 20% de sólidos totais. São concentrados nesta etapa a lactose, as lactoalbuminas e lactoglobulinas, não se concentram parte dos minerais e aminoácidos de cadeia molecular curta. Este soro é então bombeado para um tanque estacionário, isotérmico de estocagem.

IV – Concentração

O soro pré-concentrado a 20% é então encaminhado para um conjunto de concentração/evaporação de triplice efeito, onde a sua concentração atinge o nível de 56% de sólidos totais. Neste sistema estão ligados 3 pré-aquecedores e 3 evaporadores, além de um pasteurizador auxiliar que possibilitam a obtenção deste soro a 56%.

Os pré-aquecedores são idênticos e o soro passa de forma consecutiva do 1º ao 3º, neles o soro é aquecido através de vapor d'água e onde transita o vapor através de uma serpentina. Os pré-aquecedores são fechados na parte de cima e na parte de baixo se unem aos evaporadores, através de tubulação específica.

O pasteurizador auxiliar é alimentado por vapor, direto da caldeira e aquece o soro a 78°C. O soro que sai do pasteurizador auxiliar é enviado ao 1º aquecedor que trabalha a uma temperatura superior aos demais. A sucção do vapor do soro é feita através do terceiro pré-aquecedor quando ocorre a condensação e posterior succionamento através de bomba para o tanque a fim de ser submetido ao passo seguinte do processo.

V – Cristalização

O soro proveniente do concentrador com 56% de sólidos totais e temperatura de 50°C é estocado e resfriado primeiramente com água a temperatura ambiente e em seguida com água gelada, até a temperatura de 20°C onde ocorre a cristalização da lactose. Este soro concentrado e cristalizado é bombeado do tanque de cristalização para o secador.

VI – Pulverização e evaporação

O soro concentrado é bombeado para o *spray dryer* para a sua pulverização que ocorre através do disco atomizador. Uma corrente de ar quente entra em contra corrente com o soro pulverizado promovendo a evaporação da água do soro. O pó precipita para o fundo do *spray* e o ar úmido é arrastado pelos exaustores e lançado à atmosfera. O pó é coletado por um raspador e lançado no ciclone que o encaminha através de pás rotativas até a tubulação, quando então é enviado ao ensacamento por uma corrente de ar filtrado.

VII – Embalagem

Antes do ensacamento o pó passa por uma “válvula de ensacamento” (peneira de pó) que tem a função de separar as partículas que permanecem aglutinadas e que são denominadas de raspa. Esta raspa pode, posteriormente, ser dissolvida e este material ser novamente trabalhado a partir do processo inicial de pasteurização.

O ensacamento/embalagem é feito em saco plástico resistente, embalagem primária, e sacos de papel multifoliar (embalagem secundária) onde são impressas as informações que

caracterizam o produto (nome, marca, lote, fabricação, etc). É feita a retirada do ar da embalagem e o pacote é costurado. Normalmente utilizam-se embalagens de 25 kg.

VIII – Estocagem

A estocagem do produto é feita em local bem ventilado, sobre estrados de madeira com empilhamento dos sacos, afastados da parede.

2.2.5 - Crescimento celular em fermentações com soro de queijo em reator batelada

Em uma fermentação batelada o crescimento celular não ocorre com velocidade constante. De forma geral podem ser identificadas seis fases ao longo da fermentação batelada: a fase de adaptação do micro-organismo (I), a fase de crescimento acelerado (II), a fase de crescimento exponencial (III), a fase com crescimento desacelerado (IV), a fase estacionária (V) e a fase de declínio ou lise celular (VI), conforme mostra a Figura 2.7.

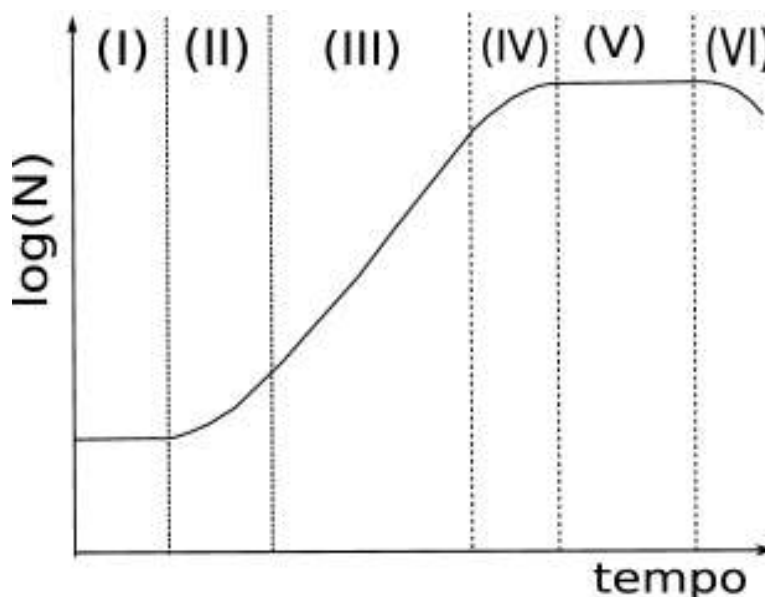


Figura 2.6 - Concentração de células em função do tempo de fermentação.

Fonte: Bailey e Ollis, 1986

Nesta figura, os intervalos de tempos representam, respectivamente, as fases lag, log, estacionária e de declínio do crescimento celular. Na fase lag há uma adaptação das células as condições do meio onde se encontram, na fase log as células crescem em escala logarítmica e na fase de declínio a morte celular é maior que o crescimento celular.

O balanço de massa que descreve esta situação para as células e substrato é representado pelas equações.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - \alpha X \quad (2.1)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dX}{dt} - mX - \frac{1}{Y_{P/S}} q_p X \quad (2.2)$$

Sendo X a concentração celular, S a concentração de substrato, μ a velocidade específica de crescimento celular, α a velocidade específica de morte celular, $Y_{X/S}$ o coeficiente estequiométrico que relaciona a conversão de substrato em células, m o coeficiente de manutenção que representa o consumo de substrato associado a manutenção das células vivas, q_p a velocidade específica de formação de produto e $Y_{P/S}$ o coeficiente estequiométrico que relaciona a conversão de substrato em produto.

Existem diferentes modelos que representam a velocidade específica (μ). Dentre os modelos se destacam o modelo de Monod, Contois e Verlhust, representados na Tabela 2.9.

Tabela 2.9 –Exemplos de modelos de crescimento celular.

Modelo	Equação
Monod	$\mu = \frac{\mu_m S}{S + K_s}$
Verlhust	$\mu = \mu_m \left(1 - \frac{X}{X_M} \right)$
Contois	$\mu = \frac{\mu_m S}{S + BX}$

2.3 – PROBIÓTICOS, PREBIÓTICO E SIMBIÓTICOS.

Os probióticos constituem micro-organismos vivos que ao serem agregados como componentes da dieta exercem ação benéfica na flora intestinal microbiana tanto em animais como em humanos (GUEIMONDE et al, 2006; REIG, ANESTO, 2002; ROOS, KATAN, 2000; KERN, 2002). No caso de animais esta ação benéfica pode ser definida como ganho de

peso, melhora na resistência a doenças e auxílio na recuperação de infecções microbianas (FLINT, ANGERT, 2005; BALCÁZAR et al, 2006; SILVA, et al 2000; STROMPFOVA et al, 2006; SCHAREK et al, 2005) e para humanos ela está associada a melhora de gastroenterites resistentes, melhora do quadro a intolerância à lactose, estimulação do sistema imune, redução do colesterol sérico, prevenção da formação de câncer e substâncias carcinogênicas no intestino (COLLINS, GIBSON, 1999; ROOS, KATAN, 2000).

A relação de micro-organismos aceitos como probióticos varia de país para país. Entre os critérios utilizados para diferentes países para aceitação de diferentes micro-organismos como probióticos consta a prova de que os referidos micro-organismos são seguros para os animais e humanos que utilizam os produtos de origem animal, o fato de terem um número de células 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) na recomendação diária do produto (ou outro valor particular aceito) e o fato dos mesmos terem ação probiótica cientificamente comprovada (ANVISA, 2009). A comprovação de ação probiótica é feita por ensaios com animais e ensaios *in vitro* que comprovem a capacidade das preparações probióticas: serem resistentes a ação de fluidos biológicos; terem a capacidade de aderir às mucosas e tecidos do intestino ou outra região que atuem serem seguros para o uso em animais e humanos; gerarem um aumento no ganho de peso, melhorar a saúde e resistência a doenças dos animais que consumiram tais preparações. A Tabela 2.10 apresentada a relação de diferentes micro-organismos utilizados como probióticos em diferentes países.

Tabela 2.10 - Micro-organismos utilizados comercialmente em probióticos

Micro-organismo	Exemplo de empresas produtoras
<i>L. acidophilus</i> NCFM	Rhodia, Inc. (Madison, Wis.)
<i>L. acidophilus</i> DDS-1	Nebraska Cultures, Inc. (Lincoln, Neb.)
<i>L. acidophilus</i> SBT-2062	Snow Brand Milk Products Co., Ltd. (Tokyo, Japan)
<i>L. acidophilus</i> LA-1	Chr. Hansen, Inc. (Milwaukee, Wis.)
<i>L. casei</i> Shirota	Yakult (Tokyo, Japan)
<i>L. casei</i> Immunitas	Danone (Paris, France)
<i>L. fermentum</i> RC-14	Urex Biotech (London, Ontario, Canada)
<i>L. johnsonii</i> La1	Nestlé (Lausanne, Switzerland)
<i>L. paracasei</i> CRL 431	Chr. Hansen, Inc. (Milwaukee, Wis.)
<i>L. plantarum</i> 299V	Probi AB (Lund, Sweden)
<i>L. reuteri</i> SD2112	Biogaia (Raleigh, N.C.)
<i>L. rhamnosus</i> GGa	Valio Dairy (Helsinki, Finland)
<i>L. rhamnosus</i> GR-1	Urex Biotech (London, Ontario, Canada)
<i>L. rhamnosus</i> 271	Probi AB (Lund, Sweden)
<i>L. rhamnosus</i> LB21	Essum AB (Umeå, Sweden)
<i>L. salivarius</i> UCC118	University College (Cork, Ireland)
<i>L. lactis</i> L1A	Essum AB (Umeå, Sweden)
<i>Bifidobacterium lactis</i> Bb-12	Chr. Hansen, Inc. (Milwaukee, Wis.)
<i>Bifidobacterium longum</i> BB536a	Morinaga Milk Industry Co., Ltd. (Zama-City, Japan)
<i>Bifidobacterium longum</i> SBT-2928a	Snow Brand Milk Products Co., Ltd. (Tokyo, Japan)
<i>Bifidobacterium breve</i> strain Yakult	Yakult (Tokyo, Japan)

Fonte: Coutinho (2007)

2.3.1 - Formulações probióticas e simbióticas de acordo com a legislação

De acordo com a legislação brasileira, os micro-organismos para serem considerados probióticos devem conter os seguintes requisitos específicos (Anvisa 2009):

- a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 unidades formadoras de colônias (UFC) na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. Valores menores podem ser aceitos desde que a empresa prove sua eficácia. Esta quantidade mínima deve estar declarada no rótulo;
- laudo de análise do produto que comprove a quantidade mínima viável do micro-organismo até o final do prazo de validade;
- teste de resistência da cultura utilizada no produto à acidez gástrica e aos sais biliares.

Assim, de acordo com a legislação brasileira, os micro-organismos que podem ser comercializados como probióticos para alimentação humana são (Anvisa 2009): *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus casei* variedade *rhannosus*, *Lactobacillus casei* variedade *defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *Bifidobacterium longum*, *Eterococcus faecium*.

Tais micro-organismos são utilizados na forma de leites fermentados, soluções salinas, misturas de cultura em produtos do tipo gel e culturas liofilizadas a serem adicionadas em preparações sólidas e pastosas, como também em rações animais.

Caso os micro-organismos sejam utilizados conjuntamente com substâncias que atuam como nutriente preferencial para bactérias probióticas sem serem hidrolisados nem absorvidos na parte superior do sistema gastrointestinal, tem-se uma preparação simbiótica. Entre as substâncias que cumprem esta função constam oligossacarídeos como frutooligossacarídeos que estão presentes em vegetais como chicória, alho, bananas, cebola, tomate, dentre outras fontes.

Na alimentação animal os probióticos são utilizados na forma de leites fermentados, soluções salinas, misturas de cultura em produtos do tipo gel e culturas liofilizadas a serem adicionadas em preparações sólidas ou pastosas como rações (SANTOS et al, 2000; STROMPFOVA et al 2006; SIMPSON et al 2004) sendo que bactérias produtoras de ácido láctico, como as do gênero *Lactobacillus* estão entre os micro-organismos mais utilizados em formulações probióticas para humanos conforme mostram diferentes trabalhos:

- Baillon e colaboradores (2004) e Strompfová e colaboradores (2006) fizeram testes do uso de *Lactobacillus acidophilus* na alimentação de cachorros adultos e após duas semanas do fim de uso ainda detectaram estas bactérias nas fezes do animal e notaram, pela comparação dos animais com um grupo de controle, redução do número de micro-organismos patogênicos causadores de clostridioses e melhora de parâmetros bioquímicos associados à saúde animal (RBCs, Hct, concentração de hemoglobina, neutrófilos, monocitos, imunoglobina sérica G) ;

- Kürti e colaboradores (2007) notaram a melhora na digestibilidade de lipídeos, carboidratos e proteínas em leitões de 6 a 8 semanas alimentados com *Lactobacillus ssp* da ração BioPlus 2B e explicaram que a melhora na digestibilidade reduz o consumo de 5-10% de ração para o ganho de 1kg e gera menor pressão de patogênicos e potenciais patogênicos no intestino destes leitões;

- Weese (2002) descreve o uso de *Lactobacillus* em doses maiores que 30 bilhões de células viáveis por dia na alimentação de equinos tem possível redução de infecções por *Clostridium difficile* e redução da ação de toxinas pela ação de proteases que reduzem toxinas;

- Marshall-Jones e colaboradores (2006) mostraram a sobrevivência de *Lactobacillus ssp* no intestino de gatos e que a alimentação dos gatos com estas células reduziu a população de bactérias patogênicas como *Clostridium spp*, *Enterococcus faecalis* e trouxe melhora na capacidade imunomodulatória destes animais avaliada por exames de sangue.

Além dos probióticos há simbióticos e prebióticos. Os prebióticos são compostos que não são digeridos por enzimas, sais e ácidos produzidos pelo organismo animal e são seletivamente fermentados pelos micro-organismos da flora bacteriana natural ou pelos micro-organismos probióticos, de forma a favorecerem a manutenção do equilíbrio na flora microbiana natural e a flora microbiana gerada pelo consumo do probiótico. São exemplos de prebióticos muitos polissacarídeos como a insulina e outros frutooligosacarídeos. (AACHARY, PRAPULLA, 2009).

Os simbióticos são produtos que contém em sua formulação micro-organismos probióticos e substâncias prebióticas combinados de forma que o uso conjunto destes dois produtos maximize a ação probiótica do produto e garanta que o mesmo seja melhor que o uso individual dos probióticos ou prebióticos.

2.3.2 - Qualidade e eficácia dos probióticos

A eficácia dos probióticos é influenciada pela viabilidade celular dos micro-organismos no produto original e pela ação dos fluidos biológicos associados à digestão do produto (FERREIRA, TESHIMA, 2000; GIULIO et al 2005). As dificuldades supracitadas, assim como a melhora da qualidade do produto, pode ser atingida pelo uso de prebióticos, antioxidantes, osmólitos e imobilização das células (PRASAD et al 2003; LEE, HEO, 2000; YANCEY, 2001).

O processamento dos probióticos e o armazenamento representam perda da viabilidade celular por inativação dos micro-organismos pelo tratamento térmico, estresse osmótico, oscilações de temperatura (GIULIO et al 2005; LEE, HEO, 2000), mas a resistência das células a estes efeitos pode ser melhorada significativamente pela ação de osmólitos (PRASAD et al 2003; WANG, BOLEN, 1997; BASKAKOV, BOLEN, 1998) que estabilizam a estrutura de proteínas e as membranas das células frente a inativação osmótica, desidratação e ação de moléculas capazes de alterar a estrutura da proteína ou membrana (SHAHJEE, BANERJEE, AHMAD, 2002; YANCEY, 2001). Entre os osmólitos mais utilizados encontram-se carboidratos; polióis; aminoácidos e derivados; metilaminas e uréia (YANCEY, 2001).

A ação de enzimas, íons, pressão mecânica, pH extremos, calor e outros efeitos geradores de estresse físico e bioquímico para a célula também podem ser evitados quando as células encontram-se imobilizadas. Neste caso o suporte dificulta a ação direta dos efeitos do estresse na estrutura protéica e nas membranas celulares e também protege as células da contaminação por fungos e bactérias indesejáveis (OUYANG et al, 2004; LEE, HEO, 2000).

Além da eficiência comprovada na imobilização, o suporte deve ser atóxico, economicamente viável e ter resistência física suficiente para manter as células imobilizadas durante o tempo de vida útil do produto e durante a maior parte da ação dos sucos digestivos liberados durante a alimentação. Dois tipos de suportes que atendem estas características e encontram maior indicação na literatura são o alginato de cálcio e o sistema composto por potássio-carragenana-goma locuste (OUYANG et al, 2004; LEE, HEO, 2000; GIULIO et al 2005).

Assim como todos os alimentos, as preparações probióticas estão sujeitas a reações de oxido-redução que levam a deterioração do produto. O controle destas reações indesejáveis é feito por técnicas de processamento e empacotamento que excluem o oxigênio e envolvem a adição de agentes antioxidantes como o ácido ascórbico e derivados, tocoferóis, sulfitos, propilgalactol, butilhidroxianisol, butilhidroxitolueno, entre outros compostos. Os

antioxidantes inibem o mecanismo de oxidação como também, em certos casos, consomem o oxigênio dissolvido (LIDSAY, 1996; COULTATE, 1996).

A qualidade final dos probióticos também é melhorada pelo uso de prebióticos associados à preparação probiótica. Neste caso o produto, mistura de probióticos e prebióticos, é conhecida como simbióticos (DIONIZIO et al, 2002; BENGMARK et al, 2001). A principal ação das moléculas prebióticas - como frutoligossacarídeos, fibras e peptídeos- é estimular seletivamente o crescimento e atividade de uma ou mais bactérias benéficas para o intestino (SILVA, NORBERG, 2003; DIONISIO et al, 2002; BENGMARK et al, 2001; MAIORKA, et al 2001).

2.4– IMOBILIZAÇÃO CELULAR

A imobilização celular consiste na retenção física das células em determinado ambiente por processos variados como oclusão em matriz, uso de membranas e adesão das células a diferentes superfícies. Este processo dificulta a ação de enzimas, íons, pressão mecânica, pH extremos, calor e outros efeitos geradores de estresse físico e bioquímico para célula, pois o suporte dificulta a ação direta dos efeitos do estresse na estrutura protéica e membranas celulares e também protege as células da contaminação por fungos e bactérias indesejáveis (FREITAS, 2007) .

Assim, a imobilização das células e uso de aditivos reduz as mortes celulares e gera melhor viabilidade celular que pode ser comprometida pelas condições de armazenamento, condições adversas do processamento do alimento e durante a própria ingestão dos alimentos, pois as células imobilizadas apresentam uma maior resistência à ação dos fluidos biológicos associados ao processo digestivo, tem reduzida interação entre os micro-organismos e outros constituintes da preparação probiótica como, também, reduzida susceptibilidade a contaminação (KURTMANN et al 2009; PRASAD et al 2003; WANG, BOLEN, 1997; BASKAKOV, BOLEN, 1998).

Um dos processos de imobilização mais utilizado na produção de probióticos é a imobilização celular por encapsulação. Neste processo macromoléculas, como hidrocolóides, geram uma estrutura tridimensional capaz de reter as células de interesse em um ambiente que as protege da ação do calor e outras condições adversas geradas durante o processamento dos alimentos ou no processo digestivo (RAYMENT et al 2009).

Uma das formas de encapsulação é a retenção das células em polímeros lineares de alginato de cálcio que são gerados quando uma solução de alginato que contém as células é misturada a uma solução de sal de cálcio. O alginato é um polissacarídeo composto dos ácidos β -1-4-D-manurônico e α -1,4-gulurônico obtido de algas marrons (BLANDINO et al 2002). Neste processo uma solução de alginato de sódio contendo a enzima ou células é misturada a uma solução de íons de cálcio: ao gotejar a solução que contém o alginato de sódio sobre a solução do íon cálcio ocorre a formação de uma rede polimérica de cálcio e alginato.

A gelificação do alginato é principalmente alcançada pela troca dos íons sódio por cátions divalentes tais como Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} ou Mn^{2+} . A formação e as propriedades do gel de alginato de cálcio têm sido extensivamente estudadas. Existe uma vasta concordância que a rede de gel, induzida pela ligação do íon Ca^{2+} pela cadeia de segmentos do grupo G, formem junções estáveis (uma rede tridimensional) consistindo dos principais dímeros, conforme ilustrado na Figura 2.8 (ROY, GUPTA, 2004).

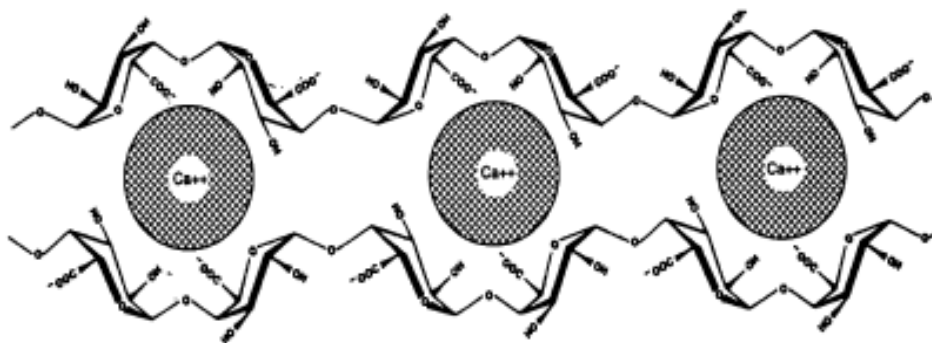


Figura 2.7 - Modelo da estrutura do gel de alginato de cálcio (ROUSSEAU et al, 2004)

A eficiência da imobilização por alginato e a qualidade do produto são influenciadas pela dimensão das esferas de alginato, pela concentração de alginato e pelos aditivos utilizados com a finalidade de melhorar a eficiência do processo e a vida útil do produto.

Isto pode ser explicado pelo fato do alginato ser o mais comum sistema na formação de gel, uma vez que a solução de alginato em contato com um policação (Ca^{+2}), imediatamente se transforma em gel devido à ligação entre os blocos ácidos do alginato e íon Ca^{+2} (FREITAS, 2007).

As características do gel podem ser resumidas em sua porosidade e resistência mecânica necessárias ao processo. A porosidade está intimamente ligada à capacidade do gel

reter a enzima ou células desejada e de alterar a difusividade efetiva do substrato (FREITAS, 2007).

Estudo da estabilidade das células imobilizadas e sobrevivência a baixos valores de pH

Uma das formas de avaliar a estabilidade de preparados celulares consiste em descrever a cinética de morte celular em ensaios de desativação em temperaturas superiores a ambiente. Nesta condição é possível estimar a estabilidade das células em termos de energia de ativação associada a morte celular e mesmo calcular o valor D que representa uma informação comum na literatura.

A cinética de primeira ordem é a mais utilizada na descrição da morte celular em soro de queijo. Segundo esta cinética, a taxa de morte celular é diretamente proporcional ao número de micro-organismos vivos, dados por:

$$\frac{dN}{dt} = -kN \quad (2.3)$$

O sinal negativo desta equação decorre do decréscimo do número de micro-organismo com o tempo e k representa a constante de velocidade associada a morte celular. Para processos térmicos, é usual a representação da equação de Arrhenius, dado por:

$$k = A \exp\left(-\frac{Ea}{RT}\right) \quad (2.4)$$

sendo Ea a energia de ativação associada a morte celular, R a constante universal dos gases ($R=8,314 \text{ J/mol.K}$), T representa a temperatura em Kelvin, A o fator de frequência de colisão entre as moléculas durante a reação.

A resolução da Equação 2.3 para temperatura constante fornece a equação:

$$\ln(N_0/N) = k.t \quad (2.5)$$

Nesta equação N_0 representa a concentração inicial de células imobilizadas e N a concentração de células no tempo t.

A Equação 2.5 é, também, descrita em termos de redução decimal D do número de células. A redução decimal representa o intervalo de tempo necessário para o número de células vivas tornar dez vezes menor que o número de células existente no tempo que antecede a contagem do intervalo de tempo. Pela definição de D, tem-se:

$$\log_{10}(N_0/N)=t/D \quad (2.6)$$

nesta equação $D=\log_{10}10/k$

No caso das células de probióticos há a necessidade de avaliar, também, a estabilidade celular associada à sobrevivência das células nos fluidos biológicos. Neste sentido, um dos estudos mais utilizados é estudo de estabilidade em meio ácido que simula as condições ácidas presentes no estômago (HEIDEBACH et al em 2009). Estas condições ácidas podem causar uma diminuição significativa do número de células viáveis (KRSAEKOOP et al, 2003; SHAH, 2000).

Um dos propósitos da encapsulação, é aumentar a taxa de sobrevivência das células probióticas durante a exposição a baixos valores de pH no estômago humano. Tentativas de BERRADA et al (1991) revelaram que o tempo para se esvaziar 80% do estômago humano contendo leite com células probióticas é cerca de 90 minutos.

2.5 – RAÇÃO PARA ALIMENTAÇÃO ANIMAL

2.5.1- Aproveitamento de subprodutos e resíduos agroindustriais na produção de rações destinadas a alimentação de animais de estimação

O mercado de alimentos para cães e gatos já movimenta hoje cerca de dois bilhões de reais no Brasil. Atualmente, segundo dados da indústria, cerca de 65% dos lares brasileiros têm um animal de estimação, o que representa uma população de, aproximadamente, 30 milhões de cães e 12 milhões de gatos. Destes, aproximadamente, 40% consomem alimentos industrializados. Segundo a Associação Nacional dos Fabricantes de Alimentos para Animais (ANFAL, 2009), a produção de alimento industrializado para cães e gatos passou de 220 mil toneladas no ano de 1994 para 1.502.000 toneladas de ração em 2005. No mesmo período, o

valor movimentado pelo setor cresceu 561%, atingindo 1,88 bilhões de dólares no ano de 2005, mostrado na Tabela 2.11 e na Figura 2.9 (ANFAL PET 2009).

Tabela 2.11 - Dados do Setor Produtivo

Anos	Toneladas	Taxa de crescimento da produção em relação a 1994	Valor movimentado pelo setor em milhões de dólares
1994	220.000	-----	285,2
1995	380.000	73%	469,4
1996	420.000	91%	513,8
1997	550.000	150%	444,3
1998	750.000	241%	890,6
1999	950.000	332%	1106,0
2000	1.000.000	355%	1050,0
2001	1.172.000	433%	957,5
2002	1.234.000	461%	927,1
2003	1.295.000	489%	1200,0
2004	1.425.878	548%	1466,0
2005	1.562.414	610%	1886,4

Fonte: Anfal PET 2009



Figura 2.8 - Movimentação do setor (Alfa Pet 2009)

O setor é responsável por 12.000 empregos diretos somente na indústria. Diante desse cenário nacional, a indústria é carente de informações referentes aos ingredientes disponíveis no País. A maioria das pesquisas realizadas para avaliação nutricional de ingredientes de origem vegetal é oriunda de outros países, sendo muitas delas de caráter confidencial das empresas que atuam no ramo, sem considerar que determinadas situações são específicas de cada continente. A Tabela 2.12 mostra os parâmetros físicos- químicos da ração de acordo com a legislação .

Tabela 2.12 - Parâmetros físicos- químicos da ração .

Parâmetros (%)	Ração Seca para Cães	Ração para gatos em geral	Ração para gatos adultos – manutenção
Umidade (máx)	12	12	12
Proteína Bruta (mín)	16	28	24
Extrato Etéreo (mín)	4,5	8	8
Fibra Bruta (máx)	6,5	4,5	4,5
Matéria Mineral (máx)	12	10	10
Fósforo (mín)	0,44	0,8	0,5

Fonte: BRASIL, 2009

Dentre os principais ingredientes que compõem a ração estão (HARDY, BARROWS, 2002; POZZA et al 2004; ØVERLAND et al 2007; SHAPAWI et al 2007):

- farinha de carne: principal fonte de proteína da ração;
- farinha de osso: fonte de proteínas e minerais;
- óleo vegetal: principal componente de valor energético e fornece ácidos graxos essenciais;
- sais minerais: suprem a necessidade de cálcio, ferro e oligonutrientes na alimentação animal;
- amido: complementando do valor energético e como agente capaz de aglutinar todos ingredientes. . Representa cerca de 40 a 55 % da matéria seca destes alimentos (KRONFELD, 1975), fornecendo, aproximadamente, de 30 a 60 % da energia metabolizável.

Farinhas de origem animal apresentam grande variação de composição nutricional devido a variação de composição das matérias-primas e as diferentes formas de processamento da matéria prima, principalmente pressão, temperatura, e tempos empregados, resultando ingredientes com valores nutricionais bastante diferentes (PARSONS et al, 1997).

Para se obter um número de células viáveis adequadas no produto final usa-se um número de células viáveis maiores que o recomendado ou pode-se aumentar a estabilidade das células pela imobilização celular. Para alimentação de cachorros a literatura cita o uso de uma quantidade de células de pelo menos 10^{10} células por dia (BAILON et al, 2004) e para gatos há trabalhos que falam em 2.10^8 células/dia (MARSHALL-JONES ET al, 2006).

Subprodutos como o soro, resíduos e subprodutos agrícolas podem ser parcialmente utilizados pela indústria de rações de animais de estimação. A indústria de alimentos produz ao longo de sua cadeia uma grande quantidade de resíduos agroindustriais, o que gera perda de divisas, além de inúmeros problemas ambientais. No entanto, o aproveitamento integral desses resíduos como matéria-prima para a formulação de rações tem como objetivo principal agregar valor aos subprodutos.

De 30% a 40 % da matéria seca de alimentos para cães são provenientes destes subprodutos de origem animal. Estes subprodutos animais têm contribuído para o crescimento e expansão do mundo na indústria de rações, por fornecer fontes de proteínas, gorduras e minerais e significativa quantidade de vitaminas para animais de estimação ao longo destes anos (CORBIN, 1992).

2.5.2 - Processo de fabricação da ração

As rações para alimentação de animais são geradas pela combinação de ingredientes previamente aprovados para uso da alimentação animal. Estes ingredientes são combinados em proporções adequadas às exigências nutricionais dos animais em um processo conhecido como formulação da ração. Neste processo o produto final deve garantir a quantidade mínima de certos nutrientes necessários para a espécie animal (a exemplo de proteínas) e não ultrapassar a quantidade máxima de outros nutrientes e compostos que em excesso geram problemas na saúde dos animais (a exemplo das fibras e cálcio) ou problemas na conservação da ração (a exemplo da água que em excesso favorece a proliferação de fungos capazes de gerar micotoxinas) (COULTATE, 1996).

Na forma tradicional de se produzir rações estas são feitas com uma máquina chamada expensor ou extrusor. Primeiro, as matérias primas são misturadas, algumas vezes são dosadas manualmente, outras vezes por um computador, de acordo com uma receita desenvolvida pelos nutricionistas animais. Essa mistura é triturada em moinho de martelos e passa uma peneira com 3 mm de diâmetro e é colocada no expensor e forçada a passar por furos de 6 a 8mm podendo ser adicionado água quente ou vapor. A mistura pode ser gerada pelo uso de altas pressões e temperaturas, como uma pipoca, através de moldes que definem o formato do produto final. Depois disso, a ração é pulverizada com óleo a 50°C, digestos e outros compostos para tornar o sabor mais aceitável deve ser, então, seca, resfriada e empacotada (ØVERLAND, et al 2007).

Os ingredientes são similares para todas as rações secas, molhadas e meio úmidas embora as proporções de proteína, gordura e fibra variem. Em uma lata de ração para gatos se diz conter 45 a 50% de subprodutos de carne bovina ou de aves (VEGETARIANISMO 2009). A principal diferença entre os tipos de ração é a quantidade de água. As rações molhadas ou enlatadas começam com os ingredientes moídos sendo misturados com os aditivos. Se forem necessários pedaços, um extrusor especial forma esses pedaços. Depois a mistura é cozida e enlatada e estas latas são seladas em posta em recipientes semelhantes às panelas de pressão e submetidas a esterilização comercial, sendo que alguns fabricantes cozinham a este tipo de ração diretamente na lata.

CAPÍTULO 3 - MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo apresentam-se os materiais e os equipamentos empregados no desenvolvimento deste trabalho. Em seguida, são descritos os micro-organismos utilizados e o seu meio de manutenção. Descreve-se a determinação dos melhores tempos de fermentação, e o planejamento composto central. Em seguida, descreve-se o processo de imobilização celular e a formulação da ração. Finalmente os métodos analíticos empregados.

3.1 - MICRO-ORGANISMOS

Neste trabalho os micro-organismos foram adquiridos a partir de um produto comercial da marca Rich, utilizado para a produção de iogurte natural, tendo como ingredientes culturas superconcentradas de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus thermophilus*, conforme Figura 3.1.



Figura 3.1 - *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus thermophilus*.

3.2 – MEIO DE CULTURA

Foi utilizado o meio de cultura seletivo para *Lactobacillus* conhecido como meio MRS (RAMIRÉZ et al., 2006), cuja composição é apresentada na Tabela 3.1 .

Tabela 3.1- Meio de cultura MRS

Substância	Concentração
Peptona de carne	10 g/L
Extrato de carne	10 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
Glicose	20 g/L
Tween 80	1 g/L
K ₂ HPO ₄	2 g/L
Na- acetato	5 g/L
(NH ₄) ₂ citrato	2 g/L
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,02 g/L
MnSO ₄ x H ₂ O	0,05 g/L

Preparado o MRS, o pH do meio foi ajustado para 6,0 e a esterilização foi a 110⁰C por 20 min. Os cultivos eram feitos a cada quinze dias e após crescimento a 30 ± 1°C por 24 horas, a cultura era estocada sob refrigeração á 5 ± 1°C.

3.3 – TESTES PRELIMINARES PARA AVALIAR O TEMPO DE FERMENTAÇÃO

Para se avaliar o melhor tempo de fermentação para reatores tipo erlenmeyer e de frascos de penicilina, após a chegada do soro de queijo “*in natura*”, proveniente da fabricação do queijo do tipo mussarela fornecido pela Cooperativa Agropecuária Ltda de Uberlândia CALU, retirava-se uma amostra inicial para se analisar o teor de proteína, lactose, o valor de pH e densidade a fim de se obter suas características do soro de queijo “*in natura*”.

Os testes preliminares foram realizados em dois reatores: erlenmeyer de 250 mL tampados com rolhas de algodão e frascos de penicilina de 50 mL lacrados, visando verificar qual reator apresentava melhores resultados. Os frascos de penicilina possuem uma coluna de ar menor, quando comparadas com o erlenmeyer, e por isso tem um efeito de anaerobiose maior, porém uma agitação menos eficiente porque o espaço disponível para agitação é menor não tendo uma boa movimentação do fluído dentro do reator.

Após a amostragem do soro de queijo “*in natura*”, foram realizadas fermentações em erlenmeyer de 250 mL com 100 mL de soro e a concentração de biomassa foi padronizada em 0,6 g/L (baseados nos testes preliminares), e nos frascos de penicilina de 50 mL foram adicionados 40 mL de soro e concentração de biomassa inicial também de 0,6 g/L. Nos dois reatores foi ajustado o pH inicial em 6,5. A quantificação celular foi feita através de massa seca a $90^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, em estufa, até peso constante.

Os testes foram conduzidos em escala de bancada em incubador rotativo com movimentos orbitais e temperatura ambiente de $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$ e 100 rpm. Análises de concentração de lactose, proteína e de micro-organismos eram realizadas a cada 12 h durante 3 dias, sendo os reatores sacrificados.

Determinação da biomassa

Devido à precipitação das proteínas do soro de queijo a baixos valores de pH, para a determinação da concentração de biomassa, em g/L, foi realizado o seguinte procedimento: o meio de cultivo inicial sem micro-organismos foi autoclavado (113°C por 10 minutos), o pH foi ajustado para o valor médio obtido no final das fermentações ($\text{pH} = 3$). A quantidade de proteína precipitada foi determinada após centrifugação a 18.900 g por 15 minutos e secagem a 43°C até massa constante (TARI et al., 2009). A concentração de micro-organismo era determinada subtraindo o valor de massa seca obtida no início e no final da fermentação do valor do precipitado protéico determinado conforme descrito anteriormente.

Nos testes que utilizou soro em pó, a água de dissolução era autoclavada e o soro após permanecer sobre luz ultravioleta por 12 horas, distribuído em uma fina camada de 1cm, era adicionado à água esterilizada. A quantidade de proteína precipitada em função do pH, sem o processo de autoclavação, foi determinada conforme descrito anteriormente e subtraída do valor final da massa seca obtida.

3.4 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Neste trabalho foi aplicado um Planejamento Composto Central (PCC). Neste planejamento cada variável foi estudada com 5 diferentes níveis ($-\alpha$, -1, 0, 1, $+\alpha$), cada nível possui seu respectivo valor nominal (BOX et al.1978).

Os planejamentos compostos centrais são delineamentos fatoriais de 1ª ordem, aumentados por pontos adicionais (axiais e centrais) para permitir a estimação dos parâmetros de uma superfície de 2ª ordem. Portanto, nesta dissertação foi realizado um PCC a dois níveis com três variáveis (2^3 ensaios), acrescido de três réplicas no ponto central, e ainda 6 experimentos nos pontos axiais (α), totalizando 17 experimentos conforme ilustra a Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Esquema do Planejamento Composto Central a dois níveis com três variáveis.

Experimento	X_1	X_2	X_3	
1	-1	-1	-1	Planejamento Fatorial 2^k
2	-1	-1	+1	
3	-1	+1	-1	
4	-1	+1	+1	
5	+1	-1	-1	
6	+1	-1	+1	
7	+1	+1	-1	
8	+1	+1	+1	
9	$-\alpha$	0	0	Pontos Axiais 2.K
10	$+\alpha$	0	0	
11	0	$-\alpha$	0	
12	0	$+\alpha$	0	
13	0	0	$-\alpha$	
14	0	0	$+\alpha$	
15	0	0	0	Pontos Centrais
16	0	0	0	
17	0	0	0	

Para que o planejamento seja ortogonal, utilizou-se o valor de $\alpha = 1,35$, um planejamento onde a matriz de variância e covariância é diagonal e os parâmetros estimados não são correlacionados entre si (BOX et al. 1978).

O cálculo de α foi realizado utilizando o *software Statistica 7.0*. Os níveis das variáveis estudadas foram colocados na forma codificada (adimensionalizada), utilizando a equação geral de codificação

$$X_n = \frac{(X - X_0)}{\frac{X_{+1} - X_{-1}}{2}} \quad (3.1)$$

sendo: X_n o valor da variável no experimento na forma codificada; X o valor real da variável a ser calculado; X_0 o valor real da variável no ponto central; X_{+1} o valor real da variável no nível superior e X_{-1} é o valor real da variável no nível inferior.

A variável dependente no planejamento utilizada nesta dissertação foi o crescimento de micro-organismos viáveis (NMP/mL) que é representada pela resposta (Y). O modelo polinomial de segunda ordem, obtido por um método de regressão múltipla, é representada pela equação.

$$Y = b_0 + \sum_{j=1}^k b_j x_j + \sum_{j=1}^k \sum_{m=1}^k b_{jm} x_j x_m + \sum_{j=1}^k b_{jj} x_j^2 \quad (3.2)$$

sendo: Y o crescimento de micro-organismos viáveis; k o nº de variáveis independentes; x as variáveis independentes; b_0 , b_j , b_{ij} , b_{jj} os parâmetros do modelo.

Com a equação empírica da regressão múltipla foi possível construir uma superfície de resposta que permitiu verificar a existência de uma região ótima para o crescimento de micro-organismos viáveis na qual se encontra uma faixa de combinação das variáveis em questão, além de deter informações sobre a robustez do processo, ou seja, qual a variação que pode ser admitida para um parâmetro ao redor do valor ótimo que mantém o processo na condição otimizada.

A esta equação foram aplicados os resultados experimentais obtidos e feita uma avaliação estatística da estimação dos parâmetros por meio dos valores de *t de Student* para cada um, sendo eliminados aqueles com nível de significância (valor-p) superior a 10%, ou seja, as variáveis relacionadas a estes foram consideradas não relevantes quando (valor-p) for superior a 10%. Assim os parâmetros não significativos foram eliminados, obtendo-se assim, uma equação que representa os efeitos das variáveis em determinado estudo.

Influência do pH, concentração de inóculo e lactose no crescimento de micro-organismos viáveis.

Foi utilizado um planejamento fatorial fracionário do tipo composto central (PCC) a dois níveis com três variáveis, com o objetivo de analisar a influência conjunta do pH, da concentração de lactose e de inóculo no crescimento de micro-organismos viáveis. Este planejamento foi realizado, utilizando o soro em pó, gentilmente cedido pela empresa Cargill

de Uberlândia. As Tabelas 3.3 e 3.4, fornecidas pela Cargill, mostram as especificações e informações nutricionais respectivamente.

Tabela 3.3 - Especificações do Soro em pó

Umidade(%)	Máx 4,5
pH (1:9) *	Min. 6
Cinzas (%)	Máx. 10
Bactérias mesófilas (UFC/g)	Máx. 30.000
Coliformes fecais (UFC/g)	Máx. 10
<i>Salmonella sp</i> (/25g)	ausente
<i>Staphylococcus aureus</i> (/g)	Máx. 100

Fonte: Cargill 2008

(*) - Fator de diluição.

Tabela 3.4- Informação nutricional (porção de 100 gramas)

Valor energético	380 Kcal(1590 Kj)
Carboidratos	73,9 g
Proteínas	12,5 g
Gorduras Totais	3,8 g
Gorduras Saturadas	2,3 g
Gorduras Trans	0,1 g
Fibra Alimentar	Menor 0,5 g
Sódio	1205,05 mg

Fonte: Cargill 2008

As faixas de concentração para as variáveis em estudo foram de 20 a 40g/L de lactose, 5 a 8 para o pH e de 0,5 a 1,5g/L de concentração de inóculo. Para a faixa de lactose, adotou-se como ponto central a concentração do soro de queijo próxima a do “*in natura*”. Para o pH adotou-se como valor da variável codificada -1 o valor 5, devido ao ponto isoelétrico das proteínas do soro, pois abaixo deste valor ocorreria precipitação das mesmas, não sendo favorável para o estudo. Por outro lado, pH muito básico, também não é recomendável, pois os micro-organismos deste estudo são acidófilos. Os valores adotados para a faixa de inóculo foi baseada na concentração inicial e final dos testes preliminares.

Os valores codificados e reais das variáveis do planejamento foram X_1 (concentração de lactose em g/L); X_2 (pH) e X_3 (concentração de inóculo em g/L), estão apresentados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 - Matriz do Planejamento Composto Central da concentração de lactose, pH e concentração de inóculo no crescimento de micro-organismos viáveis.

Exp	X_1 (g/L)	X_2	X_3 (g/L)
1	-1 (20)	-1 (5)	-1 (0,5)
2	-1 (20)	-1 (5)	+1 (1,5)
3	-1 (20)	+1 (8)	-1 (0,5)
4	-1 (20)	+1 (8)	+1 (1,5)
5	+1 (40)	-1 (5)	-1 (0,5)
6	+1 (40)	-1 (5)	+1 (1,5)
7	+1 (40)	+1 (8)	-1 (0,5)
8	+1 (40)	+1 (8)	+1 (1,5)
9	$-\alpha$ (16,4)	0 (6,5)	0 (1,0)
10	$+\alpha$ (43,531)	0 (6,5)	0 (1,0)
11	0 (30)	$-\alpha$ (4,4)	0 (1,0)
12	0 (30)	$+\alpha$ (8,52)	0 (1,0)
13	0 (30)	0 (6,5)	$-\alpha$ (0,3)
14	0 (30)	0 (6,5)	$+\alpha$ (1,7)
15	0 (30)	0 (6,5)	0 (1,0)
16	0 (30)	0 (6,5)	0 (1,0)
17	0 (30)	0 (6,5)	0 (1,0)

X_1 - Concentração de lactose, X_2 - pH e X_3 Concentração de inóculo

Os experimentos definidos pelo planejamento foram realizados em frasco erlenmeyer de 250 mL com 100 mL de meio e em frasco de penicilina de 50 mL com 40 mL de meio, colocado em mesa agitadora a 100 rpm a temperatura ambiente de $28 \pm 3^\circ\text{C}$, nos tempos definidos nos testes preliminares.

As padronizações dos inóculos foram realizadas, após 24h de fermentação do mesmo, conduzidos nas mesmas condições operacionais mencionadas no item 3.2. Para isto,

alíquotas de 25 mL foram centrifugadas à 12.500 rpm (corresponde a um campo centrífugo relativo de 18.900 g) para remoção das células.

Estas células removidas foram separadas do sobrenadante e pesadas na forma úmida e após a secagem da biomassa a 90°C até peso constante. Desta forma foi realizada uma relação entre massa seca e massa úmida de célula para 25 mL de meio centrifugado, de forma a manter a concentração inicial de biomassa conforme adotado para cada experimento do planejamento e nos demais testes realizados neste trabalho.

As Equações de codificação para a lactose, pH e inóculo são ilustradas nas equações a seguir:.

- concentração de lactose:

$$X_1 = \frac{X(g/L) - 30}{\frac{40 - 20}{2}} \quad (3.3)$$

- pH :

$$X_2 = \frac{X(g/L) - 6,5}{\frac{8 - 5}{2}} \quad (3.4)$$

- concentração de inóculo:

$$X_3 = \frac{X(g/L) - 1}{\frac{1,5 - 0,5}{2}} \quad (3.5)$$

Visando maximizar a concentração de micro-organismo em função das variáveis estudadas foi realizado a otimização dos parâmetros aplicando um algoritmo implementado no *software Maple 9.5*. A seguir os valores otimizados encontrados para as variáveis foi avaliado também dentro da região de otimização mostrada na superfície de resposta.

3.5 – ESTUDO DE REPRODUTIVIDADE

Visando avaliar a reprodutibilidade dos resultados obtidos no PCC foram realizados experimentos nas condições otimizadas aplicando um algoritmo implementado no *software Maple 9,5* nos resultados obtidos no PCC para os dois reatores (erlenmeyer e frascos de penicilina). Foi realizado também ensaios utilizando a menor concentração de lactose obtida dentro da região de otimização, já que esta variável era a de maior custo dentro das analisadas. Finalmente, foi realizado experimentos na condição de concentração média da lactose determinada no soro “*in natura*”, com a finalidade de utilizar o soro diretamente sem diluição no processo fermentativo.

3.6 – ESTUDO CINÉTICO

O estudo cinético foi realizado na condição otimizada para o pH e para a concentração de inóculo e na condição de concentração média da lactose em que se encontrava o soro “*in natura*” da fabricação de queijo mussarela, pois esta concentração encontrava-se dentro da região de otimização.

A cinética foi realizada durante 144 horas em três reatores: no erlenmeyer nas mesmas condições operacionais adotadas no PCC, utilizando soro em pó; no fermentador tanque agitado do modelo Biostat-B (Fig. 3.2), com 2L de capacidade e 1800 mL de volume útil com agitação mecânica de 200 rpm a temperatura ambiente de $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$ empregando soro em pó e finalmente foi realizado também uma cinética no mesmo reator e nas condições mencionadas anteriormente utilizando soro “*in natura*”.

Durante o processo fermentativo eram retiradas amostras para análise da concentração de lactose, de proteína e para a determinação de biomassa (em massa seca) e para a contagem das células viáveis empregando a técnica de números mais prováveis.



Figura 3.2- Foto do fermentador Biostat-B utilizado para realizar os ensaios.

3.7 – IMOBILIZAÇÃO CELULAR

Após o final da fermentação na condição otimizada, o meio fermentado foi centrifugado a 18.900g por 15 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o centrifugado foi ressuspenso em 10 mL, 20 mL, 30 mL, 40 mL e 50 mL de alginato de sódio a 1%.

A imobilização celular foi realizada pelo processo de encapsulação em alginato de cálcio ilustrado nas Figuras 3.3, 3.4 e 3.5. Foi preparada uma solução de alginato de sódio a 1% e células, outra solução de cloreto de cálcio 0,2 mol/ L e pelo uso de uma seringa foi feita a dispersão de gotículas da solução de alginato na solução de cloreto de cálcio o que gerou partículas esféricas de alginato de cálcio com células retidas em seu interior. As partículas com células imobilizadas foram então submetidas ao processo de secagem.

Após a imobilização, foram realizadas contagens das células encapsuladas, onde estas eram destruídas a partir da diluição usando citrato de sódio 0,1 M. Cada grama de célula imobilizada foi diluída em 25 mL de solução de citrato.



Figura 3.3- Frascos contendo células imobilizadas em cloreto de cálcio



Figura 3.4 - Células secas e imobilizadas.



Figura 3.5 - Células imobilizadas secas

Testes para a simulação da passagem pelo trânsito gastro- intestinal

Para se obter um efeito positivo das células probióticas, os micro-organismos deveriam sobreviver ao trânsito gastro-intestinal em ambientes com baixos valores de pH.

Baseado em estudos de HEIDEBACH et al em 2009, a taxa de sobrevivência dos micro-organismos foi estudada simulando condições gástricas em banhos a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e em uma solução de pH de $2,5 \pm 0,1$. Assim, 1 grama de células encapsuladas foi colocada na solução ácida por 30, 60 e 90 minutos. Depois foram feitas as contagens pela técnica de

número mais provável seguindo o mesmo processo com a solução de citrato descrito anteriormente.

Cálculo da taxa de sobrevivência na simulação das condições gástricas

A taxa de sobrevivência das células probióticas encapsuladas para diferentes tempos de incubação, a baixos valores de pH foi calculada pela equação.

$$\text{Taxa sobrevivência (\%)} = \frac{N(t = t_i)}{N_0(t = 0)} \times 100\% \quad (3.6)$$

Em que $N(t=0)$ é a contagem de células antes da incubação a baixos pH e $N(t=t_i)$ é a contagem de células para os vários tempos de incubação t_i .

3.7.2 – Estudo da qualidade do produto

A perda da viabilidade celular durante a estocagem do produto foi observada através da desativação térmica, a qual foi realizada em um banho termostatzado, mantendo as amostras de micro-organismos em temperaturas diversas para diferentes tempos de incubação. Nos testes, 0,5 gramas de células encapsuladas foram colocados em banhos a 40°C por 20h, 10h e 4h, a 60°C por 4h e 2h e a 70°C por 4h, 2h e 1h, baseados em estudos anteriores do mesmo grupo (COUTINHO-FILHO et al, 2007).

Para cada temperatura de estudo, foi avaliada a morte celular pelo ajuste do número de células viáveis ao modelo de morte celular de primeira ordem, mostrada anteriormente e a energia de ativação associada ao processo foi obtida pelo ajustes das constantes da cinética celular ao modelo de Arrhenius.

3. 8 – FORMULAÇÃO DA RAÇÃO

Foram realizadas duas diferentes formulações de rações com proporções diferentes de água, baseadas nos parâmetros físico-químicos mostrados no capítulo anterior (Brasil, 2009). Foram utilizados como constituintes, amido como fonte de carboidrato, farinha de

carne e farelo de torta de soja como fontes de proteína e óleo de soja como fonte de lipídeo. Estes ingredientes foram misturados com água em proporções adequadas para misturas dos ingredientes e, feito o preparo, a ração final foi submetida à secagem em estufa a 50⁰C, de forma a atender as exigências de composição mínima adequada para a alimentação de cachorros. No caso específico foi escolhida como referência a composição de rações para cachorros.

Todas as amostras de rações foram avaliadas em termos de composição de lipídeos totais, cinzas, fibra, proteína e teor de células viáveis. A Tabela 3.6 mostra os dois tipos de rações que foram formuladas no trabalho. Para cada 100 gramas de ração, foi adicionado 1g de células imobilizadas e feita contagem de células viáveis pela técnica de Número Mais Prováveis (NMP).

Tabela 3.6 - Fórmula da Ração

Ingredientes	Ração1	Ração2
Farinha de carne(%)	42	28
Óleo (%)	20	20
Amido (%)	30	43
CaCl ₂ (%)	2	2
Água (mL)	200	110
Farinha de soja(%)	--	14

3. 9 – MÉTODOS ANALÍTICOS

3.9.1 – Contagem de células viáveis

A contagem das células de bactérias lácteas viáveis foi feita em duplicata utilizando a técnica da contagem por número mais provável (NMP) (BRADBURY, 1984). Nesta técnica uma amostra de produto é submetida a sucessivas diluições em solução redutora e com a adição da solução diluída no meio MRS conforme mostram as Figuras 3.6 e 3.7. Nestas Figuras o meio MRS tem coloração marrom e a solução redutora (não representada na Figura 3.7) tem a coloração rosa. Na Figura 3.7 pode ser observado que a amostra com diluição

apropriada é distribuída em uma série de doze diluições com inoculação de cada diluição em três tubos de meio MRS.

Para a preparação da solução redutora colocou-se a solução em um erlenmeyer de 2 L, em cima de uma placa quente, com nitrogênio borbulhando por 15 minutos. Os frascos de penicilina de 10 mL eram cheios com 9 mL de solução redutora e depois eram autoclavados por 20 minutos. Esta solução era composta de 0,124 g/L de tioglicato de sódio, 0,1 g/L de ácido ascórbico e 4 mL de solução de resazurina (0,25 g/L). Este mesmo procedimento foi adotado para os frascos de penicilinas com meio MRS.

O número de células na amostra de diluição apropriada para o ensaio foi determinado pelo número de tubos onde o crescimento celular foi positivo até o décimo quinto dia contado após a inoculação. Com o número de crescimentos positivos foi feita a leitura em uma tabela estatística ou calculadora eletrônica apropriada para o cálculo estatístico.

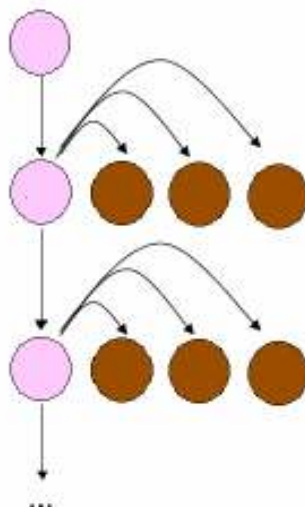


Figura 3.6 - Diluições feitas com MRS tubos (marrom) e com meio redutor (rosa), as setas indicam transferência de material com seringa para os diferentes frascos.



Figura 3.7 - Série de doze diluições, metodologia de NMP.

3.9.2 – Análise de lactose

As análises de lactose foram realizadas por espectrofotometria seguindo o Método DNS (MILLER, 1959). A metodologia experimental está apresentada no Anexo A. A análise para a determinação do teor de lactose das amostras foi realizada em triplicata. As curvas padrões construídas para a determinação da concentração de lactose estão apresentadas no Anexo A.

3.9.3 – Análise de proteína

A análise de proteína do soro de queijo foi feita por espectrofotometria seguindo o Método de LOWRY (1951), que se baseia na interação das proteínas com o reagente fenol e cobre, em condições alcalinas. As análises foram realizadas em triplicatas. O método encontra-se descrito no Anexo A, e as curvas padrões construídas para a determinação do teor de proteínas estão no Anexo A.

3.9.4 - pH

O pH foi medido em um medidor de pH DMpH-2 marca Digimed, previamente calibrado com soluções-padrão de pH = 4,0 e pH = 7,0.

3.9.5 – Análise da composição da ração

As análises foram realizadas na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

O método para análise de cinzas utilizado consistiu em calcinação da amostra em mufla. A amostra foi acondicionada em cadinho de porcelana, que em intervalos de tempos é submetido a ciclos de adição de ácido nítrico, aquecimento em temperatura entre 500-550 °C esfriamento e pesagem até massa constate.

A análise de fibra foi feita pelo método fibra bruta que consiste na digestão da amostra desengordurada com éter e etanol em soluções de ácido sulfúrico (1,25% ou 0,255 N) seguida da digestão em hidróxido de sódio (1,25% ou 0,313N) e análise gravimetria da fração fibra insolúvel retida em papel de filtro.

O método utilizado para análises de lipídios foi método de Soxhlet com o solvente éter de petróleo. Neste método a fração lipídica é extraída da amostra no extrator soxhlet e quantificada após a evaporação do solvente, segundo procedimento descrito no STANDARD METHODS, 1998.

O método de determinação de proteínas utilizado foi método Kjeldahl que é o método padrão para análise de alimentos. Neste método é feita a titulação do nitrogênio gerado pela digestão da amostra em ácido sulfúrico, segundo procedimento descrito no STANDARD METHODS, 1998.

O teor de água foi determinado pelo uso de estufa e o teor de carboidrato foi obtido pelo método de diferença entre os constituintes.

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo são apresentados e discutidos os principais resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho. Inicialmente, destacam-se os resultados da caracterização do soro de queijo “*in natura*”. Em seguida, apresenta-se e os resultados de um estudo preliminar , do estudo das variáveis (inóculo, lactose e pH) no crescimento de micro-organismos viáveis, e a o estudo cinético. Finalizando, são apresentados os resultados do processo de imobilização e da fabricação da ração.

4.1 - CARACTERIZAÇÃO DO SORO DE QUEIJO “*IN NATURA*”

Os resultados da caracterização do soro de queijo “*in natura*” estão apresentados na Tabela 4.1. Também estão mostrados os resultados obtidos por VILANI (2001), onde foram usados para ambos os casos, o soro “*in natura*” fornecido pela Cooperativa Agropecuária Ltda de Uberlândia (CALU). Os valores encontrados neste trabalho estão próximos daqueles obtidos por VILANI (2001) empregando soro de queijo mussarela desta mesma cooperativa.

Tabela 4.1 - Caracterização do soro de queijo “*in natura*” proveniente do queijo mussarela.

	Soro de queijo “ <i>in natura</i> ”	Soro de queijo “ <i>in natura</i> ” Vilani(2001)
pH	6,5 ± 0,5	3,5 - 6,5
Lactose (g/L)	33 ± 3	34 ± 2
Proteína (g/L)	3 ± 0,5	4,03 ± 0,9

Observa-se uma variabilidade significativa nas análises realizadas devido às diversidades sazonais e da produção ocorridas na Cooperativa de Laticínios. Estas variações dificultaram a reprodução dos próximos ensaios. A densidade média do soro “*in natura*” era de 1,25 ± 0,05 kg/L.

4.2. TESTE PRELIMINAR

Para se determinar o melhor tempo de crescimentos das culturas superconcentradas de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus thermophilus*, foram realizadas fermentações em reatores tipo erlenmeyer de 250 mL e frascos de penicilina de 50 mL. Os testes preliminares foram realizados com soro “*in natura*” com a concentração de lactose de 33 ± 3 g/L, pH de 6,5 e concentração de inóculo de $0,6 \pm 0,2$ g/L em mesa agitadora com 100 rpm a temperatura ambiente de $28 \pm 3^\circ\text{C}$. A Figura 4.1 mostra as células de *Lactobacillus*, no microscópio, com aumento de 100 vezes, e as Figuras 4.2 e 4.3 mostram os resultados do teste preliminar para os reatores tipo erlenmeyer e frascos de penicilina, respectivamente. Observa-se na figura que a cultura apresenta forma de bastonetes.

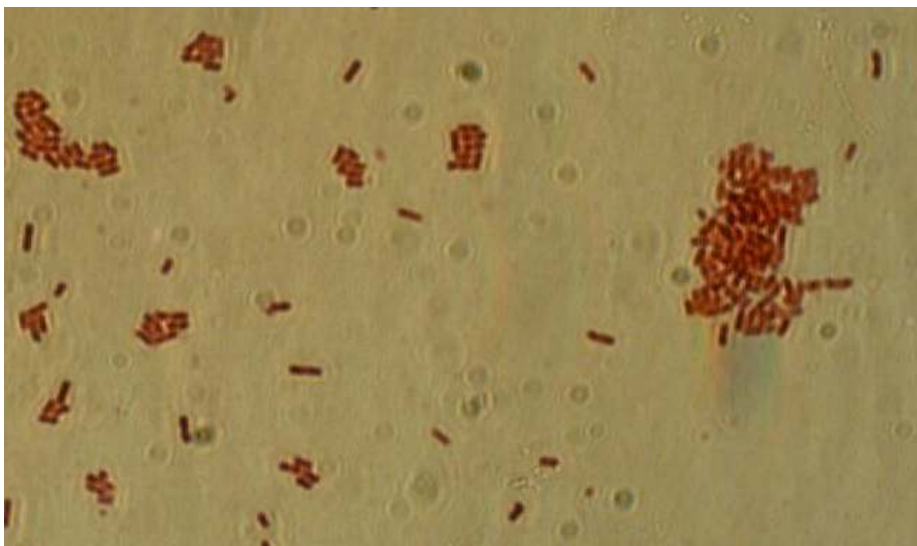


Figura 4.1 - Células de *Lactobacillus*

Observa-se pela Figura 4.2 que a partir de 36 h não houve crescimento significativo de micro-organismo, de consumo de lactose e de proteína no reator tipo erlenmeyer. Estes mesmos comportamentos foram notados para os reatores tipo frascos de penicilinas a partir de 48 h, na Figura 4.3. Assim, adotaram-se os seguintes tempos de fermentação para os próximos ensaios: 36 h para o erlenmeyer e 48 h para os frascos de penicilinas. Vale ressaltar que todos os experimentos foram realizados em duplicata.

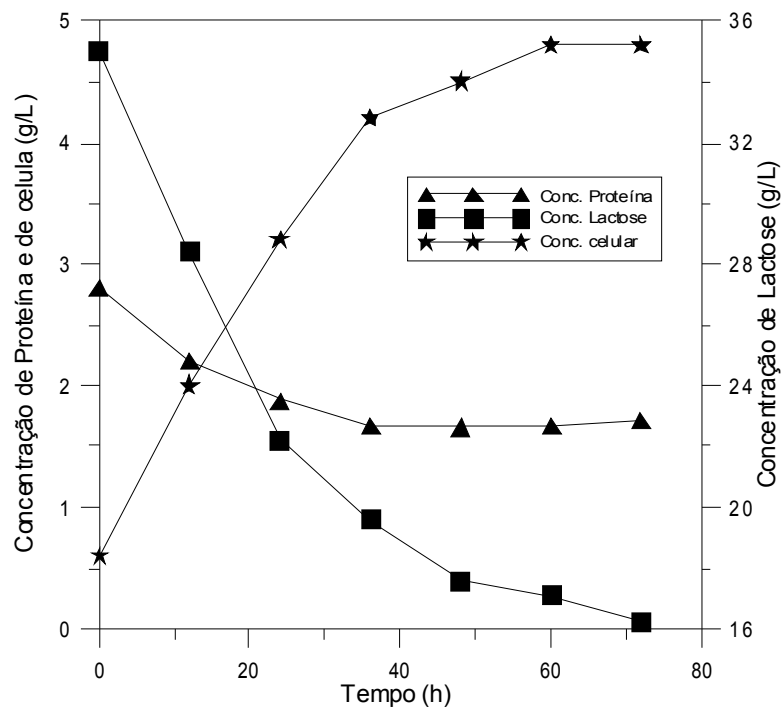


Figura 4.2 - Concentração de lactose, proteína e crescimento microbiano em função do tempo em erlenmeyer

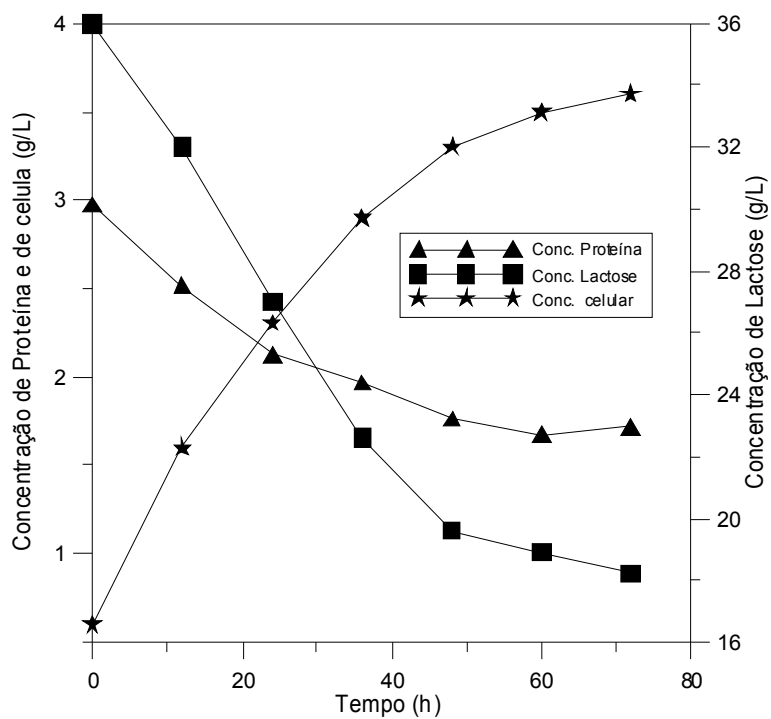


Figura 4.3 - Concentração de lactose, proteína e crescimento microbiano em função do tempo em frascos de penicilinas

A comparação entre as Figuras 4.2 e 4.3 mostrou que foi necessário um menor tempo para atingir a estabilização do crescimento de biomassa no erlenmeyer, este fato provavelmente ocorreu devido ao maior contato entre o meio fermentativo e os micro-organismos e maior transferência de massa entre estas fases, em consequência a melhor agitação do meio no erlenmeyer. Esta melhora ocorreu devido à maior área disponível para a movimentação do meio durante a fermentação.

Apesar dos resultados com o erlenmeyer terem sido melhores, foi realizado na sequência, dois planejamentos de experimentos um com cada reator (erlenmeyer e frascos de penicilina), pois a avaliação conjunta das variáveis numa faixa de concentração de lactose, pH e de inóculo poderia determinar condições que propiciassem melhor comparação entre os dois modelos de reatores utilizados.

A concentração de proteína precipitada após autoclavação do soro “*in natura*” (conforme procedimento descrito no capítulo anterior) era de 3 g/L. Este valor foi descontado da massa seca obtida no início e no fim da fermentação. Para o soro em pó foi realizado apenas a autoclavação da água de diluição. Assim, foi determinado a proteína precipitada com a redução do pH para valores próximo ao obtido no final da fermentação, que foi de 1,2 g/L . Este valor também foi subtraído das massas secas obtidas.

4.3. ANÁLISE DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL NO ERLENMEYER

Acerca dos resultados apresentados na Tabela 4.2 referente ao projeto experimental no erlenmeyer constituído de três variáveis (concentração de lactose (X_1), pH (X_2) e concentração de inóculo (X_3)) totalizando 34 experimentos em duplicata, verificou que algumas considerações relacionadas à influência destas variáveis na resposta de crescimento celular em número mais provável (NMP/mL) foram relevantes.

Neste planejamento foi adotado 36 horas de fermentação, pois desejava-se otimizar uma condição de processo em menor tempo de operação, sem comprometer os resultados de crescimento celular. Além disto, para tempos maiores poderia ocorrer que alguns experimentos do planejamento não apresentassem diferenças significativas de crescimento celular, o que poderia comprometer a realização da otimização.

Tabela 4.2 - Resultados de crescimento celular no erlenmeyer em NMP/mL nas condições experimentais da matriz do planejamento composto central.

Exp	X ₁ (g/L)	X ₂	X ₃ (g/L)	NMP/mL
1	-1 (20)	-1 (5)	-1 (0,5)	$(9,2 \pm 2) \cdot 10^7$
2	-1 (20)	-1 (5)	+1 (1,5)	$(5,2 \pm 2,3) \cdot 10^8$
3	-1 (20)	+1 (8)	-1 (0,5)	$(8,1 \pm 3,1) \cdot 10^7$
4	-1 (20)	+1 (8)	+1 (1,5)	$(1,5 \pm 2,6) \cdot 10^8$
5	+1 (40)	-1 (5)	-1 (0,5)	$(6,0 \pm 1,7) \cdot 10^8$
6	+1 (40)	-1 (5)	+1 (1,5)	$(3,5 \pm 3,2) \cdot 10^9$
7	+1 (40)	+1 (8)	-1 (0,5)	$(7,9 \pm 1,5) \cdot 10^8$
8	+1 (40)	+1 (8)	+1 (1,5)	$(4,0 \pm 3,3) \cdot 10^9$
9	+ α (16,4)	0 (6,5)	0 (1,0)	$(6,0 \pm 1,8) \cdot 10^9$
10	+ α (43,531)	0 (6,5)	0 (1,0)	$(1,2 \pm 2,3) \cdot 10^{10}$
11	0 (30)	- α (4,4)	0 (1,0)	$(7,2 \pm 1,9) \cdot 10^9$
12	0 (30)	+ α (8,52)	0 (1,0)	$(8,0 \pm 3,7) \cdot 10^8$
13	0 (30)	0 (6,5)	- α (0,3)	$(7,2 \pm 2,5) \cdot 10^8$
14	0 (30)	0 (6,5)	+ α (1,7)	$(1,2 \pm 2,6) \cdot 10^{10}$
15	0 (30)	0 (6,5)	0 (1,0)	$(3,2 \pm 1,3) \cdot 10^{10}$
16	0 (30)	0 (6,5)	0 (1,0)	$(3,5 \pm 1,7) \cdot 10^{10}$
17	0 (30)	0 (6,5)	0 (1,0)	$(3,0 \pm 1,1) \cdot 10^{10}$

X₁ = concentração de lactose, X₂ = pH e X₃ = concentração de inóculo. Valores das variáveis na forma codificada: +1, -1, 0 + α e - α .

Observa-se na Tabela 4.2, que os resultados de crescimento celular variaram entre $8,1 \cdot 10^7$ NMP/mL (ensaio 3) a $3,5 \cdot 10^{10}$ NMP/mL (ensaio 16). Verifica-se também, que os melhores resultados, de todas as respostas avaliadas foram obtidos nos experimentos localizados no ponto central (experimentos 15, 16 e 17). Outro ponto que obteve-se quantidade de micro-organismos na ordem de 10^{10} NMP/mL foi no experimento 10, que foi realizado em maior concentração de lactose e nas mesmas condições de pH e de concentração de inóculo do ponto central. As análises estatísticas utilizando a técnica da superfície de resposta confirmaram que o ponto ótimo encontra-se em torno do ponto central.

Com os resultados obtidos na Tabela 4.2 foi possível analisar estatisticamente o comportamento do crescimento celular. Para isto, realizou-se a regressão múltipla no programa *Statistic 7*. Os resultados obtidos desta análise estão apresentados na Tabela 4.3 e na equação abaixo, nos quais são mostrados os parâmetros significativos e não significativos, bem como os valores dos níveis de significância relacionados aos mesmos. O coeficiente de determinação (R^2) de 0,89 indica um ajuste adequado dos dados experimentais em relação ao crescimento de micro-organismo, mostrando que 89% da variabilidade dos dados foram explicadas pela equação empírica.

Tabela 4.3 - Valores das variáveis obtidos com a regressão múltipla para o crescimento celular no erlenmeyer

Variáveis e interações	Coefficiente de regressão	t(7)	p
Termo independente	$2,894182 \cdot 10^{10}$	9,54611	0,000029
X_1	$1,386203 \cdot 10^9$	0,81040	0,444385
$(X_1)^2$	$-8,514804 \cdot 10^9$	-3,77445	0,006942
X_2	$-7,160933 \cdot 10^8$	-0,41864	0,688025
$(X_2)^2$	$-1,124562 \cdot 10^{10}$	-4,98497	0,001592
X_3	$1,875360 \cdot 10^9$	1,09637	0,309197
$(X_3)^2$	$-9,956677 \cdot 10^9$	-4,41360	0,003105
$X_1 X_2$	$1,338750 \cdot 10^8$	0,06482	0,950127
$X_1 X_3$	$7,016250 \cdot 10^8$	0,33973	0,744024
$X_2 X_3$	$-6,125000 \cdot 10^6$	-0,00297	0,997716

$$Y = 2,894 \cdot 10^{10} + 1,386 \cdot 10^9 X_1 - 8,514 \cdot 10^9 X_1^2 - 7,160 \cdot 10^8 X_2 - 1,124 \cdot 10^{10} X_2^2 + 1,875 \cdot 10^9 X_3 - 9,956 \cdot 10^9 X_3^2 + 1,338 \cdot 10^8 X_1 X_2 + 7,016 \cdot 10^8 X_1 X_3 - 6,125 \cdot 10^6 X_2 X_3 \quad (4.1)$$

Após a eliminação dos parâmetros com nível de significância, no teste t-student superiores a 10%, a equação resultante deste ajuste está apresentada pela equação abaixo, onde apenas os termos quadráticos foram significativos:

$$Y = 2,894 \cdot 10^{10} - 8,514 \cdot 10^9 X_1^2 - 1,124 \cdot 10^{10} X_2^2 - 9,956 \cdot 10^9 X_3^2 \quad (4.2)$$

O coeficiente de correlação (R^2) obtido após o ajuste foi de 0,86. A partir da Equação geral (Eq. 4.1) foi implementado um algoritmo no software *Maple 9.5* para calcular o ponto ótimo, visando maximizar a concentração de micro-organismo em função das variáveis estudadas. Os valores reais das variáveis no ponto de maximização foram: concentração de lactose de 30,85 g/L, pH 6,45 e concentração de inóculo de 1,04 g/L. Para estes valores de X_1 , X_2 e X_3 , obteve-se experimentalmente como resposta $2,7 \times 10^{10}$ NMP/mL. A partir dos valores codificados das variáveis X_1 , X_2 e X_3 no ponto de máximo determinou-se, pela Equação 4.2, que o crescimento celular foi de $2,9 \times 10^{10}$ NMP/mL, teoricamente. Os resultados mostram que o modelo está representando bem os valores obtidos experimentalmente, tendo um erro de apenas 4% do experimental para o teórico.

A Figura 4.4 ilustra a representação dos valores preditos em função dos observados e a Figura 4.5 mostra a distribuição dos resíduos em torno de zero.

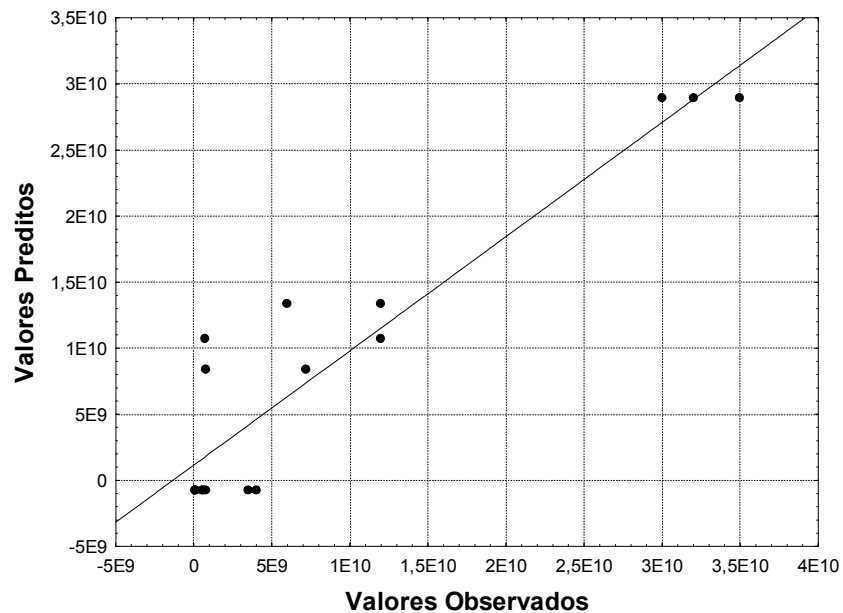


Figura 4.4 - Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta crescimento celular em erlenmeyer.

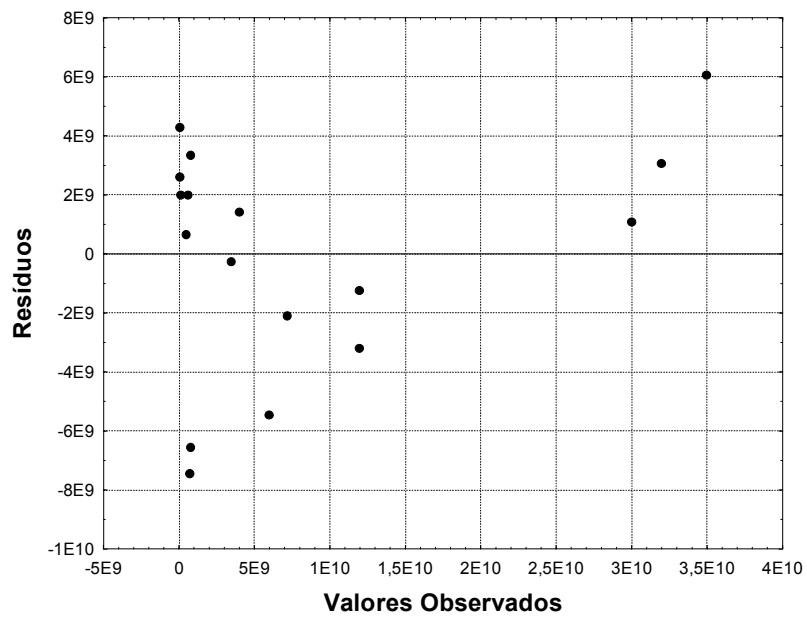


Figura 4.5 - Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica a normalidade para a resposta crescimento celular em erlenmeyer.

A Figura 4.4 mostra que os valores dos resultados experimentais para o crescimento celular, apresentaram bem próximos aos valores fornecidos pela equação empírica.

Observando a Figura 4.5 verifica-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando nenhuma tendência quanto a distribuição.

Para ilustrar os efeitos das variáveis no crescimento da cultura em estudo, estão apresentadas nas Figuras 4.6, 4.7 e 4.8 as superfícies de resposta e as curvas de contorno. Estas figuras mostram a região de otimização das variáveis em valores reais, duas a duas, em relação à resposta crescimento celular.

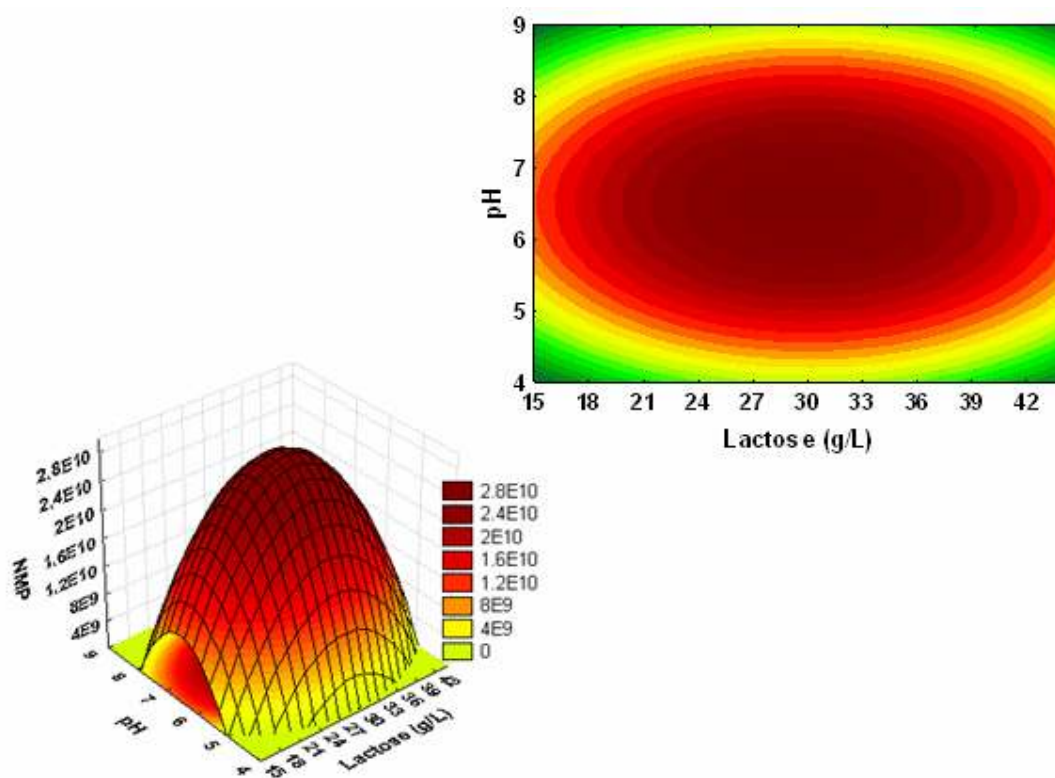


Figura 4.6- Superfície de resposta e curva de contorno para o crescimento de micro-organismos em função da concentração de lactose e do pH nos reatores tipo erlenmeyer

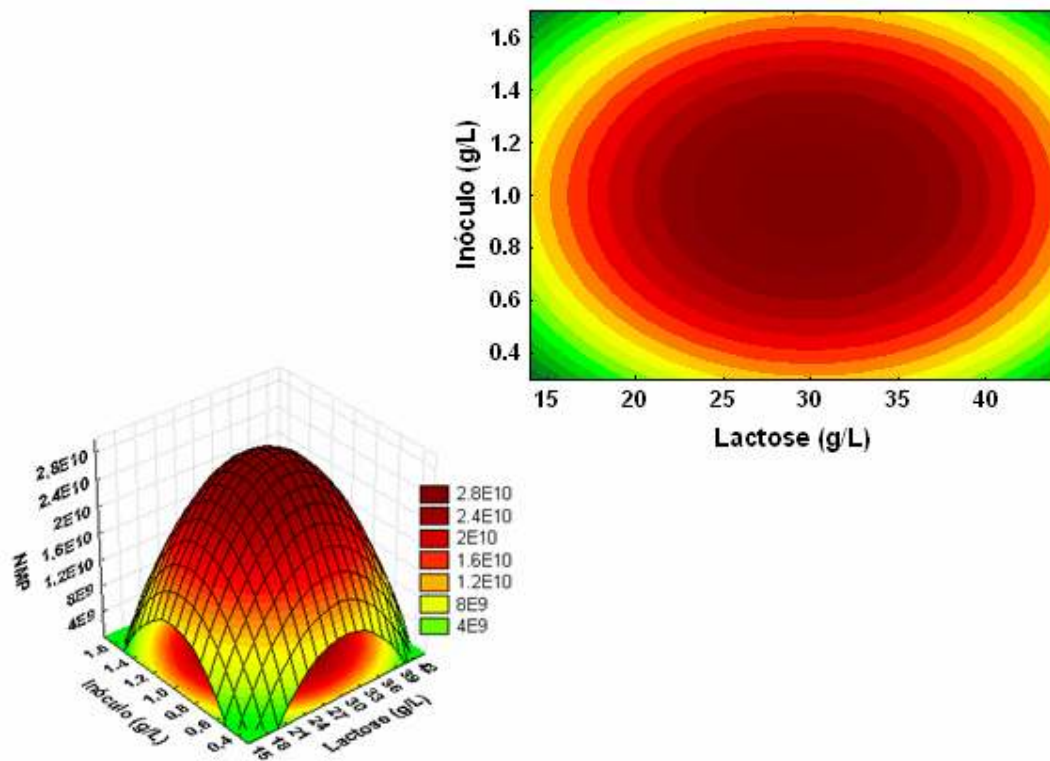


Figura 4.7 - Superfície de resposta e curva de contorno para o crescimento de micro-organismo em função da concentração de lactose e de inóculo nos reatores do tipo erlenmeyer.

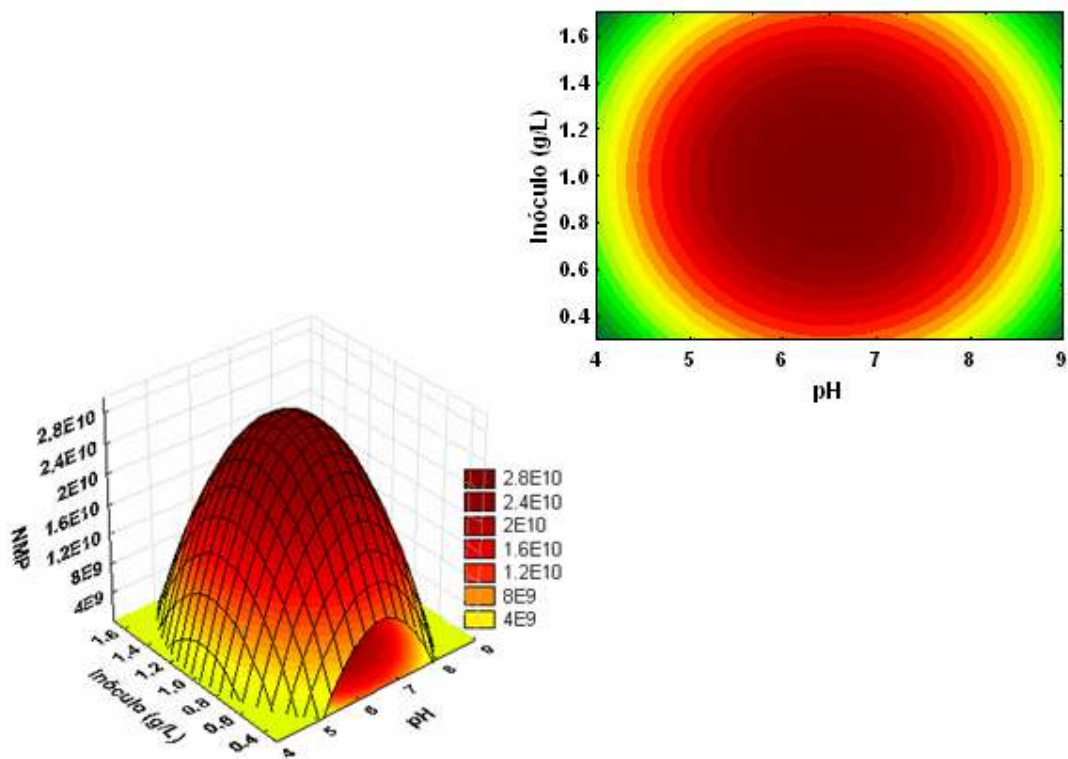


Figura 4.8 - Superfície de resposta e curva de contorno para o crescimento de micro-organismo em função do pH e da concentração de inóculo nos reatores do tipo erlenmeyer.

Verifica-se, que as regiões de otimização, mostradas nas Figuras 4.6, 4.7 e 4.8, apresentam as seguintes faixas de concentrações de lactose 27 a 35 g/L, inóculo de 0,8 a 1,2 g/L e pH de 6,0 a 7,0. Como era de se esperar o ponto otimizado obtidos no programa Maple 9.5 (concentração de lactose de 30,85 g/L, pH 6,45 e concentração de inóculo de 1,04 g/L), encontra-se dentro das regiões de otimização mostrada anteriormente.

4.4. ANÁLISE DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL NOS FRASCOS DE PENICILINA

A seguir estão apresentados na Tabela 4.4 os resultados obtidos para o crescimento celular utilizando o reator do tipo frascos de penicilina empregando as mesmas variáveis e faixas de concentração utilizadas do planejamento anterior (concentração de lactose (X_1), pH (X_2) e concentração de inóculo (X_3)). Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Neste planejamento foi adotado 48 horas de fermentação, pois conforme resultados dos testes preliminares este era o menor tempo de operação, que não comprometeria os resultados de crescimento celular. Além disto, para tempos maiores poderia ocorrer que alguns experimentos do planejamento não apresentassem diferenças significativas no crescimento da biomassa o que poderia comprometer a realização da otimização.

Tabela 4.4 - Resultados de crescimento celular nas condições experimentais da matriz do planejamento composto central nos frascos de penicilina

Exp	X ₁ (g/L)	X ₂	X ₃ (g/L)	NMP/mL
1	-1 (20)	-1 (5)	-1 (0,5)	$(9,5 \pm 2,1) \cdot 10^6$
2	-1 (20)	-1 (5)	+1 (1,5)	$(3,2 \pm 2,4) \cdot 10^7$
3	-1 (20)	+1 (8)	-1 (0,5)	$(2,1 \pm 2,6) \cdot 10^6$
4	-1 (20)	+1 (8)	+1 (1,5)	$(1,3 \pm 3,1) \cdot 10^7$
5	+1 (40)	-1 (5)	-1 (0,5)	$(9,2 \pm 1,1) \cdot 10^8$
6	+1 (40)	-1 (5)	+1 (1,5)	$(7,6 \pm 1,8) \cdot 10^9$
7	+1 (40)	+1 (8)	-1 (0,5)	$(6,2 \pm 1,5) \cdot 10^7$
8	+1 (40)	+1 (8)	+1 (1,5)	$(1,4 \pm 1,8) \cdot 10^9$
9	$-\alpha$ (16,4)	0 (6,5)	0 (1,0)	$(3,2 \pm 1,4) \cdot 10^7$
10	$+\alpha$ (43,531)	0 (6,5)	0 (1,0)	$(9,3 \pm 2,2) \cdot 10^9$
11	0 (30)	$-\alpha$ (4,4)	0 (1,0)	$(3,2 \pm 2,7) \cdot 10^7$
12	0 (30)	$+\alpha$ (8,52)	0 (1,0)	$(9,7 \pm 2,6) \cdot 10^8$
13	0 (30)	0 (6,5)	$-\alpha$ (0,3)	$(5,2 \pm 2,3) \cdot 10^6$
14	0 (30)	0 (6,5)	$+\alpha$ (1,7)	$(9,8 \pm 1,7) \cdot 10^9$
15	0 (30)	0 (6,5)	0 (1,0)	$(9,7 \pm 0,7) \cdot 10^9$
16	0 (30)	0 (6,5)	0 (1,0)	$(1,2 \pm 0,5) \cdot 10^{10}$
17	0 (30)	0 (6,5)	0 (1,0)	$(9,6 \pm 0,8) \cdot 10^9$

X₁ = concentração de lactose, X₂ = pH e X₃ = concentração de inóculo. Valores das variáveis na forma codificada: +1, -1, 0 + α e - α .

Observa-se na Tabela 4.4, que os resultados de crescimento celular variaram entre $2,1 \cdot 10^6$ NMP/mL (ensaio 3) a $1,2 \cdot 10^{10}$ NMP/mL (ensaio 16). Verifica-se que nos experimentos localizados no ponto central foram obtidos os melhores valores de crescimento celular (experimentos 15, 16 e 17) que foi da ordem de 10^9 NMP/mL. Os resultados mostram que nos experimentos com maiores concentração de lactose e inóculo (14, 10, 8 e 6) também apresentaram esta mesma ordem de grandeza para o crescimento celular.

A análise estatística do comportamento do crescimento celular foi realizada através de regressão múltipla no programa *Statistic 7*. Os resultados obtidos desta análise estão apresentados na Tabela 4.5 e na equação a seguir, nos quais são mostrados os parâmetros

significativos e não significativos, bem como os valores dos níveis de significância relacionados aos mesmos.

Tabela 4.5 - Valores das variáveis obtidos com a regressão para o crescimento celular em frascos de penicilina.

Variáveis e interações	Coefficiente de regressão	t(7)	p
Termo independente	$9,707174 \cdot 10^9$	7,11045	0,000192
X_1	$1,926459 \cdot 10^9$	2,50113	0,040925
$(X_1)^2$	$-2,244429 \cdot 10^9$	-2,20947	0,062846
X_2	$-4,986465 \cdot 10^8$	-0,64739	0,538021
$(X_2)^2$	$-4,519202 \cdot 10^9$	-4,44882	0,002976
X_3	$1,826889 \cdot 10^9$	2,37185	0,049471
$(X_3)^2$	$-2,115207 \cdot 10^9$	-2,08226	0,075831
$X_1 X_2$	$-8,789500 \cdot 10^8$	-0,94515	0,376055
$X_1 X_3$	$9,980750 \cdot 10^8$	1,07325	0,318760
$X_2 X_3$	$-6,692000 \cdot 10^8$	-0,71960	0,495088

$$M = 9,707 \cdot 10^9 - 1,926 \cdot 10^9 X_1 - 2,244 \cdot 10^9 X_1^2 - 4,986 \cdot 10^8 X_2 - 4,519 \cdot 10^9 X_2^2 + 1,826 \cdot 10^9 X_3 - 2,115 \cdot 10^9 X_3^2 - 8,789 \cdot 10^8 X_1 X_2 + 9,980 \cdot 10^8 X_1 X_3 - 6,692 \cdot 10^8 X_2 X_3 \quad (4.3)$$

O coeficiente de determinação (R^2) foi de 87%, indica um ajuste adequado dos dados experimentais em relação ao crescimento de micro-organismo, mostrando que 87% da variabilidade dos dados foram explicadas pela equação empírica.

Após a eliminação do termo não significativo ($X_1 X_2$, $X_1 X_3$, $X_2 X_3$ e X_2) para a resposta em estudo, foi obtida a equação empírica ajustada para o crescimento celular, com R^2 de 81% :

$$M = 9,707 \cdot 10^9 + 1,926 \cdot 10^9 X_1 - 2,244 \cdot 10^9 X_1^2 - 4,519 \cdot 10^9 X_2^2 + 1,826 \cdot 10^9 X_3 - 2,11 \cdot 10^9 X_3^2 \quad (4.4)$$

Como mencionado anteriormente, os experimentos 14, 10, 8 e 6 que utilizaram maiores concentrações de inóculo e de lactose também apresentaram valores de crescimento de micro-organismos na ordem de grandeza de 10^9 NMP/mL, indicando que estas variáveis foram as que mais influenciaram no processo, conforme apresentado na Equação 4.4. Os experimentos 8 e 6 mostram que o pH não influenciou significativamente no processo, pois

essa ordem de grandeza no crescimento também foi obtida para concentrações elevadas de lactose e inóculo e para valores de pH maiores e menores. Este comportamento também pode ser observado comparando os experimentos 1 e 3 e 2 e 4. Estes fatos podem ser comprovados pelo modelo apresentado na Equação 4.4.

Os valores reais das variáveis no ponto de maximização, implementado pelo algoritmo software Maple 9.5, utilizando a Equação geral (Eq. 4.3) foram: concentração de lactose de 35,92 g/L, pH de 6,26 e concentração de inóculo de 1,3 g/L. Para estes valores de X_1 , X_2 e X_3 obteve-se experimentalmente como resposta $9,8 \cdot 10^9$ NMP/mL. A partir dos valores codificados das variáveis X_1 , X_2 e X_3 no ponto de máximo verificou-se pela Equação 4.2 que o crescimento celular teórico neste ponto foi de $1,0 \cdot 10^{10}$ NMP/mL. Novamente, observa-se um bom ajuste do modelo em relação aos resultados obtidos experimentalmente, tendo um erro de apenas 5% dos dados experimentais para o teórico.

A Figura 4.9 ilustra a representação dos valores preditos em função dos observados e a Figura 4.10 mostra a distribuição dos resíduos em torno de zero.

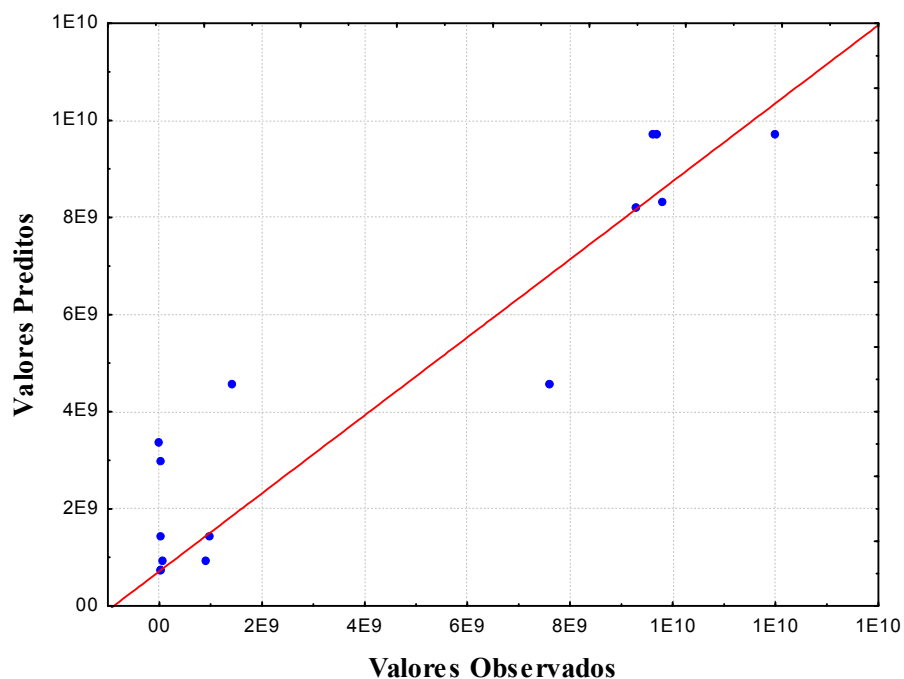


Figura 4.9- Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo para a resposta crescimento celular para reatores frascos de penicilina

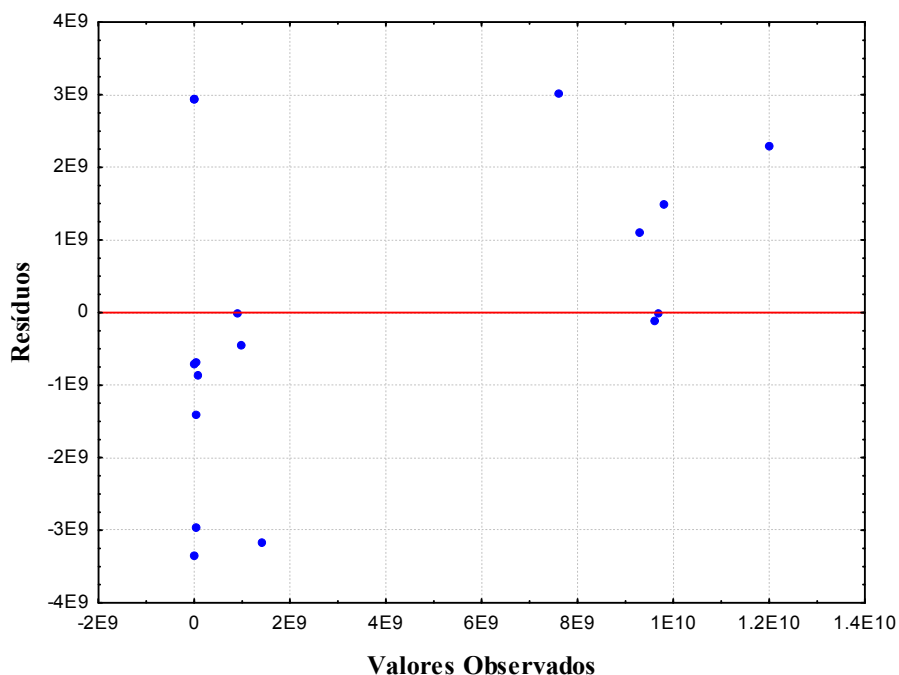


Figura 4.10 - Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica a normalidade para a resposta crescimento celular para reatores frascos de penicilina.

Observa-se na Figura 4.9, verifica-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando qualquer tendência quanto à distribuição. Na Figura 4.10, nota-se que o modelo descrito pela equação empírica se ajustou bem aos resultados experimentais, por isso foi verificada a proximidade dos dados experimentais à curva.

Como forma de ilustrar a influência das variáveis na concentração de micro-organismo, apresenta-se nas Figuras 4.11, 4.12 e 4.13 as superfícies de respostas e as curvas de contorno das variáveis concentração de lactose, inóculo e pH em relação à resposta crescimento celular.

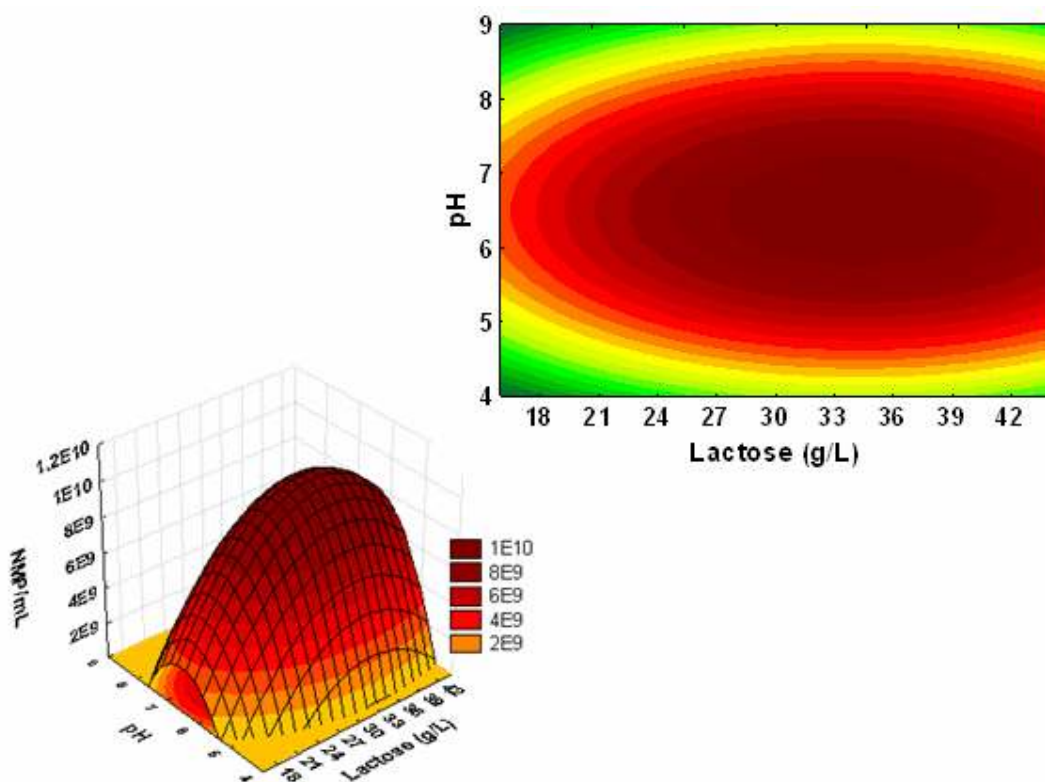


Figura 4.11 - Superfície de resposta e curva de contorno para o crescimento de micro-organismo em função da concentração de lactose e pH nos reatores do tipo frascos de penicilina.

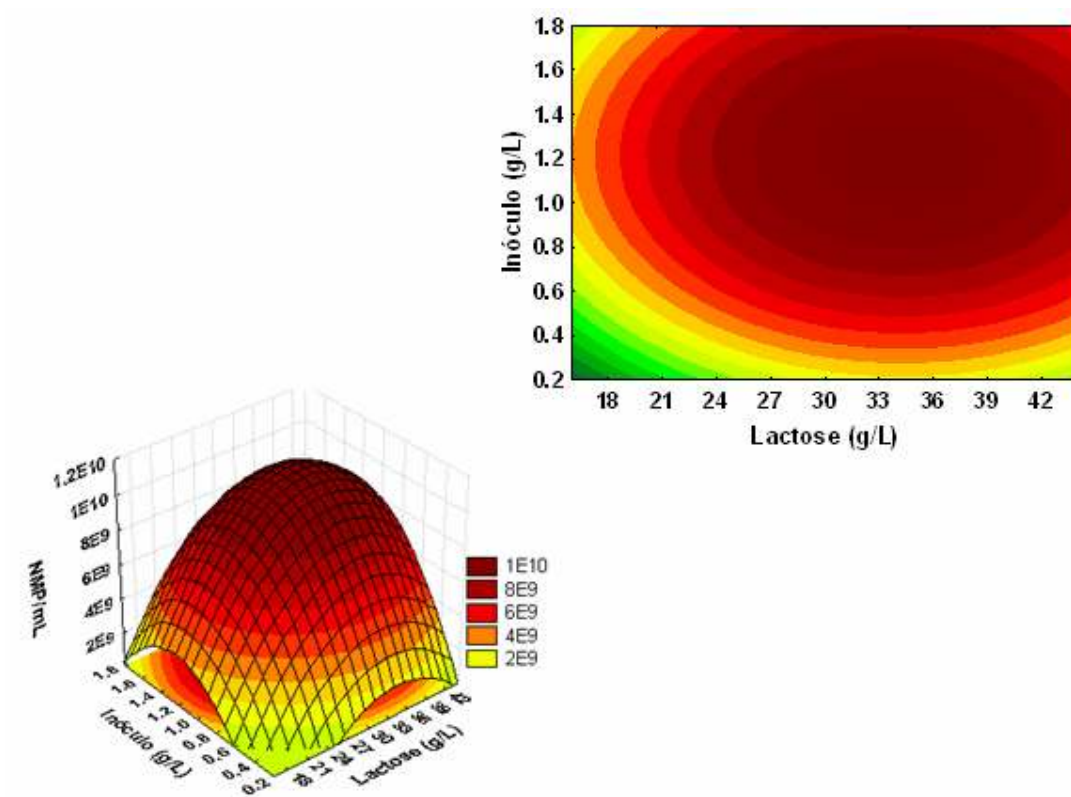


Figura 4.12 - Superfície de resposta e curva de contorno para o crescimento de micro-organismo em função da concentração de lactose e de inóculo nos reatores do tipo frascos de penicilina.

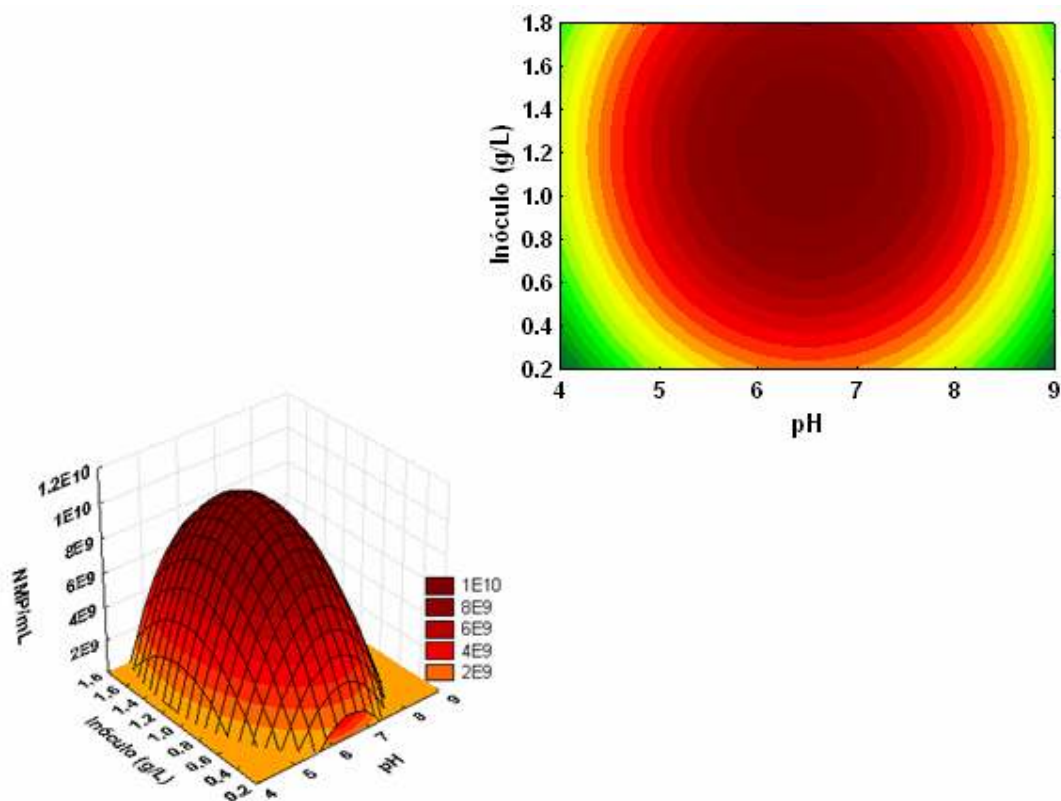


Figura 4.13- Superfície de resposta e curva de contorno para o crescimento de micro-organismo em função de pH e da concentração de inóculo nos reatores do tipo frascos de penicilina

As curvas de contorno das Figuras 4.11, 4.12 e 4.13 mostram que a região de maximização de produção celular encontra-se nas seguintes faixas: de 30 a 38 g/L para a lactose, de 6 a 7 para o pH e de 1,0 a 1,4 g/L para concentração de inóculo.

Pode-se observar que os resultados para os reatores tipo erlenmeyer foram mais satisfatórios em menor tempo de fermentação. Como já mencionado anteriormente, nos reatores tipo erlenmeyer tem-se melhor transferência de massa em consequência do maior contato das fases, isto porque, o erlenmeyer apresenta maior área livre para a agitação. Além disso, pode-se observar que a coluna de oxigênio não inibiu a atividade metabólica do micro-organismo. No erlenmeyer como a agitação foi mais eficiente, pode ter ocorrido maior diluição do ácido favorecendo o processo difusional na célula. Por outro lado, no reator tipo frascos de penicilina, como o espaço para agitação era muito menor, a célula permanecia na parte inferior do reator e devido a pouca eficiência na agitação, a concentração de ácido próximo da mesma pode ter sido maior, provocando algum tipo de inibição no crescimento celular o que ocasionou resultados menores desta variável para maiores tempo de

fermentação. Devido a todos estes fatores, todos os ensaios posteriores foram realizados apenas em reatores tipo erlenmeyer.

4.5 - ESTUDO DA REPRODUTIBILIDADE

Visando avaliar a reprodutibilidade dos resultados obtidos no planejamento, foram realizados experimentos na condição otimizada obtido pela aplicação do algoritmo no software Maple 9.5 para frascos de penicilina (35,92 g/L de lactose, pH de 6,2 e concentração de inóculo de 1,3 g/L), obtendo como resposta $(9,8 \pm 0,7) \cdot 10^9$ NMP/mL em 48 horas de fermentação e para o erlenmeyer (30,85 g/L de lactose, pH de 6,5 e concentração de inóculo de 1,04 g/L), no qual obteve como resposta $(2,1 \pm 1,2) \cdot 10^{10}$ NMP/mL em 36 horas de processo. Como as variáveis concentração de inóculo e pH são de baixo custo e visando avaliar o crescimento celular em menor concentração de lactose, dentro da região de otimização para cada tipo de reator, sem prejudicar o crescimento celular foi realizado também experimentos nas seguintes condições: concentração de lactose de 30 g/L, inóculo de 1,3 g/L e pH de 6,2 para reator tipo frasco de penicilina e de 27 g/L, inóculo de 1 g/L e pH de 6,5 para reator tipo erlenmeyer. Os resultados obtidos foram de $2,3 \pm 1,1 \cdot 10^9$ NMP/mL em 48 horas de processo no reator frasco de penicilina e de $(9,7 \pm 2,3) \cdot 10^9$ NMP/mL em 36 horas de fermentação no erlenmeyer.

Outro ponto avaliado foi na concentração de lactose de 33 g/L, inóculo de 1,0 g/L e de pH 6,5. Este ponto foi interessante porque análises de concentração de lactose e medidas de pH no soro de queijo mussarela “*in natura*” apresentaram valores próximos a este. O resultado foi de $9,7 \pm 0,7 \cdot 10^9$ NMP/mL em frascos de penicilina e de $(1,7 \pm 1,6) \cdot 10^{10}$ NMP/mL em erlenmeyer num menor tempo de fermentação (36 horas). Verificou-se que dentro da região de otimização os valores obtidos para a concentração micro-organismos foram da ordem de 10^{10} NMP/mL e no ponto em que a concentração de lactose foi de 30 g/L a concentração da biomassa em massa seca foi de $5,3 \pm 0,7$ g/L, na temperatura ambiente de $28 \pm 3^\circ\text{C}$. Os valores obtidos foram superiores aos encontrados por TARI et al. (2009) que obtiveram valores de 4,35 g/L na temperatura de 35°C . Coutinho Filho e colaboradores (2007) avaliando a concentração de célula em um produto comercial obtiveram 10^{10} células/g.

4.6 - ANÁLISE CINÉTICA NA CONDIÇÃO OTIMIZADA

A cinética de um processo fermentativo constitui uma etapa fundamental, pois permite uma análise da evolução dos valores de concentração de um ou mais componentes do sistema de cultivo, em função do tempo de fermentação. Assim foram realizados três estudos cinéticos, o primeiro utilizando reator erlenmeyer de 250 mL com 100 mL de meio com soro em pó diluído (concentração de lactose = 33 g/L) em mesa agitadora de 100 rpm e temperatura ambiente de $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$. O segundo utilizando um fermentador do tipo tanque agitado com capacidade de 2 L e volume útil de 1,8 L de meio com soro em pó diluído (concentração de lactose = 33 g/L), com agitação mecânica de 200 rpm e temperatura ambiente de $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$. O terceiro foi realizado no mesmo reator e nas mesmas condições mencionadas anteriormente, com a diferença de utilizar como meio o soro “*in natura*” de queijo mussarela, gentilmente cedido pela Cooperativa Agropecuária de Uberlândia. As condições adotadas foram concentração de $33 \pm 0,5\text{g/L}$ de lactose, pH inicial de 6,5 e concentração de inóculo de 1,0 g/L. Esta concentração de lactose foi adotada porque este valor foi obtido no soro “*in natura*”.

As Figura 4.14 e 4.15 mostram os perfis de concentrações nos reatores tipo erlenmeyer e fermentador tanque agitado, respectivamente, tendo como meio soro em pó diluído.

Comparando as três cinéticas verifica-se que o comportamento foi muito próximo para o crescimento celular, consumo de lactose e de proteína, mostrando que a ampliação de escala não alterou o comportamento cinético da cultura em relação às variáveis anteriormente mencionadas. Pode-se observar também que em 36 horas de fermentação a cultura atingiu a ordem de 10^{10} NMP/mL em ambos os reatores. Porém, verifica-se um pequeno aumento no crescimento celular quando foi utilizado o fermentador tanque agitado tanto em termos de micro-organismos viáveis como em biomassa. Este comportamento mostra que a ampliação de escala realmente não comprometeu o crescimento celular e que o reator do tipo tanque agitado pode ser utilizado com eficiência como um sistema de produção de célula.

Comparando os gráficos das cinéticas de crescimento de biomassa em erlenmeyer nos testes preliminares (Fig.4.2) e após otimização das variáveis (Fig. 4.14), verifica-se que em 36 horas a quantidades de biomassa no último ensaio foi 21% maior, justificando o estudo da avaliação conjunta das variáveis através de um planejamento experimental.

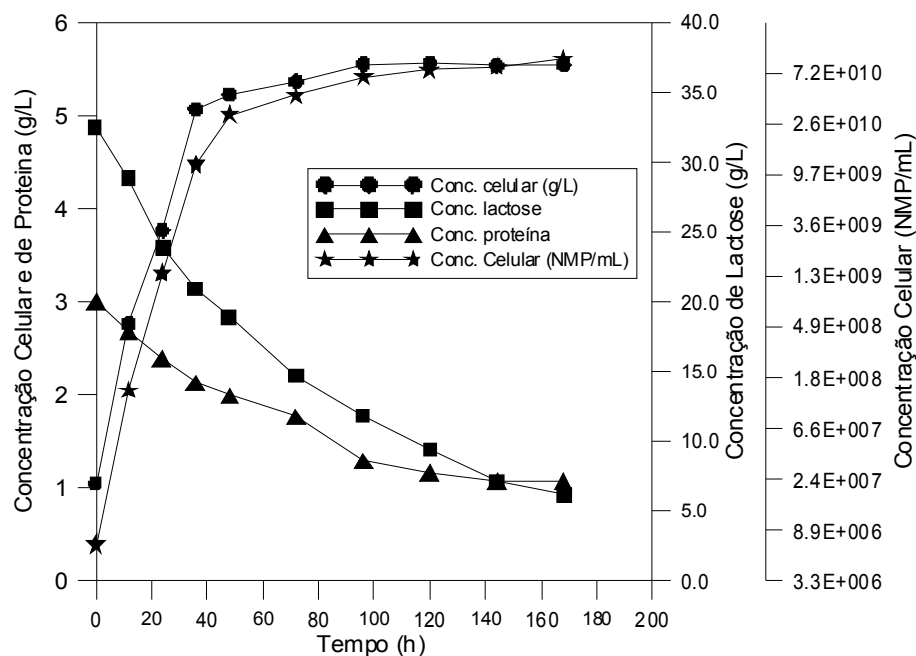


Figura 4.14 - Perfil da concentração celular, concentração de proteína e concentração de lactose utilizando reator do tipo frasco erlenmeyer empregando como meio soro em pó diluído

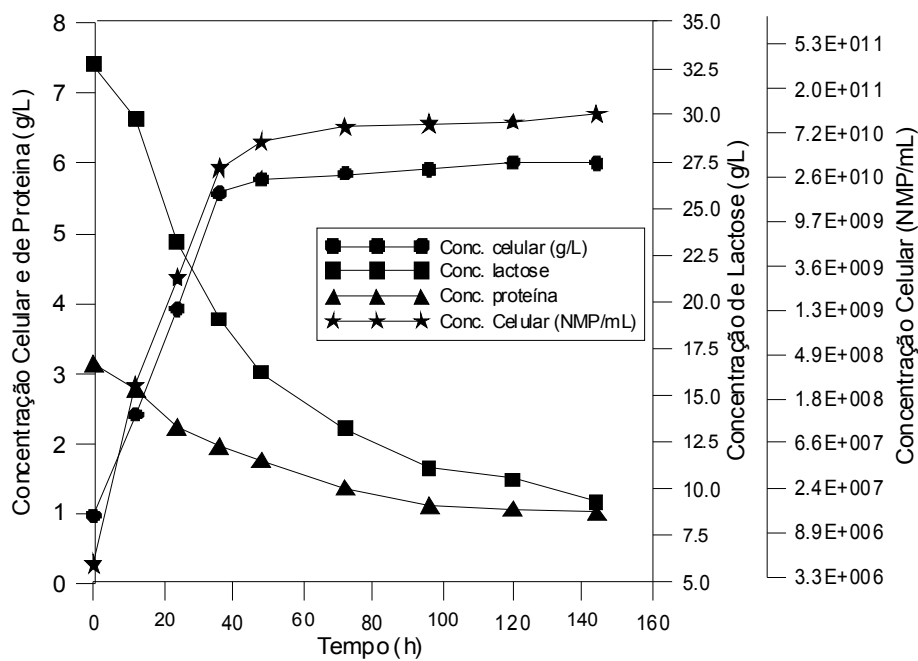


Figura 4.15 - Perfil da concentração celular, concentração de proteína e concentração de lactose utilizando fermentador tanque agitado como meio soro em pó diluído

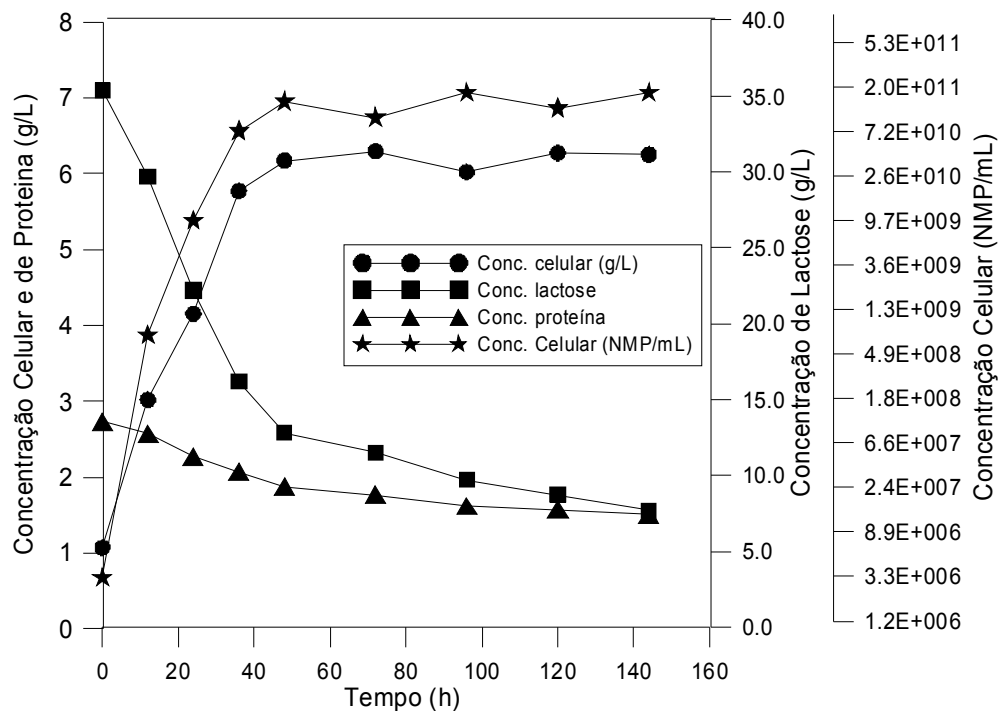


Figura 4.16 - Perfil da concentração celular, concentração de proteína e concentração de lactose utilizando fermentador tanque agitado como meio soro *in natura*.

As Figuras 4.17, 4.18 e 4.19 mostram os parâmetros cinéticos obtidos para fermentação em erlenmeyer e em reator tanque agitado com soro em pó e soro *in natura*, para os modelos de Monod, Contois e logístico de Verlhurst-Pearl (BAILEY, OLLIS, 1986) ajustados aos pontos experimentais mostrados nas Figuras 4.14, 4.15 e 4.16. Este ajuste dos pontos experimentais aos modelos foi obtido através de um programa implementado no *software Scilab 5.0.1* que realiza os ajustes simultaneamente a integração numérica das equações diferenciais representativas do modelo cinético estudado. Na integração foi utilizado a rotina padrão do *Scilab* que trabalha como passo variável e os método de Ruge-Kutta e Backward, como critério de escolha dos parâmetros que representam o melhor ajuste foi utilizada a menor soma dos quadrados da diferença entre os valores experimentais e os valores previstos pelo modelo e como critério de otimização foi escolhido o método de Mote Carlo com 100.000 buscas.

A proximidade dos parâmetros encontrados quando se compara os resultados dos reatores e erlenmeyer mostram a boa reprodutibilidade nas diferentes dimensões. Os valores dos maiores coeficientes de determinação, menor somas dos quadrados dos desvios e intervalo de confiança dos parâmetros mostram que o modelo de Verlhurst foi o mais

adequado na descrição dos resultados experimentais, sendo que o consumo de proteína não foi significativo no crescimento celular e quando foi considerado o gasto de substrato associado a manutenção o presente modelo passa a representar os resultados de forma mais precisa ainda.

As Tabelas 4.6, 4.7 e 4.8 mostram os ajustes dos diferentes pontos experimentais aos modelos citados nas melhores condições para cada modelo. Pelas figuras e tabelas, é possível observar que o modelo de Verlhust com manutenção é o melhor modelo para descrição desta fermentação para as três condições distintas de fermentação.

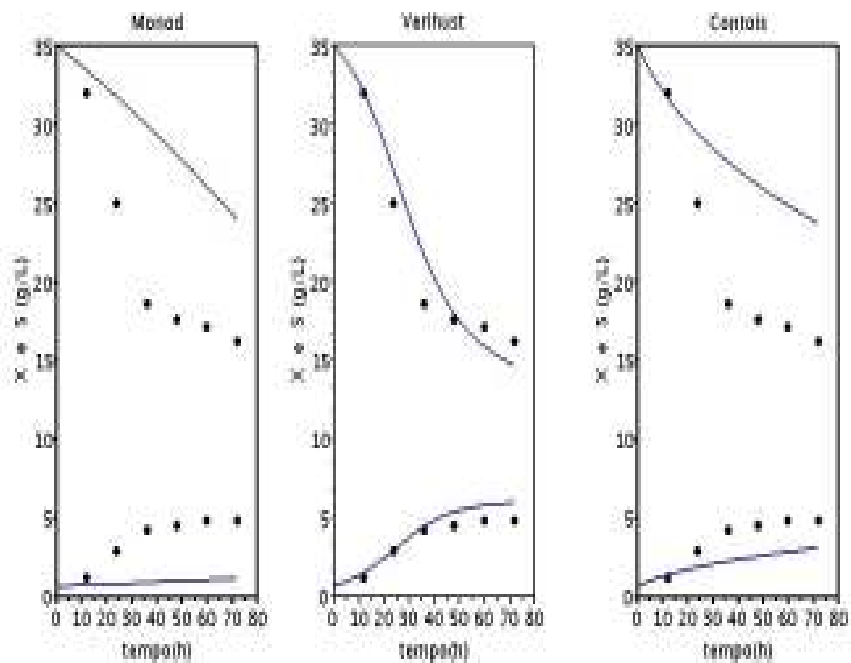


Figura 4.17-Ajuste dos diferentes modelos para reatores tipo erlenmeyer de 250 mL.

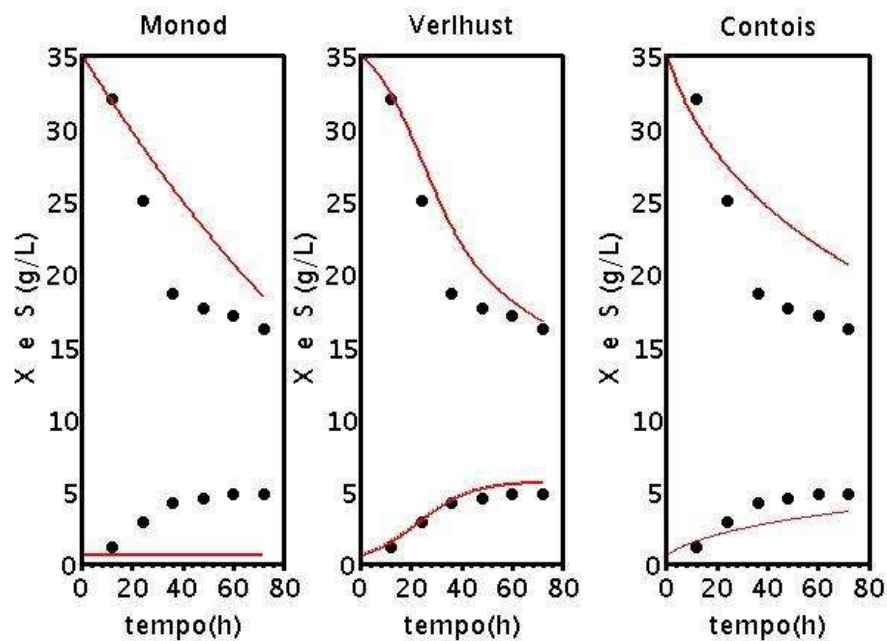


Figura 4.18-Ajuste dos diferentes modelos no reator de 1800 mL com soro em pó.

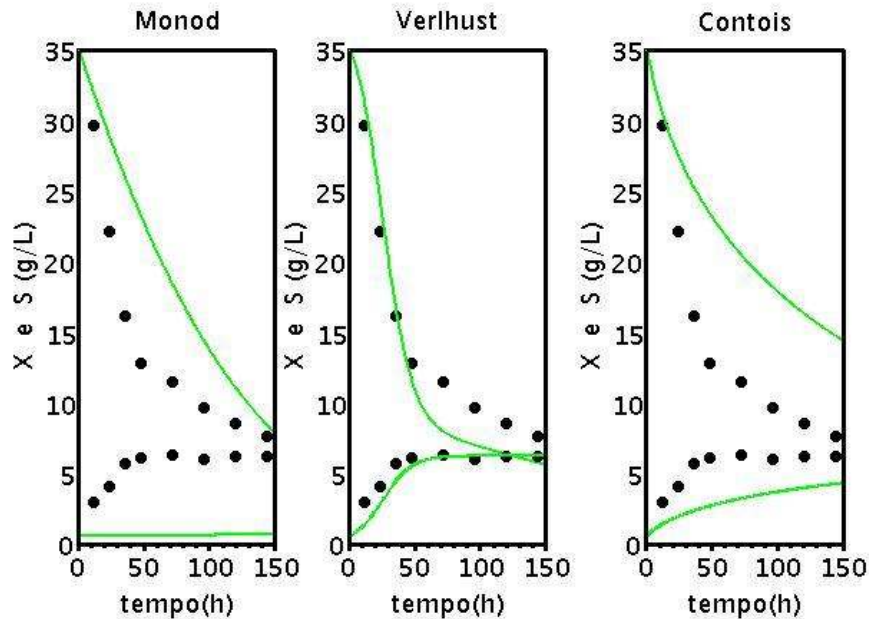


Figura 4.19-Ajuste dos diferentes modelos no reator de 1800 mL com soro *in natura*.

Tabela 4.6: Ajustes dos modelos aos resultados de crescimento celular-reactor de 250mL

Capítulo 4 - Resultados e Discussões

Modelo	Condições na busca do ajuste	Ajuste encontrado (intervalo de conf. 95%)	SQR	r ²
Monod $\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_M L}{L + K_S} \cdot X$ $\frac{dS}{dt} = \frac{-1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{dX}{dt}$	0,01 < K_S < 100 0,01 < μ_M < 4 0,001 < Y_{X/L} < 1	K_S = 68,76 ± 12,73 g/L μ_M = 0,0281 ± 0,0154 h⁻¹ Y_{X/L} = 0,0456 ± 0,030 g/g	57,910	0,9156
Monod com manutenção $\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_M L}{L + K_S} \cdot X$ $\frac{dS}{dt} = \frac{-1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{dX}{dt} - m \cdot X$	0,01 < K_S < 100 0,01 < μ_M < 4 0,001 < Y_{X/L} < 1 1.10⁻⁷ < m < 1.10⁻²	K_S = 79,46 ± 8,749 g/L μ_M = 0,0160 ± 0,0286 h⁻¹ Y_{X/L} = 0,0276 ± 0,055 g/g m = 0,00092 ± 0,0015 h⁻¹	272,275	0,8670
Verlhust $\frac{dX}{dt} = \mu_M \cdot X \left(1 - \frac{X}{X_M} \right)$ $\frac{dS}{dt} = \frac{-1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{dX}{dt}$	0,001 < K_S < 7 0,001 < μ_M < 7 0,001 < Y_{X/L} < 1	K_S = 79,46 ± 8,749 g/L μ_M = 0,0160 ± 0,0286 h⁻¹ Y_{X/L} = 0,0276 ± 0,055 g/g	35,549	0,9687
Verlhust com manutenção $\frac{dX}{dt} = \mu_M \cdot X \left(1 - \frac{X}{X_M} \right)$ $\frac{dS}{dt} = \frac{-1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{dX}{dt} - m \cdot X$	0,001 < K_S < 7 0,001 < μ_M < 7 0,001 < Y_{X/L} < 1 1.10⁻⁷ < m < 1.10⁻²	X_M = 5,990 ± 0,2963 g/L μ_M = 0,0887 ± 0,008 h⁻¹ Y_{X/L} = 0,301 ± 0,026 g/g m = 0,0098 ± 0,00261 h⁻¹	2,421	0,9972
Contois $\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_M \cdot L}{L + B \cdot X} \cdot X$ $\frac{dS}{dt} = \frac{-1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{dX}{dt}$	0,001 < K_S < 7 0,001 < μ_M < 7 0,001 < Y_{X/L} < 1	μ_M = 0,1226 ± 0,076 h⁻¹ B = 46,0539 ± 27,2449 Y_{X/L} = 0,196 ± 0,048 g/g	31,654	0,9753

Tabela 4.6: Ajustes dos modelos aos resultados de crescimento celular-reator de 250mL (continuação)

Contois com manutenção $\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_M \cdot S}{S + B \cdot X} \cdot X$ $\frac{dS}{dt} = \frac{-1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{dX}{dt} - m \cdot X$	$0,001 < K_S < 7$ $0,001 < \mu_M < 7$ $0,001 < Y_{X/L} < 1$ $1.10^{-7} < m < 1.10^{-2}$	$\mu_M = 0,15531 \pm 0,0572 \text{ h}^{-1}$ $B = 55,3178 \pm 14,0415$ $Y_{X/L} = 0,2147 \pm 0,030 \text{ g/g}$ $m = 0,00010 \pm 0,00012 \text{ h}^{-1}$	29,146	0,9765
--	---	---	--------	--------

Tabela 4.7: Ajustes dos modelos aos resultados de crescimento celular-reator de 1800mL

Modelo	Condições na busca do ajuste	Ajuste encontrado (intervalo de conf. 95%)	SQR	r ²
Monod $\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_M L}{L + K_S} \cdot X$ $\frac{dS}{dt} = \frac{-1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{dX}{dt}$	$0,01 < K_S < 100$ $0,01 < \mu_M < 4$ $0,001 < Y_{X/L} < 1$	$K_S = 79,0450 \pm 8,306 \text{ g/L}$ $\mu_M = 0,0020 \pm 0,00128 \text{ h}^{-1}$ $Y_{X/L} = 0,0016 \pm 0,00102 \text{ g/g}$	203,523	0,8640
Monod com manutenção $\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_M S}{S + K_S} \cdot X$ $\frac{dS}{dt} = \frac{-1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{dX}{dt} - m \cdot X$	$0,01 < K_S < 100$ $0,01 < \mu_M < 4$ $0,001 < Y_{X/L} < 1$ $1.10^{-7} < m < 1.10^{-2}$	$K_S = 72,3587 \pm 8,395 \text{ g/L}$ $\mu_M = 0,0016 \pm 0,0003 \text{ h}^{-1}$ $Y_{X/L} = 0,0015 \pm 0,0002 \text{ g/g}$ $m = 0,0001 \pm 0,00018 \text{ h}^{-1}$	204,436	0,8655
Verlhust $\frac{dX}{dt} = \mu_M \cdot X \left(1 - \frac{X}{X_M} \right)$ $\frac{dS}{dt} = \frac{-1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{dX}{dt}$	$0,001 < K_S < 7$ $0,001 < \mu_M < 7$ $0,001 < Y_{X/L} < 1$	$X_M = 6,2399 \pm 0,17173 \text{ g/L}$ $\mu_M = 0,0705 \pm 0,0019 \text{ h}^{-1}$ $Y_{X/L} = 0,242 \pm 0,0066 \text{ g/g}$	10,245	0,9888
Verlhust com manutenção $\frac{dX}{dt} = \mu_M \cdot X \left(1 - \frac{X}{X_M} \right)$ $\frac{dS}{dt} = \frac{-1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{dX}{dt} - m \cdot X$	$0,001 < K_S < 7$ $0,001 < \mu_M < 7$ $0,001 < Y_{X/L} < 1$ $1.10^{-7} < m < 1.10^{-2}$	$X_M = 5,64792 \pm 0,3988 \text{ g/L}$ $\mu_M = 0,09468 \pm 0,0075 \text{ h}^{-1}$ $Y_{X/L} = 0,3638 \pm 0,0432 \text{ g/g}$ $m = 0,0168 \pm 0,001529 \text{ h}^{-1}$	4,275	0,9958

Tabela 4.7: Ajustes dos modelos aos resultados de crescimento celular-reator de 1800mL (continuação)

Contois $\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_M \cdot S}{S + B \cdot X} \cdot X$ $\frac{dS}{dt} = \frac{-1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{dX}{dt}$	0,001<K_S< 7 0,001<μ_M<7 0,001<Y_{X/L}<1	μ_M=0,1880 ±0,041167 h⁻¹ B=62,915331 ±15,190817 Y_{X/L}= 0,21886 ±0,04270 g/g	62,814	0,9455
Contois com manutenção $\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_M \cdot S}{S + B \cdot X} \cdot X$ $\frac{dS}{dt} = \frac{-1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{dX}{dt} - m \cdot X$	0,001<K_S< 7 0,001<μ_M<7 0,001<Y_{X/L}<1 1.10⁻⁷<m<1.10⁻²	μ_M= 0,179197 ±0,074480 h⁻¹ B=61,702230 ±29,345200 Y_{X/L}=0,217729 ±0,03305 g/g m=0,000301 ±0,000424 h⁻¹	65,174	0,9447

Tabela 4.8: Ajustes dos modelos aos resultados de crescimento celular-reator de 1800mL com soro *in natura*

Modelo	Condições na busca do ajuste	Ajuste encontrado (intervalo de conf. 95%)	SQR	r ²
Monod $\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_M S}{S + K_S} \cdot X$ $\frac{dS}{dt} = \frac{-1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{dX}{dt}$	0,01<K_S<100 0,01<μ_M<4 0,001<Y_{X/L}<1	K_S= 81,6169±13,811g/L μ_M=0,0042 ±0,00431 h⁻¹ Y_{X/L}=0,00272±0,0028g/g	262,737	0,8190
Monod com manutenção $\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_M S}{S + K_S} \cdot X$ $\frac{dS}{dt} = \frac{-1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{dX}{dt} - m \cdot X$	0,01<K_S<100 0,01<μ_M<4 0,001<Y_{X/L}<1 1.10⁻⁷<m<1.10⁻²	K_S=69,99 ±10,817g/L μ_M=0,00450 ±0,0048 h⁻¹ Y_{X/L}=0,0031 ±0,0033g/g m=0,0004 ±0,000674 h⁻¹	269,683	0,8079

Tabela 4.8: Ajustes dos modelos aos resultados de crescimento celular-reator de 1800mL com soro *in natura* (continuação)

Verlhust $\frac{dX}{dt} = \mu_M \cdot X \left(1 - \frac{X}{X_M} \right)$ $\frac{dS}{dt} = \frac{-1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{dX}{dt}$	$0,001 < K_S < 7$ $0,001 < \mu_M < 7$ $0,001 < Y_{X/L} < 1$	$X_M = 6,2363 \pm 0,1582 \text{ g/L}$ $\mu_M = 0,0823 \pm 0,0011 \text{ h}^{-1}$ $Y_{X/L} = 0,242 \pm 0,006 \text{ g/g}$	9,276	0,9886
Verlhust com manutenção $\frac{dX}{dt} = \mu_M \cdot X \left(1 - \frac{X}{X_M} \right)$ $\frac{dS}{dt} = \frac{-1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{dX}{dt} - m \cdot X$	$0,001 < K_S < 7$ $0,001 < \mu_M < 7$ $0,001 < Y_{X/L} < 1$ $1.10^{-7} < m < 1.10^{-2}$	$X_M = 6,2569 \pm 0,336 \text{ g/L}$ $\mu_M = 0,0902 \pm 0,007 \text{ h}^{-1}$ $Y_{X/L} = 0,21515 \pm 0,0220 \text{ g/g}$ $m = 0,00398 \pm 0,00337 \text{ h}^{-1}$	3,4561	0,9956
Contois $\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_M \cdot S}{S + B \cdot X} \cdot X$ $\frac{dS}{dt} = \frac{-1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{dX}{dt}$	$0,001 < K_S < 7$ $0,001 < \mu_M < 7$ $0,001 < Y_{X/L} < 1$	$\mu_M = 0,28495 \pm 0,1200 \text{ h}^{-1}$ $B = 69,0291 \pm 15,5333$ $Y_{X/L} = 0,2109 \pm 0,0538 \text{ g/g}$ $\square$	99,490	0,9037
Contois com manutenção $\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_M \cdot S}{S + B \cdot X} \cdot X$ $\frac{dS}{dt} = \frac{-1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{dX}{dt} - m \cdot X$	$0,001 < K_S < 7$ $0,001 < \mu_M < 7$ $0,001 < Y_{X/L} < 1$ $1.10^{-7} < m < 1.10^{-2}$	$\mu_M = 0,19879 \pm 0,0496 \text{ h}^{-1}$ $B = 59,31378 \pm 22,651555$ $Y_{X/L} = 0,181344 \pm 0,042 \text{ g/g}$ $m = 0,00005 \pm 0,00005 \text{ h}^{-1}$	105,53342	0,9086469

4.7 - IMOBILIZAÇÃO CELULAR

4.7.1 - O processo de imobilização

A imobilização celular foi realizada pelo processo de encapsulação em alginato pela dispersão de gotículas contendo células dissolvidas em alginato de sódio em uma solução de cloreto de cálcio, gerando partículas esféricas de alginato de cálcio com células retidas em seu interior como pode ser visto na Figura 4.20. As células imobilizadas apresentaram um tamanho variável entre 2,0 e 2,5 mm, determinado pela técnica de processamento de imagem.



Figura 4.20 - Esferas de alginato de cálcio úmidas com células imobilizadas

Foi observado que há uma grande redução de volume durante a secagem destas partículas e que esta operação é fundamental para a qualidade final do produto, uma vez que umidade na célula imobilizada pode promover a formação de fungos na superfície das mesmas e conseqüentemente a perda das células imobilizadas.

Nos testes realizados com as quantidades de solução de alginato a 1%, iguais a 10 mL, 20 mL, 30 mL, 40 mL e 50 mL, obteve-se como resposta em NMP/g de produto sólido em torno de $3,37 \pm 1,2 \times 10^{11}$. Assim, pode-se constatar que a quantidade de alginato não interferiu na quantidade de células viáveis.

No processo de imobilização obteve um resultado satisfatório, uma vez que o material apresenta alta concentração celular. DEMBCZYNSKI et al (2002) por exemplo, obtiveram uma concentração máxima de $1,93.10^{11}$ células/g para *Lactobacillus rhamnosus* na situação mais favorável de seus estudos. Outro fato observado é que após três meses de armazenamento do produto seco o mesmo ainda se encontra livre da ação de fungos e com células viáveis na mesma ordem de grandeza (10^{11} NMP/g de sólido).

4.7.2- Avaliação da estabilidade das células imobilizadas pela resistência a acidez

A taxa de sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus thermophilus* foi estudada simulando condições gástricas em banho termostático a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ utilizando uma solução de ácido clorídrico com pH de $2,5 \pm 0,1$. As amostras foram retiradas em 30, 60 e 90 minutos, e em seguida foram realizadas contagens para se avaliar a sobrevivência das espécies, como mostra a Figura 4.21.

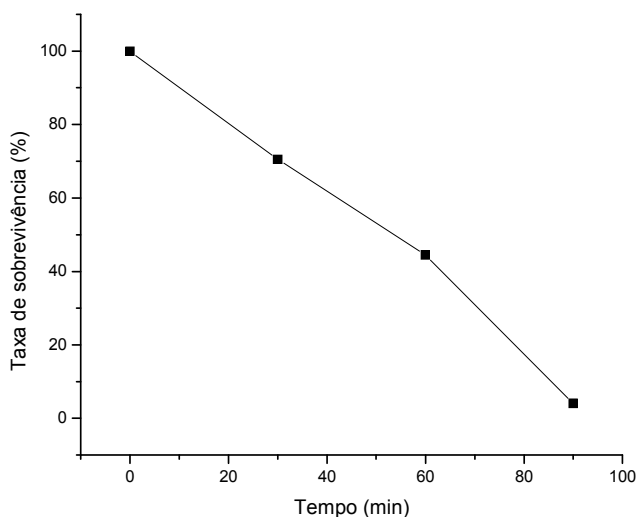


Figura 4.21 - Taxa de sobrevivência das células encapsuladas para diferentes tempos em condições ácidas pH=2,5 a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$

O ajuste destes dados ao modelo de primeira ordem mostra que a morte celular ocorre com uma redução decimal a cada 62,5 minutos ($D = 62,5$ min com $r = -0,947$) o que representa uma ordem de grandeza esperado. HEIDEBACH et al (2009) , obteve valores de taxas de sobrevivência de 100% para 30 minutos, 40% para 60 minutos e 15% para 90 min,

sob as mesmas condições para as espécies de *Lactobacillus paracasei* e *Bifidobacterium lactis* o que corresponde a um valor D de 72,15 minutos.

O valor D obtido neste experimento comparado com o valor encontrado na literatura é satisfatório para garantir a sobrevivência celular desejada até o momento que as bactérias atinjam o intestino. Para cães, por exemplo, o tempo de esvaziamento gástrico varia entre 45 minutos e 6 horas. Assim para o valor D de 62,5 minutos após 6 horas (caso extremo) tem-se teoricamente que sobrevivem $5,86.10^5$ células/g para uma concentração inicial de $3,37.10^{11}$ células/g, garantindo o bom desempenho do produto desenvolvido neste estudo.

4.7.3 Estudo da desativação térmica em condição otimizada

Os resultados dos ensaios de desativação térmica a 40°C, 60°C e 70°C são mostrados na Figura 4.22. O ajuste destes pontos ao modelo de desativação térmica de primeira ordem e pela equação de Arrhenius forneceu uma energia de ativação da reação de morte celular de 73,76 kJ/mol o que mostra que as células probióticas mesmo sem a proteção adicional proporcionada pela ração apresenta uma resistência satisfatória a desativação térmica e valores de energia de desativação próximo ao esperado para produtos desta natureza. Observa-se nesta figura que quanto maior a temperatura mais rápida é a redução no número de células viáveis

A equação abaixo mostra o resultado completo do ajuste. A título comparativo, COUTINHO FILHO *et al* (2007) encontraram para uma preparação sólida em pó de uso comercial um valor de energia de ativação de morte celular de 89,15 kJ/mol. Este valor encontra-se na mesma ordem de grandeza do resultado obtido neste trabalho.

$$\ln(N/N_0) = -2.25.10^9 \cdot \exp(-8568,92/T) \times t \quad 4.5$$

sendo T a temperatura absoluta (K), t o tempo, N_0 e N a concentração celular inicial e no tempo t respectivamente.

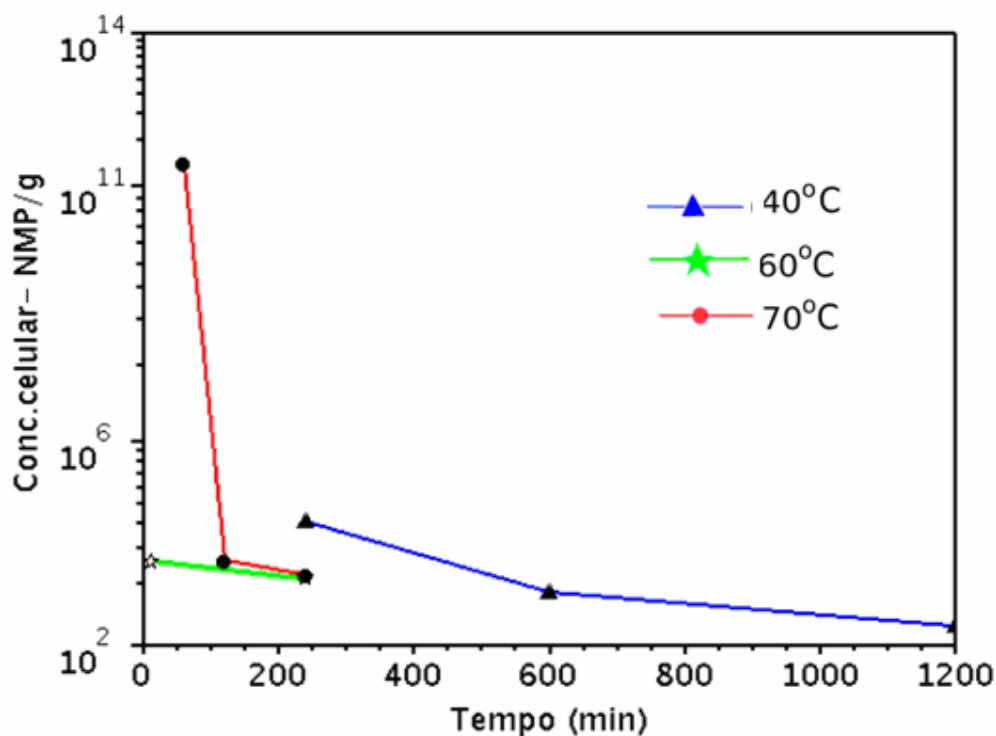


Figura 4.22 - Ensaio de desativação térmica, que mostra a redução do número de células viáveis em função do tempo para as temperaturas de 40, 60 e 70° C

4.8 – FORMULAÇÃO DA RAÇÃO

A Figura 4.23 mostra a aparência das rações geradas por peletização pela combinação de proporções diferentes de água, farinha de carne e amido de forma que as mesmas tivessem propriedades mecânicas, umidade final e tempo de secagem adequados para viabilizar a adição de probióticos.

As Figuras 4.24 e 4.25 mostram o comportamento destas rações no que se refere a perda de água e umidade ao longo do tempo após secagem das mesmas em estufa a 50°C. Nestas figuras a Ração 1 representa o produto gerado pela combinação dos ingredientes: água, farinha de carne, óleo, amido e cloreto de cálcio e a Ração 2, além dos mesmos ingredientes já citados, possui farelo de torta de soja gerada pela extração de óleo de soja.



Figura 4.23 - Ração fabricada

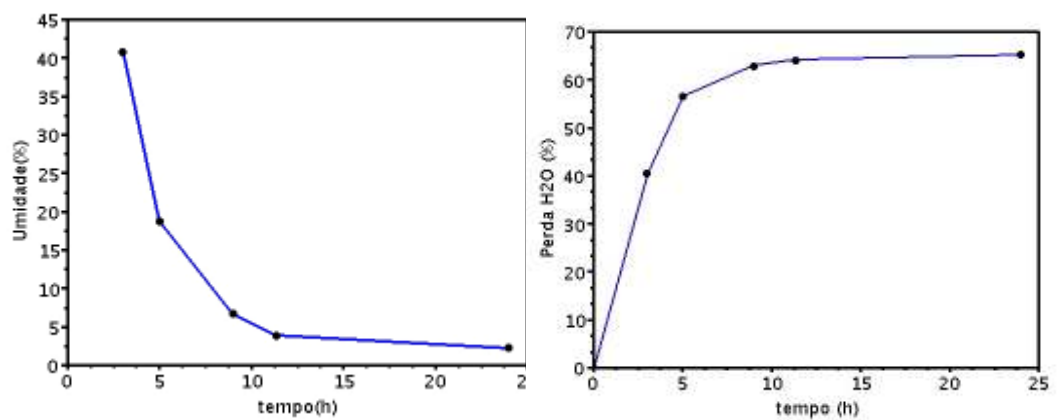


Figura 4.24- Curva de umidade e perda de água em função do tempo para a Ração 1.

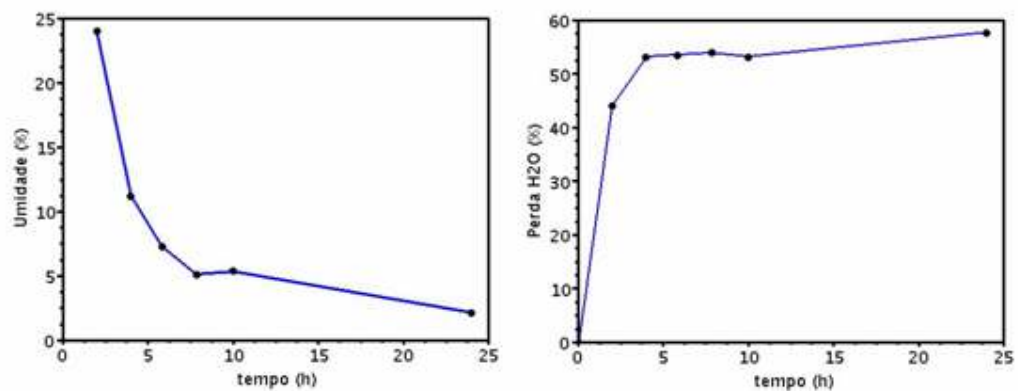


Figura 4.25 - Curva de umidade e perda de água em função do tempo para a Ração 2.

Pela Figura 4.24 e 4.25 pode-se observar que para a umidade de 12%, que é a máxima permitida neste tipo de ração, conforme descrita no capítulo 2, é necessário um tempo de secagem de aproximadamente 7 e 4 horas e que corresponde a perda de água de aproximadamente 60 e 50 %, para as rações 1 e 2, respectivamente.

Para este tempo de secagem a morte celular prevista a 50°C, obtida pelo ajuste dos pontos ao modelo cinético de primeira ordem com o uso da Lei de Arrhenius, fornece $1,9.10^{10}$ células/g pelo uso da Equação 4.5, já experimentalmente obteve-se $8,2.10^{10}$ células/g. Assim, o uso das células viáveis é consistente no que se refere ao fato do mesmo garantir a sobrevivência das células às condições de preparo da ração por peletização.

A Tabela 4.9 apresenta a composição final da ração. Observa-se que para as duas rações é possível melhorar as condições de secagem, pois a umidade ultrapassou de 12% que é a máxima permitida e pelo fato do tempo de secagem obtido ser maior que os tempos normalmente utilizados em processos industriais. O fato da Ração 1 ter uma maior percentagem de proteínas brutas se deve ao fato de possuir uma maior quantidade de farinha de carne do que a Ração 2. Já o extrato não nitrogenado foi maior na Ração 2, pois esta tinha uma maior quantidade de amido.

Estes resultados mostram que embora os experimentos não tenham sido realizados em condições otimizadas de secagem a combinação dos ingredientes em quantidades próximas às utilizadas nesta dissertação foi capaz de gerar formulações que atendem às especificações de composição descrita na legislação para cães, conforme apresentado no Capítulo 2. As análises foram feitas na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

Tabela 4.9 - Resultados das análises das Rações.

Parâmetros	Ração 1	Ração 2
Umidade (105°) (%)	13,05	16,84
Matéria Seca (%)	86,95	83,16
Proteína Bruta (%)	24,30	15,00
Extrato Etéreo (%)	11,32	5,50
Fibra Bruta (%)	6,55	4,50
Matéria Mineral (%)	8,00	8,05
Extrato Não Nitrogenado (%)	36,78	50,11
Nutrientes Digestíveis Totais (NDT)	81,30	73,24

Os *Lactobacillus acidophilus* mostraram promissores quando utilizados em ração, embora seja necessário estudos adicionais. A aplicação desta ração deve ser de forma diferenciada das tradicionais no que se refere ao tempo de vida útil do produto, pois estudos como o de CORCORAN e colaboradores (2006), com células livres, mostram que as células de *Lactobacillus* em preparações sólidas, mesmo geneticamente modificadas, para adquirirem maior resistência e maior vida útil, apresentam uma redução de até 63,4% das células em oito semanas de armazenamento.

Embora as condições de trabalho de CORCORAN et al (2006) possa a primeira vista sugerir que as células de *lactobacillus* livres não sejam adequadas, pela baixa resistência, este fato não representa a realidade, pois o uso desta cultura na forma imobilizada é bastante difundido para esta aplicação, pois células imobilizadas são mais estáveis que as preparações na forma livre.

CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES

Do presente trabalho podem ser tiradas as seguintes conclusões:

- A utilização de soro de queijo para produção de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus thermophilus*, mostrou-se bastante promissora.

- Os testes preliminares mostraram que o melhor tempo de fermentação, utilizando reator tipo erlenmeyer, foi de 36 h enquanto que para reatores tipo frascos de penicilina foi de 48 h.

- As regiões otimizadas aplicando a técnica de superfície de resposta mostraram que para fermentações em erlenmeyer a concentração de lactose variou de 27 a 35 g/L, inóculo de 0,8 a 1,2 g/L e pH 6,0 a 7,0. Nestas condições a concentração de células viáveis foi da ordem de 10^{10} NMP/mL.

- As regiões otimizadas aplicando a técnica de superfície de resposta, utilizando os frascos de penicilina, variou de 30 a 38 g/L para a concentração de lactose, de 1,0 a 1,4 g/L para o inóculo e o pH de 6,0 a 7,0. Nestas condições a concentração de células viáveis foi da ordem de 10^9 NMP/mL.

- Nos teste de reprodutibilidade em reatores tipos erlenmeyer, utilizando concentrações de lactose de 30,85 g/L (ponto otimizado na programa Maple), 26 g/L (menor concentração de lactose obtida na região de Otimização) e 33 g/L (concentração média de lactose no soro “*in natura*”) mostraram que a concentração de micro-organismo foi da ordem de 10^{10} NMP/mL.

- Nos testes de reprodutibilidade em reatores tipos frascos de penicilinas, utilizando concentrações de lactose de 35,92 g/L (ponto otimizado na programa Maple), 30 g/L (menor concentração de lactose obtida na região de Otimização) e 33 g/L (concentração média de lactose no soro “*in natura*”) mostraram que a concentração de micro-organismo foi da ordem de 10^9 NMP/mL.

- O reator tipo erlenmeyer apresentou resultados mais satisfatórios quando comparado com o tipo frasco de penicilina. Isso pode ser observado tanto pelos coeficientes de determinação das equações do PCC, quanto no tempo de fermentação.

- A ampliação de escala não comprometeu o crescimento celular e o reator do tipo tanque agitado pode ser utilizado com eficiência no processo de produção de célula para produtos probióticos.

Capítulo 5 – Conclusões

- A etapa de secagem é de extrema importância na qualidade das células imobilizadas uma vez que há grande facilidade de crescimento de fungos que contaminam o produto.

- O processo de imobilização proposto mostrou-se eficiente na retenção de células para geração de probióticos, pois foram capazes de resistir as condições ácidas no trânsito gastro-intestinal.

- O preparo dos ingredientes na proporção proposta neste trabalho foi satisfatória para garantir a dieta para cães, apresentando uma composição que esta de acordo com a legislação para o uso como ração.

- As células imobilizadas têm resistência adequada para garantir a sobrevivência das mesmas ao processo de produção de rações que contenham células probióticas.

CAPÍTULO 6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Utilização de outras culturas para a produção de probióticos;
- Avaliar o melhor aproveitamento do soro, pois ainda restarem nutrientes no fim da fermentação;
- Testar novas formulações para a ração, acrescentando aditivos;
- Estudar a vida útil da ração em temperaturas ambientes a longo prazo.

ANEXOS

ANEXO A

MÉTODOS ANALÍTICOS

Este anexo consiste em descrever a metodologia das análises realizadas neste trabalho. Nos procedimentos realizados, a análise de lactose realizada neste trabalho foi seguindo o Método DNS (MILLER, 1959) e a análise de proteína seguiu o procedimento desenvolvido por LOWRY (1951) .

ANEXO A1

DETERMINAÇÃO DE AÇUCARES REDUTOR - MÉTODO DE DNS

O método de DNS baseia-se na redução do ácido 3,5 dinitrosalicílico a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, ao mesmo tempo em que o grupo aldeído do açúcar é oxidado a grupo carboxílico, com o desenvolvimento de coloração avermelhada, lida espectrofotometricamente em 540 nm.

O método de DNS para a determinação dos açúcares redutores, como proposto por MILLER, 1959, é composto dos seguintes reagentes:

- NaOH 2 N: 80 g/L
- DNS: dissolver à temperatura ambiente , 1g de DNS em 20 mL de NaOH 2 N e 50 mL de água. Adicionar 30 g de sal de Rochelle (tartarato duplo de sódio e potássio- $C_4 H_4 K NaO_6 \cdot 4 H_2O$) e completar o volume a 100 mL com água destilada.

Proteger de CO_2 .

Procedimento:

A 1 mL da solução de AR, adequadamente diluída, adicionar 2 mL de solução de DNS. O tubo (follin-Wu) , com rolha adequadamente fendada, contendo esta mistura é aquecida por cinco minutos em água em ebulição e a seguir resfriado com água corrente.

Completar o volume do tubo de follin – Wu a 25 mL com água destilada, fechar com rolha de borracha para homogeneizar e determinar a transmitância espectrofotometricamente. É necessário calibrar o espectrofotômetro com o teste em branco.

A leitura é feita a 540 nm e a faixa de concentração de AR deve ser de 0,1 a 1,00 g/L.

Curva Padrão

Para se determinar a curva padrão, como mostra a Figura A1, preparar uma solução de glicose com concentração conhecida, e em 10 balões volumétricos preparar as diluições com concentrações de AR de 0,10 a 1,00 g/L. Proceder como acima, e fazer leitura espectrofotométrica.

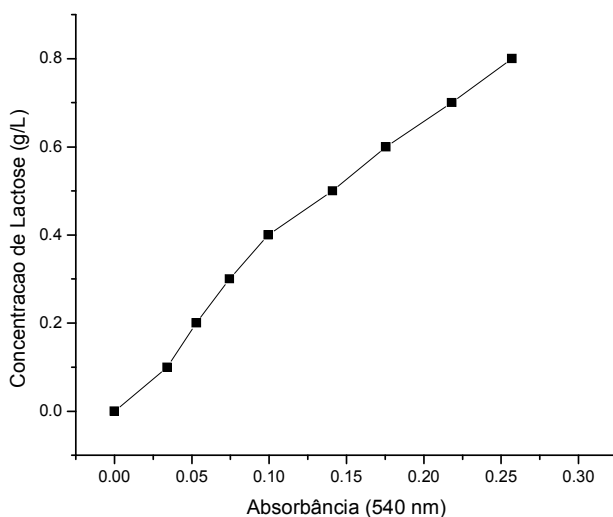


Figura A1 - Curva de calibração Lactose

A correlação entre o índice de refração e a concentração de lactose, foi obtida por regressão linear, com a equação abaixo:

$$\text{Concentração de Lactose} = 3,324 \text{ Abs} + 0,0227 \quad (\text{A.1})$$

Com coeficiente de correlação $R^2=0,986$.

ANEXO A2

DOSAGEM DE PROTEÍNAS - MÉTODO DE LOWRY

Reagentes:

- REATIVO A: 2 g de Na_2CO_3 seco + 0,02 g de tartarato duplo de sódio e potássio em 100 mL de NaOH 0,1N
- REATIVO B: 0,5 g de CuSO_4 + 2 gotas de H_2SO_4 concentrado em 100 mL de água destilada
- SOLUÇÃO AB: 50 mL A + 1 mL B. Preparava-se imediatamente antes da dosagem.
- REATIVO DE FOLIN: solução 1N conservava-se ao abrigo da luz.
- SOLUÇÃO - PADRÃO DE SORO ALBUMINA BOVINA (BSA): 100 mg/L (100 mg BSA em 1.000 mL de água destilada, adicionava-se cuidadosamente água no balão volumétrico para evitar formação de bolhas). Conservava-se sob refrigeração.

Curva Padrão

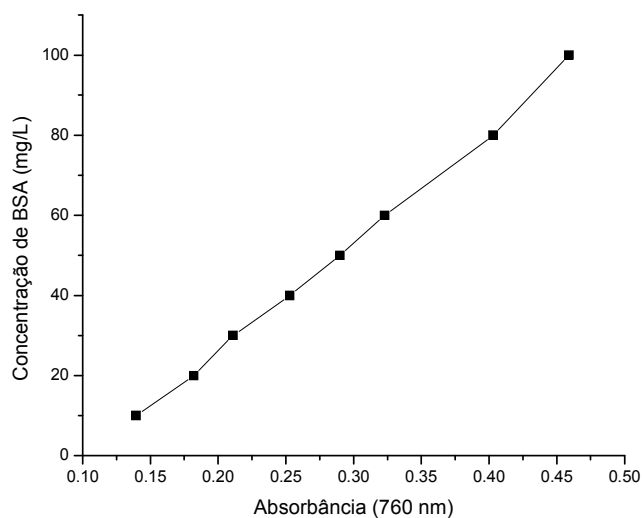
Para a determinação da curva padrão, como mostra a Figura A.2, preparava-se uma série de amostras de 10 a 100 $\mu\text{g/mL}$ de BSA a partir da solução-mãe, conforme mostra a Tabela A.2.

Dosagem:

1. É feita a diluição da amostra para concentrações de possível leitura de absorbância.
2. É adicionado 1 mL de solução de proteína a dosar
3. São adicionados 3 mL de solução AB. Cobria-se com parafilm.
4. Após a agitação, deixar em repouso por 10 minutos (precisos) ao abrigo de luz.
5. Adicionava-se 0,3 mL de reativo de Folin 1N. Cobre-se com parafilm.
6. Deixar 30 minutos ao abrigo de luz.
7. Efetuava-se a medida no espectrofotômetro, após 30 minutos, com comprimento de onda de 760 nm.

Tabela A.2- Diluições a partir da solução mãe

Tabela MÃE BSA (mL)	C _{FINAL} (µg/mL)
0,00	0
0,01	10
0,02	20
0,03	30
0,04	40
0,05	50
0,06	60
0,08	80
0,10	100

**Figura A2 - Curva de calibração com solução de BSA.**

A correlação entre o índice de refração e a concentração de BSA (mg.L^{-1}), foi obtida por regressão linear, na faixa de concentração de lactose de $0,0 \text{ mg.L}^{-1}$ a 100 mg/L obtendo-se a equação abaixo:

$$\text{Concentração de BSA} = 277,78 \text{ Abs} - 29,73 \quad (\text{A.2})$$

Com coeficiente de correlação $R^2 = 0,9979$.

ANEXO A3

COMPOSIÇÃO DAS RAÇÕES

Neste anexo são mostrados os laudos fornecidos pelo Laboratório de nutrição animal, da Faculdade de Medicina Veterinária, com as análises químicas, biológicas e físicas das duas rações fabricadas no trabalho.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
LABORATÓRIO DE NUTRIÇÃO ANIMAL
Rua ,Ceará, s/n BI 2 D , 36 Bairro Umarama , Fone 34 – 3218 – 2534 –ramal 31

CONTROLE DE QUALIDADE DE MATERIA PRIMAS

Nº AMOSTRA: 9621/09

MATERIAL: Amostra de ração

ANÁLISE: **Como oferecido**

FORNECEDOR: Ubiraja Coutinho Filho

SOLICITANTE: Ubiraja Coutinho Filho

DATA DE ENTRADA: 11/11/09

DATA LIBERAÇÃO: 13/11/09

PROCEDÊNCIA: UBERLÂNDIA - MG

ANÁLISE QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E FÍSICAS

ANALISES	UNID.	RESULTADOS
Umidade (105°)	%	13,05
Matéria Seca (MS)	%	86,95
Proteína Bruta (PB)	%	24,30
Extrato Etéreo (EE)	%	11,32
Fibra Bruta (FB)	%	6,55
Matéria Mineral (MM)	%	8,00
Extrato Não Nitrogenado (ENN)	%	36,78
Nutrientes Digestíveis Totais (NDT)		81,30

Obs.: O (s) resultado (s) obtido (s) nesta (s) análise(s) apresenta (m) validade restrita e se aplica (m) tão somente a amostra enviada.

Elaboração: Hugnei dos Santos

Responsável Técnico: Evandro de Abreu Fernandes – CRMV – MG 0579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
LABORATÓRIO DE NUTRIÇÃO ANIMAL
Rua ,Ceará, s/n Bl 2 D , 36 Bairro Umuarama , Fone 34 – 3218 – 2534 –ramal 31

CONTROLE DE QUALIDADE DE MATERIA PRIMAS

N° AMOSTRA:9768/09
MATERIAL: Amostra de ração
ANÁLISE: **Como oferecido**
FORNECEDOR: Ubiraja Coutinho Filho
SOLICITANTE: Ubiraja Coutinho Filho
DATA DE ENTRADA: 07/12/09 DATA LIBERAÇÃO: 13/12/09
PROCEDÊNCIA: UBERLÂNDIA - MG

ANÁLISE QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E FÍSICAS

ANALISES	UNID.	RESULTADOS
Umidade (105°)	%	16,84
Matéria Seca (MS)	%	83,16
Proteína Bruta (PB)	%	15,00
Extrato Etéreo (EE)	%	5,50
Fibra Bruta (FB)	%	4,50
Matéria Mineral (MM)	%	8,05
Extrato Não Nitrogenado (ENN)	%	50,11
Nutrientes Digestíveis Totais (NDT)		73,24

Obs.: O (s) resultado (s) obtido (s) nesta (s) análise(s) apresenta (m) validade restrita e se aplica (m) tão somente a amostra enviada.

Elaboração: Hugnei dos Santos
Responsável Técnico: Evandro de Abreu Fernandes – CRMV – MG 0579

ANEXO A5

FICHA TÉCNICA DO SORO DE LEITE

Neste anexo é mostrada a ficha técnica do soro de leite fornecido pela Cargill.

Soro de Leite em Pó Integral

Descrição

Produto obtido pela pulverização do soro resultante do processo da coagulação do leite, que contém, aproximadamente, metade dos sólidos presentes no leite, incluindo proteínas, lactose, sais minerais, vitaminas hidrossolúveis e gordura.

Aplicação

Biscuitos, embutidos, alimentação animal.

Especificações

Umidade (%)	máx. 4,5
p.H. (1:9)	mín. 6,0
Cinzas (%)	máx. 10,0
Bactérias mesófilas (UFC/g)	máx. 30.000
Coliformes fecais (UFC/g)	máx. 10
<i>Salmonella sp</i> (/25g)	ausente
<i>Staphylococcus aureus</i> (/g)	máx. 100

Informações sensoriais

Aspecto	pó levemente amarelado.
Sabor	característico.

Embalagens/peso líquido

Sacos de papel multifoilados revestidos internamente com polietileno com capacidade de 25 e 30 kg.

Validade

12 meses a partir da data de produção, desde que estocado sob condições adequadas.

Condições de armazenamento

Armazenar em local seco e ventilado, ao abrigo do sol e umidade, na embalagem original fechada e protegida do contato direto com o solo.

Transporte

Veículos fechados, livres de materiais e odores estranhos.

Alergênicos

Sim	Não	Alergênicos
	X	Cereais que contêm glúten e seus derivados
	X	Crustáceos e seus derivados
	X	Ovos e seus derivados
	X	Peixes e seus derivados
	X	Amendoim e seus derivados
	X	Soja e seus derivados
X		Leite e seus derivados (incluindo lactose)
	X	Frutos de casca rijas
	X	Alpaca e seus derivados
	X	Mostarda e seus derivados
	X	Gergelim e seus derivados
	X	Dióxido de enxofre.

Informação nutricional

Porção de 100g	
Valor Nutricional	
Valor Energético	380 kcal (1590 kJ)
Carboidratos	73,9 g
Proteínas	12,5 g
Gorduras totais	3,8 g
Gorduras Saturadas	2,3 g
Gorduras Trans	0,1 g
Fibra Alimentar	<0,5 g
Sódio	1205,0 mg

Cargill Agrícola S/A

Fev./2008

As informações contidas neste documento foram compiladas de nossa experiência e de várias publicações técnicas todas como verdadeiras. O único propósito deste documento é ser um guia para o manuseio apropriado do material. É de responsabilidade do usuário determinar a adequação destas informações para o seu uso particular.

Vendas e Informações Técnicas: Telefones: (11) 5099 3709 / 3398 / 3487 Fax: (11) 5099 3933
Av. Marumbi, 8234 São Paulo – SP

www.cargill.com.br

Cargill

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AACHARY, A.; PRAPULLA, S., A. (2009); Value addition to spent osmotic sugar solution (SOS) by enzymatic conversion to fructooligosaccharides (FOS), a low calorie prebiotic Innovative Food Science and Emerging Technologies.v. 10 ,284–288.

AGUILERA, J. M. (1995). Gelation of whey proteins. Food Technology, vol. 49, n. 10, pp. 83-89.

ALFA PET, Associação Nacional dos Fabricantes de Alimentos para Animais de Estimação. Disponível em www.alfapet.org.br. Acesso em 23 de março de 2009.

ALIBRA. Alibra Ingredientes LTDA. Disponível em: www.alibra.com.br. Acesso em: 02 de novembro de 2009.

ANFAL, ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS FABRICANTES DE ALIMENTOS PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO - ANFAL PET. Industry profile Pet Food 2005. Disponível em: www.anfalpet.org.br. Acesso em: fevereiro 2009.

ANTUNES, A.J. 2003; Funcionalidade de Proteínas do Soro de Leite Bovino.São Paulo: Manole Ltda .

ANVISA, Agencia Nacional de vigilância Sanitária. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em 10 de julho de 2009.

AQUARONE, E; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A. 2001. Biotecnologia Industrial. v.4. 1.ed. São Paulo: Edgard Blucher LTDA, , 523 p.

BAILEY, J. E., OLLIS, D. F. (1986). Biochemical engineering fundamentals (2nd ed.). New York: McGraw-Hill.

BAILLON, M.A.; MARSHALL, Z.V.; BUTTERWICK, R.F. (2004). Effects of probióticos *Lactobacillus acidophilus* strain DSM13241 in heathy adults dogs. American Journal of Veterinary Research, v.65, p. 338-343.

Referências Bibliográficas

- BALCÁZAR, J.L; BLAS, I; RUIZ-ZARZUELA, I ;CUNNINGHAM, D.; VENDRELL, D.; MÚZQUIZ, L (2006). The role of probiotics in aquaculture Veterinary Microbiology - artigo a ser publicado, disponível em www.directscience. Acesso em 12/03/09.
- BANYS, V. L.; PAIVA, P. C. A.; OLIVEIRA, A. I. G.; MUNIZ, J. A.; LOZANO, D. M.; 2001. Avaliação de Sucedâneos de Leite para Bezerros, Baseados em Proteína Texturizada de Soja, Adicionados a três Fontes de Lactose e dois Períodos de Adaptação: Período de Aleitamento. Revista Ciência Agrotecnica, v.25, n.4, p.969-979.
- BASKAKOV , I; BOLEN, D W (1998). Time dependent effects of trimethylamine-N-oxide/urea on lactate dehydrogenase activity: an unexplored dimension of adaptation paradigm. Biophysical Journal, v.74, p.2658-2665.
- BELLARDE, F.B.; JACKIK, M.H.; DA SILVA, M.A.A.P. (1998). Avaliação Sensorial de doce de leite pastoso: Preferência e aceitação de produtos comerciais Brasileiros e Argentinos. XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, RJ.
- BENGMARK, S, LORENZO, A G, CULEBRAS, J M (2001). Use of Pro-, Pre- and Synbiotics in the ICU - Future options Nutr. Hosp., v.16,no.6, p.239-256.
- BERRADA, N.,LEMELAND, J.F., LAROCHE, G., THOUVENOT, P., PIAIA, M. (1991). Bifidobacterium from fermented milks- survival during gastric transit, jornal of Dairy Science, 74 (2), 409-413.
- BERTOL, T.M.; SANTOS FILHO, J.I. (1996). Soro de leite integral na alimentação de suínos. Suinocultura dinâmica. Periódico técnico informativo elaborado pelo Departamento Técnico Rhodia – Merieux.
- BLANDINO, A; MACYAS, M; CANTERO, D (2002) Glucose oxidase release from calcium alginate gel capsules, Enzyme and Microbial Technology, v.27, p 319-324.
- BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S.(1978). Statistisc for experimenters. An introduction to design, data analysis and model building. Nova York; Wiley.
- BRADBURY; J.F. (1984), Genus Xanthomonas. In: Krieng, N.R. e Holt, J.G. (Ed.), Bergey'S manual of systematic bacteriology, v. 1, Williams & Wilkins, London.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 8, de 11 de outubro de 2002. Aprovar o Regulamento Técnico sobre fixação de padrões de Identidade e Qualidade de alimentos completos e

Referências Bibliográficas

- de alimentos especiais destinados a cães e gatos. Diário Oficial da União, Brasília, 21 out. 2002. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1393>>. Acesso em: 26 fev. 2009.
- BRIÃO, V. B.; TAVARES, C. R. G. (2005); Geração de Efluentes na Indústria de Laticínios: Atitudes Preventivas e Oportunidades. 23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental.
- CARGILL AGRÍCOLA S/A. Disponível em www.cargill.com.br. Acesso em fevereiro de 2008.
- CARMINATI, C.A. (2001); Ensaio de Hidrólise Enzimática da Lactose em Reator a Membrana Utilizando Beta-Galactosidase *Kluyveromyces lactis*. 79p. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.
- COLLINS, M D, GIBSON, G R (1999). Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut Am J Clin Nutr 69(suppl):1052S-1057S.
- CORBIN, J. E. (1992). Inedible meat, poultry, and fish by-products in pet foods. In: A. M. Pearson and T. R. Dutson (Ed.) Inedible Meat By-Products, Advances in Meat Research. Vol. 8. pp 329-347. Elsevier Applied Science, London.
- CORCORAN, B.M, ROSS, R.P, FITZGERALD, G.F, DOCKERY, P, STANTON, C.(2006). Enhanced Survival of GroESL-Overproducing *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 under Stressful Conditions Induced by Drying. Applied and environmental microbiology, p. 5104–5107, v.72,n.7.
- CORREIO DE UBERLÂNDIA. Disponível em http://www.correiodeuberlandia.com.br/texto/2008/07/15/30574/producao_de_leite_est_a_44_mais_cara_neste_ano.html. Acesso em 23 de setembro de 2009.
- COULTATE, T P (1996) Manual de química y bioquímica de los alimentos, Zaragoza: Ed. Acribia, 2ed., p.70-78.
- COUTINHO FILHO, U; SANTOS, A.B; CARDOSO, V. L. (2007). Estudo da desativação térmica de simbiótico de uso veterinário. XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos P.1-5.
- DAIRY PROCESSING HANDBOOK (1995). Gosta Bylund. Ed. Tetra Pak Processing Systems AB, Lund, Sweden. CD ROOM.

Referências Bibliográficas

- DALLAS, P. e LAGRANGE, V.(1998). Aplicações de derivados de soro em produtos lácteos. Indústria de Laticínios v.2 n.13:49-51.
- DEMBCZYNSKI, R., JANKOWSKI, T. (2002). Growth characteristics and cidifying activity of *Lactobacillus rhamnosus* in alginate/starch liquid-core capsules. Enzyme and microbial technology 31, p. 111-115,
- DENDER, A. G. F. (1997). Revisão atualizada de pesquisa – soro de queijo. Seminário proteínas de soro de leite – uso de queijo como ingrediente. São Paulo.
- DIONIZIO, M A, BERTECHINI, A G, KATO, R K, TEIXEIRA, A S (2002). Prebióticos como promotores de crescimento para frangos de corte- desempenho e rendimento de carcaça. Ciênc. agrotec, Lavras. Edição Especial, p.1580-1587.
- DUMAIS, R. Queso. In: AMIOT, J. (1991). Ciencia y tecnologia de la leche. Zaragoza Ed.Acribia, S.A., p. 249-296.
- EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: www.alibra.com.br. Acesso em: 25 de novembro de 2008.
- FEDALTO, L.M, TKACZ, M., ADER, L.P. (2002). Probióticos na alimentação de leitões do desmame aos 63 dias de idade. Archives of Veterinary Science v.7, n.1, p.83-88.
- FERREIRA, C L L, TESHIMA, E (2000). Prebióticos Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, no.16, p.22-25.
- FLINT ,J. F.; ANGERT, E. R. (2005) .Development of a strain-specific assay for detection of viable *Lactobacillus* sp. HOFG1 after application to cattle feed Journal of Microbiological Methods, v.61,p.235–243
- FREITAS, F.F. (2007) Otimização do Processo de Imobilização de β - Galactosidase de *Aspergillus oryzae* em Alginato de sódio com gelatina e glutaraldeído. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Uberlândia.

Referências Bibliográficas

- GIRALDO-ZUNIGA, A.D.; COIMBRA, J.S.R.; GOMES, J.C.; MININ, L.A.; ROJAS, E.E.G. (2002). Propriedades funcionais e nutricionais das proteínas do soro de leite. Revista do Instituto Cândido Tostes, v. 57, n.325, p. 35-46.
- GIROTO, J. M.; PAWLOWSKY, U. (2001) O soro de leite e as alternativas para o seu beneficiamento. Brasil Alimentos, n.10, p. 43-46,.
- GIULIO, B.; ORLANDO, P.; BARBA, G.; COPPOLA, R. ; ROSA, M.; SADA, A.; PRISCO, P.P. ; NAZZARO, F (2005). Use of alginate and cryo-protective sugars to improve the viability of lactic acid bacteria after freezing and freeze-drying. World Journal of Microbiology & Biotechnology , v.21,p.739–746
- GUEIMONDE, M, JALONEN, L., HE, F, HIRAMATSU, M, SALMINEN, S (2006). Adhesion and competitive inhibition and displacement of human enteropathogens by selected lactobacilli. Food Research International 39 467–471
- HARDY, R. W.; BARROWS; F. T.(2002). Fish Nutrition, Academic Press: 3 edition, 500p.
- HEIDEBACH, T., FORST, P., KULOZIK, U.(2009). Microencapsulation of probiotic cell by means of rennet-gelation of milk proteins. Revista Food hydrocolloids , 23, 1670-1677.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: www.ibge.gov.br. Acesso em agosto de 2009.
- KERN, M (2002). Food, Feed, Fibre, Fuel and Industrial Products of the Future: Challenges and Opportunities. Understanding the Strategic Potential of Plant Genetic Engineering J. Agronomy & Crop Science, v.188,p.291-305.
- KRASAEKOOPT, W., BHANDARI, B., & DEETH, H. (2003). Evaluatuiou of encapsulation techniques of probiotics for yogurt. Internacional Dairy Journal, 13 (1), 3-13.
- KRONFELD, D.S.(1991). Nature and use of commercial dog foods. Jounal of the American Veterinary Medical.v.166, p.199-208.
- KÜRTI , P.; CHR. HANSEN A/S, BØGE ALLÉ, PO BOX 407, DK -2970 HØRSHOLM, DENMARK. (2007). Microbial balance and optimal digestion in pigs. Internacional Pig Topics,v.16, n.7.

Referências Bibliográficas

- KURTMANN, L.; CHARLOTTE U. CARLSEN, C.U.; RISBO, J.; LEIF H. SKIBSTED, L.H.; HEKMAT, S.; SOLTANI,H.; REID, G. (2009).Growth and survival of Lactobacillus reuteri RC-14 and Lactobacillus rhamnosus GR-1 in yogurt for use as a functional food Innovative Food Science & Emerging Technologies, Volume 10, Issue 2, Pages 293-296.
- LAGRANGE, V. e DALLAS, P. (1998). Produtos de soro dos EUA: disponibilidade, recursos tecnológicos, aplicações. Engenharia de Alimentos v.15:27-29.
- LEE; K ; HEO, T (2000). Survival of Bifidobacterium longum immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution .Applied And Environmental Microbiology, p. 869–873
- LINDSAY, R C (1996). Food additives In: Fennema, O R (ed.)New York: Marcel Dekker,Inc. Food Chemistry, p.767-823.
- LOWRY, O. H.; ROBSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenal reagent. J. Biol. Chem., vol. 193, pp. 265-275.
- MADRONA,G.S.(2007) Estudo do efeito da adição de soro de queijo na qualidade do doce de leite pastoso. Dissertação de Mestrado em Engenharia química, Universidade Estadual de Maringá.
- MAIORKA, A, SANTIN, E, SUGETA, S.M. ALMEIDA JG; MACARI M; (2001).Utilization of Prebiotics, Probiotics or Symbiotics in Broiler Chicken Diets. Rev. Bras. Cienc. Avic., vol.3, no.1, p.75-82.
- MARSHALL- JONES, Z.V.; BAILLON, M.A.; CROFT, J.M.; BUTTERWICK, R.F.(2006) Effects of Lactobacillus acidophilus DSM13241 as a probiotic in healthy adult cats. American Journal, v.67, p.1005-1012.
- MILLER, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry. v. 31, n. 3, p. 426-428.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, DA PECUÁRIA E DO ABASTECIMENTO. Estatísticas da Produção Nacional de leite. Disponível em: agricultura.gov.br. Acesso em: 20 de março de 2008.

Referências Bibliográficas

- OLIVEIRA, A.I.G. (1978). Soro liquido de leite para suínos em crescimento e terminação. Dissertação de mestrado. Escola Superior de Agricultura de Lavras.
- ØVERLAND, M., ROMARHEIMA, O. H., AHLSTRØM, Ø., STOREBAKKEN, T., SKREDE, A. (2007). Technical quality of dog food and salmon feed containing different bacterial protein sources and processed by different extrusion conditions Animal Feed Science and Technology. No. 134, p. 124–139.
- OUYANG, W.; CHEN, H.; JONES, M.L.; METZ, T.; HAQUE, T.; MARTONI, C.; PRAKASH, S. (2004). Artificial cell microcapsule for oral delivery of live bacterial cells for therapy: design, preparation and in-vitro characterization J. Pharm. Pharm. Sci, v7, No.3, p315-324.
- PARSONS, C.M.; CASTANON, F.; HAN, Y. (1997). Protein and amino acid quality of meat and bone meal. Poultry Science, v.61, p.2241-2246.
- PISECKY e SORENSEN. (1976). Some aspects of whey drying. Danish Dairy Industry.
- PONSANO, E. H. G. & CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. (1995). Fermentação do soro de queijo por kluyveromyces fragilis como alternativa para redução de sua capacidade poluente. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 15, n. 1, p. 170-173.
- POZZA, P.C.; GOMES, P.C., DONZELE, J., SANTIAGO, H., ROSTAGNO, POZZA, M. S..S. NOGUEIRA, E. T. (2004). Digestibilidade Ileal Aparente e Verdadeira de Aminoácidos de Farinhas de Carne e Ossos para Suínos. R. Bras. Zootec., v.33, n.5, p.1181-1191.
- PRASAD, J.; MCJARROW, P.; GOPAL, P. (2003). Heat and osmotic stress responses of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) in relation to viability after drying Applied and Environmental Microbiology, Vol. 69, No. 2, p. 917-925.
- RAMÍREZ, C.; BOLÍVAR, A.; CIFFONI, G.A.; PANCHENIAK, E.M.G.; SOCCOL, E.F.R.C. (2006). Micro-organismos lácteos probióticos para ser aplicados en la alimentación de larvas de camarón y peces como substituto de antibiótico. La Alimentación Latino Americana, v. 264, p. 70-78.
- RAYMENT, P.; WRIGHT, P.; HOAD, C.; CIAMPI, E.; HAYDOCK, D.; GOWLAND, P.; BUTLER, M.F. (2009). Investigation of alginate beads for gastro-intestinal functionality. Part 2: In vivo characterization Food Hydrocolloids, Volume 23, Issue 3, Pages 833-839

Referências Bibliográficas

- REIG, A. L C, ANESTO, J. B. (2002). Prebióticos y probióticos, una relación Beneficiosa. Revista Cubana Aliment Nutr , vol 16, p. 63-68
- REVILLION, Jean p., BRANDELLI, Adriano e AYUB, Marco A. Z. (2002). Produção de extratos de leveduras de uso alimentar a partir do soro de queijo: abordagem de elementos técnicos e mercadológicos relevantes. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 20, n. 2, p. 246-249.
- RIBEIRO, H. S. (2000). Obtenção e aplicação de concentrados protéicos de soro de leite bovino em produtos Carneos. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas.
- RICHARDS, N. S. P.S. (1997).Emprego racional do soro láctico. Indústria de Laticínios. mai/jun,p. 67-69.
- RICHARDS ,N.S.P.S. (2002).Soro Lácteo: Perspectivas Industriais e Proteção ao Meio Ambiente. Revista Food Ingredients, v.3, n.17, pp.20-27.
- ROOS, N M, KATAN, M B (2000). Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. Am J Clin Nutr ,v.71, p.405-411.
- ROUSSEAU, I. LE CERF, D. PICTON, L. ARGILLIER, J.F, MULLER G. (2004) Entrapment and release of sodium polystyrene sulfonate (SPS): from calcium alginate gel beads .European Polymer Journal 40 2709– 2715.
- ROY, I. GUPTA M. N. (2004). Hydrolysis of starch by a mixture of glucoamylase and pullulanase: entrapped individually in calcium alginate beads. Enzyme and Microbial Technology 34 ,26 – 32.
- SANTOS, G. T.; RIBAS, N. P.; VEIGA, D. R.; GONCALVES, G. D.; RIGOLON, L. P.; DAMASCENO, J. C.; MARTINS, E. N.(2000). Influência da adição de probióticos na dieta, sobre o estado sanitário e desempenho de bezerros. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, São Paulo - SP, v. 37, n. 1, p. 1-9.

Referências Bibliográficas

- SCHAREK, L. ;GUTH, J.; REITER,K.; WEYRAUCH, K.D.; TARAS, D; SCHWERK. P; SCHIERACK, P; SCHMIDT, M.F.G.; WIELER,L.H. ; TEDIN,K. (2005). Influence of a probiotic Enterococcus faecium strain on development of the immune system of sows and piglets. Veterinary Immunology and Immunopathology, v.105 ,p 151–161
- SHAH, N. P(2000). Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. Journal of Dairy Science, 83 (4), 894-907.
- SHAHJEE, H M; BANERJEE, K.; AHMAD, F. (2002). Comparative analysis of naturally occurring L-amino acid osmolytes and their D-isomers on protection of Escherichia coli against environmental stresses. J. Biosci. v. 27 , No. 5 , p.515–520.
- SHAPAWI, R, WING-KEONG,N, MUSTAFA, S. (2007). Replacement of fish meal with poultry by-product meal in diets formulated for the humpback grouper, Cromileptes altivelis. Aquaculture, No. 273, p.118–126.
- SEBRAE/MG. (2005). Diagnóstico da pecuária leiteira Estado de Minas Gerais. Belo Horizonte. 270p. Disponível em www.sebraemg.com.br. Acesso em novembro de 2009.
- SILVA, E N, TEIXEIRA, A S, BERTECHINI, A G, FERREIRA, C L L F, VENTURA, B G (2000). Desempenho de frangos de corte alimentados com rações contendo probióticos, antibióticos e duas fontes de fósforo. Ciênc. agrotec., Lavras, v. 24, (Edição Especial), p. 225-232.
- SILVA, L. P.; NORNBORG, J. L. (2003). Prebiotics in nonruminants nutrition. Cienc. Rural, Sept./Oct., vol.33, no.5, p.983-990.
- SIMPSON, P.J. ; FITZGERALD, G.F.; STANTON, C.; ROSS R.P(2004). The evaluation of a mupirocin-based selective medium for the enumeration of bifidobacteria from probiotic animal feed .Journal of Microbiological Methods, v.57, p9 – 16
- SOORO 2008. Disponível em www.sooro.com.br. Acesso em setembro de 2008.
- SOUZA, R.R. (2007).Recuperação de lactose e proteínas a partir do soro de queijo. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Maringá.

Referências Bibliográficas

- SPURGEON, K. R. (1976). Uses of whey in confectionery, dairy and other foods. Cultural Dairy Products Journal, vol. 11, n. 4, pp. 8-13.
- STANDARD METHODS for the examination of water and wastewater, American Public Health Association, 20th, Washington DC, 1998.
- STROMPFOVA, V; MARCINAKOVA, M; SIMONOVA, M; BOGOVIC-MATIJJASJIC, B. ; LAUKOVA, A (2006) Application of potential probiotic. Lactobacillus fermentum AD1 strain in healthy dogs Anaerobe, v. 12, p. 75–79
- TARI, C.; USTOK, F.I. e HARSA, S. (2009). Optimization of the associative growth of novel yoghurt cultures in the production of biomass, β -galactosidase and lactic acid using response surface methodology. *Internacional Dairy Journal*, v. 19, n. 4, p. 236-243.
- TEIXEIRA, A.S., CAVALCANTI, J.S., OST, P.R., SCHOULTEN, N.A. (2003) Probióticos em ração para frangos de corte utilizando farinha de carne e ossos com diferentes níveis de contaminação bacteriana. Ciências agrotécnica, Lavras. V.27, n.4, p.927-933.
- USDA, United States Department of Agriculture, Disponível em: <http://www.usda.gov>, Acesso em Setembro de 2009.
- USDEC, 2009.U.S.Dairy Export Council. Reference Manual for U.S. Whey and Lactose Products. Whey and Lactose: natural milk products. Disponível em www.fas.usda.gov. Acesso em junho de 2009.
- VEGETARIANISMO (2009). Disponível em www.vegetarianismo.com.br. Acesso em 1º fevereiro de 2009.
- VILANI, C. (2001). Tratamento do soro de Queijo desnatado empregando a Ultrafiltração e estudo da biodegradabilidade da fração permeada utilizando o processo anaeróbio, Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Uberlândia.
- WANG, A; BOLEN, D W.(1997). A naturally occurring protective system in urea-rich cells: mechanism of osmolyte protection of proteins against urea denaturation Biochemistry, v.36, p.9101-9108.
- WEESE, T.S. (2002). Probiotics, Prebiotics and Simbiotics. Books in Progress, v.22, p.357-360.

Referências Bibliográficas

YANCEY, P. H. (2001). Water Stress, Osmolytes and Proteins Amer. Zool., v.41, p.699–709.