

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de
Campinas para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos

**ESTUDO DOS PARÂMETROS DA ULTRAFILTRAÇÃO DE PERMEADO DE SORO
DE QUEIJO FERMENTADO POR *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.**

Viviane Bronstein
bacharel em Ciências Biológicas

ORIENTADOR
Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por VIVIANE BRONSTEIN e aprovada pela Comissão Julgadora em 28.02.97.

Campinas, 28 de fevereiro de 1997


Prof. Dr. RANULFO MONTE ALEGRE

Presidente da Banca

Campinas, 1997

UNIDADE	BC		
N.º CHAMADA:	7/UNICAMP		
	B789e		
V. Ex.			
TOMBO BC/	30286		
PROC.	281197		
C	<input type="checkbox"/>	D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00		
DATA	11/05/97		
N.º CPD	EM-00097554-9		

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

B789e

Bronstein, Viviane

Estudo dos parâmetros da ultrafiltração de permeado de soro fermentado por *Lactococcus lactis subsp. lactis* / Viviane Bronstein. -
-Campinas, SP: [s.n.], 1997.

Orientador: Ranulfo Monte Alegre

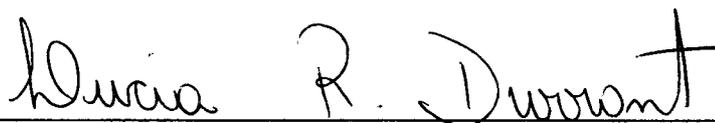
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Ultrafiltração. 2.Lactococcus lactis subsp. lactis. I.Alegre,
Ranulfo Monte. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III.Título.

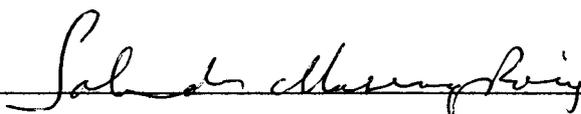
Banca Examinadora



Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
(orientador)



Prof. Dra. Lúcia Regina Durrant
(membro)



Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig
(membro)

Prof. Dra. Walkíria Hanada Viotto
(membro)

Campinas, de fevereiro de 1997

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Ranulfo Monte Alegre, pelo apoio durante o trabalho;

À Prof. Dra. Lucia Durrant (FEA-UNICAMP), Prof. Dr. Salvador Massaguer (FEA-UNICAMP) e Prof. Dra. Walkíria H. Viotto (FEA-UNICAMP) pelo exame prévio do manuscrito e sugestões sobre a tese;

À Ana Lourdes Gandara, pela convivência, conselhos e amizade;

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia: Cristian, Alaide e Bernadete, pela ajuda durante a tese e pela convivência; aos técnicos da área de Leite: Claudia, Beth e Armando pelo apoio durante os processamentos e aos demais técnicos e funcionários do Departamento de Tecnologia que me ajudaram durante a realização da tese;

À Leila, por todo apoio dado e disposição em ajudar sempre que necessário, sendo fundamental para realização deste trabalho;

A todos os amigos de Campinas que me acolheram nos momentos necessários e especialmente aos amigos da FEA, que tornaram o período em Campinas agradável e de grande crescimento;

À minha mãe, pelo apoio dado, mesmo longe;

Ao Gustavo, por todo apoio, compreensão e carinho nos momentos de crise e por me proporcionar inúmeras alegrias;

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL	i
ÍNDICE DE TABELAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMO	vii
SUMMARY	viii
1- INTRODUÇÃO	1
2.- OBJETIVO	4
3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1- Ultrafiltração e microfiltração	5
3.2- Características das membranas	6
3.3- Utilização da ultrafiltração e microfiltração para concentrar microrganismos	8
3.3.1- Influência dos parâmetros: pressão, velocidade tangencial, temperatura, concentração celular e porosidade da membrana	9
3.4- Fermento	12
3.5- Bactérias lácticas	13
3.6- Soro e permeado de soro	16
3.6.1- Utilização do permeado de soro como meio de fermentação	18
3.6.2- Utilização de bioreatores acoplados a membranas	19
3.7- Fermento concentrado	20
3.7.1- Produção de fermento concentrado	22
4- MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1- Material	24
4.1.1- Equipamentos	24
4.1.2- Microrganismo	25
4.1.3- Meio de manutenção	25
4.1.4- Meio de crescimento	25
4.1.4.1-Preparação do meio para fermentação	25
4.2- Métodos	25
4.2.1- Etapas dos processamentos	25
4.2.1.1- Preparação do meio de crescimento para a fermentação	26

4.2.1.2- Inoculação e fermentação do meio de crescimento	27
4.2.1.3- Ajuste do pH	27
4.2.1.4- Ultrafiltração	27
4.2.2- Condições dos processamentos realizados.....	28
4.2.2.1- Taxa de permeação dos meios 1 e 2 sem fermentar	28
4.2.2.2- Processamentos para a avaliação dos parâmetros	29
4.2.2.3- Processamentos com pH estável	29
4.2.3- Medidas dos parâmetros	30
4.2.3.1- Medida da vazão, fluxo (J_p) e fator de concentração volumétrica (F_{cv}) durante a ultrafiltração	30
4.2.3.2- Avaliação do número de células viáveis e análise microscópica das colônias.....	31
4.2.3.3- Cálculo da concentração de células iniciais da ultrafiltração.....	31
4.2.3.4- Medida da atividade do fermento	31
4.2.4- Análises físico-químicas do meio de crescimento.....	32
5- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1- Composição do permeado de soro utilizado como meio de fermentação	33
5.2- Crescimento de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> nos meios 1 e 2.....	34
5.3- Taxa de permeação dos meios 1 e 2	35
5.4- Variação do fluxo	37
5.4.1- Influência da porosidade da membrana no fluxo	37
5.4.2- Influência do pH no fluxo	42
5.4.3- Influência do número de células iniciais no fluxo	47
5.4.4- Influência da composição do meio de fermentação no fluxo	51
5.5- Variação da concentração celular ao longo dos processamentos.....	55
5.6- Atividade do fermento	60
6- CONCLUSÕES	63
7-REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	64
8- ANEXO	

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Subdivisão taxonômica das bactérias lácticas.....	15
Tabela 2- Características de algumas espécies de <i>Lactococcus</i> utilizadas como fermento láctico .	16
Tabela 3- Composição do soro doce.....	17
Tabela 4- Composição do permeado de soro.....	18
Tabela 5- Condições dos processamentos nos quais foi medida a taxa de permeação dos meios 1 e 2 sem fermentar (processamentos 1 e 2)	28
Tabela 6- Condições dos processamentos realizados para a avaliação de parâmetros.....	29
Tabela 7- Condições dos processamentos nos quais o pH da ultrafiltração foi mantido estável em torno de 6,0 (processamentos 15 e 16).....	30
Tabela 8- Composição do permeado de soro de queijo parmesão utilizado como meio de crescimento de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	34
Tabela 9- Influência da porosidade da membrana na taxa de permeação durante a UF de permeado de soro suplementado e fermentado por <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	38
Tabela 10- Influência do pH inicial da UF na taxa de permeação durante a UF de permeado de soro suplementado e fermentado por <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	42
Tabela 11- Influência da concentração inicial de células no fluxo de permeação durante a UF de permeado de soro suplementado e fermentado por <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	48
Tabela 12- Influência da composição do meio no fluxo de permeação durante a UF de permeado de soro suplementado e fermentado por <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	52
Tabela 13- Variação da concentração celular do retentado ao longo das 5 horas de UF de permeado de soro suplementado e fermentado por <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> nos diversos processamentos.....	57
Tabela 14- Atividade do <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> após 6 horas de incubação (Δ 6) a 30°C cultivado em soro de queijo e concentraado por UF nos diversos processamentos.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática do efeito do tamanho do poro e do tamanho da partícula no “fouling” das membranas.....	11
Figura 2- Representação esquemática do efeito da combinação do tamanho do poro, tamanho das partículas e distância entre os poros no fluxo de permeação.....	12
Figura 3- Sistemas de preparação de cultura	22
Figura 4- Fluxograma dos processamentos realizados	26
Figura 5- Curvas de crescimento do <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> nos meios 1 e 2 (permeado de soro de queijo parmesão suplementado) e variação do pH durante o crescimento.....	35
Figura 6- Curvas de permeação da ultrafiltração dos meios 1 e 2 sem fermentar, utilizando a membrana de 300.000 daltons, pressão 2 bars e temperatura ambiente.....	36
Figura 7- Curvas de permeação da UF de permeado de soro suplementado e fermentado por <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> nos processamentos 3, 4 e 5 (utilizando as membranas de 0,08 µm, 300.000 d e 50.000 d, respectivamente).....	39
Figura 8- Volume de permeado retirado ao longo da UF de permeado de soro suplementado e fermentado por <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> durante os processamentos 3, 4 e 5 (utilizando as membranas de 0,08 µm, 300.000 d e 50.000 d, respectivamente)	39
Figura 9- Curvas de permeação da UF de permeado de soro suplementado e fermentado por <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> nos processamentos dos processamentos 6, 7 e 8 (utilizando as membranas de 0,08 µm, 300.000 d e 50.000 d, respectivamente)	41
Figura 10- Volume de permeado retirado ao longo da UF de permeado de soro suplementado e fermentado por <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> nos processamentos 6, 7 e 8 (utilizando as membranas de 0,08 µm, 300.000 d e 50.000 d, respectivamente)	41
Figura 11- Curvas de permeação da UF de permeado de soro suplementado e fermentado por <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> nos processamentos 3 e 6 (pH inicial da UF 5,7 e 6,5, respectivamente)	43
Figura 12- Variação do pH ao longo da UF de permeado de soro suplementado e fermentado por <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> nos processamentos 3 e 6 (pH inicial da UF 5,7 e 6,5, respectivamente)	44

Figura 13- Curvas de permeação da UF de permeado de soro suplementado e fermentado por <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> nos processamentos 5 e 8 (pH inicial da UF 5,7 e 6,5, respectivamente)	44
Figura 14- Variação do pH ao longo da UF de permeado de soro suplementado e fermentado por <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> nos processamentos 5 e 8 (pH inicial da UF 5,7 e 6,5, respectivamente)	45
Figura 15- Curvas de permeação da UF de permeado de soro suplementado e fermentado por <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> nos processamentos 9 e 10 (pH inicial da UF 5,7 e 6,5, respectivamente)	45
Figura 16- Variação do pH ao longo da UF de permeado de soro suplementado e fermentado por <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> nos processamentos 9 e 10 6 (pH inicial da UF 5,7 e 6,5, respectivamente).....	46
Figura 17- Curvas de permeação da UF de permeado de soro suplementado e fermentado por <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> nos processamentos 13 e 14 (pH inicial da UF 5,7 e 6,5, respectivamente)	46
Figura 18- Variação do pH ao longo da UF de permeado de soro suplementado e fermentado por <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> nos processamentos 13 e 14 (pH inicial da UF 5,7 e 6,5, respectivamente).....	47
Figura 19- Curvas de permeação da UF de permeado de soro suplementado e fermentado por <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> nos processamentos 4 e 9 (n° de células iniciais da UF $3,1 \cdot 10^8$ e $3,0 \cdot 10^6$, respectivamente).....	49
Figura 20- Variação do pH ao longo da UF de permeado de soro suplementado e fermentado por <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> nos processamentos 4 e 9 (n° de células iniciais da UF $3,1 \cdot 10^8$ e $3,0 \cdot 10^6$, respectivamente).....	50
Figura 21- Curvas de permeação da UF de permeado de soro suplementado e fermentado por <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> nos processamentos 11, 12 e 14 (n° de células iniciais da UF $1,0 \cdot 10^8$, $1,6 \cdot 10^8$ e $1,4 \cdot 10^7$, respectivamente)	50
Figura 22- Variação do pH ao longo da UF de permeado de soro suplementado e fermentado por <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> nos processamentos 11, 12 e 14 (n° de células iniciais da UF $1,0 \cdot 10^8$, $1,6 \cdot 10^8$ e $1,4 \cdot 10^7$, respectivamente).....	51
Figura 23- Curvas de permeação da UF de permeado de soro suplementado e fermentado por <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> nos processamentos 9 e 13 (meio 1 e meio 2, respectivamente)	53

Figura 24- Curvas de permeação da UF de permeado de soro suplementado e fermentado por <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> nos processamentos 10 e 14 (meio 1 e meio 2, respectivamente)	53
Figura 25- Curvas de permeação da UF de permeado de soro suplementado e fermentado por <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> nos processamentos 7, 11(meio 1) e 12 (meio 2).....	54
Figura 26- Média da concentração celular no retentado durante a UF de permeado de soro fermentado por <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> dos processamentos com 12 horas de fermentação	58
Figura 27- Variação da concentração celular no retentado durante a UF de permeado de soro suplementado e fermentado por <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> nos processamentos 4 e 9 (9 e 12 horas de fermentação, respectivamente)	59
Figura 28- Variação da concentração celular no retentado durante a UF de permeado de soro suplementado e fermentado por <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> nos processamentos 7 e 10 (9 e 12 horas de fermentação, respectivamente)	59
Figura 29- Variação da concentração celular no retentado durante a UF de permeado de soro suplementado e fermentado por <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> nos processamentos 11, 12 (9 horas de fermentação) e 14 (12 horas de fermentação, respectivamente).....	60
Figura 30- Acidificação produzida após 6 horas de incubação a 30 °C por 1 ml de cultura de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> concentrado em 99 ml de leite em pó desnatado e reconstituído a 11% de sólidos	62

RESUMO

Soro de queijo parmesão foi ultrafiltrado e o permeado, suplementado com extrato de levedura e peptona, utilizado como meio de crescimento para o microrganismo *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. No final da fase exponencial de crescimento, o meio de cultura fermentado – permeado e microrganismo – foi submetido a uma ultrafiltração com o objetivo de concentrar o microrganismo.

Foram realizados um total de 16 processamentos diferentes, nos quais variou-se as condições iniciais da ultrafiltração, tendo sido avaliados os seguintes parâmetros: porosidade da membrana, pH, taxa de permeação e número de células viáveis no permeado e no retentado, a fim de ser estudado a influência de cada um destes parâmetros na taxa de permeação da ultrafiltração, além do estudo da concentração de células durante a ultrafiltração.

As membranas utilizadas foram eficazes como meio de barragem para o microrganismo *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, ficando o retentado com uma média celular de 10^8 ufc/ml e o permeado com uma média celular de 10^2 ufc/ml.

Foi visto que membranas de diferentes porosidades tiveram taxas de fluxo bem semelhantes. O aumento da concentração celular provocou a diminuição do fluxo. O pH também influenciou a taxa de permeação: quanto maior o pH, maior a taxa de permeação.

A concentração celular do retentado dependeu, também, fortemente do pH, só sendo possível manter concentrações na faixa de 10^9 ufc/ml nos processamentos onde o pH da ultrafiltração foi controlado, ficando em torno de 6,0.

SUMMARY

Parmesan cheese whey was ultrafiltered and the permeate, which was supplemented with yeast extract and peptone, used as a growth medium for the bacteria *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. At the end of the exponential growth phase, the fermented growth medium was ultrafiltered to concentrate the microorganism.

A total of 16 runs was done with different initial ultrafiltration conditions and were studied the following parameters: membrane porosity, cellular concentration, pH and permeation rate during the ultrafiltration process.

The membranes used were efficient as a mean of a barrage for the *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. On average, the cellular concentrations were 10^8 CFU/mL and 10^2 CFU/mL for retentate and permeate, respectively

Membranes of different porosities had very similar flux rates. The increasing of cellular concentration caused a flux decrease. The pH also affected on the permeation rate: higher the pH, higher the permeation rate.

The retentate cellular concentration was also influenced by pH. Reaching concentrations around 10^9 CFU/mL was possible only when the ultrafiltration pH was controlled and maintained around 6.0.

1- INTRODUÇÃO

O soro é um subproduto da indústria queijeira. A fabricação de um quilo de queijo produz, em média, 8,5 kg de soro (VIOTTO, 1993). Dados de 1995 mostram que a produção mundial de soro é da ordem de 40 milhões de toneladas (TEJAYADI & CHERYAN, 1995). Ele é um dos resíduos mais poluentes da indústria alimentícia, sendo muito perecível.

Sendo o soro um meio rico em proteínas e lactose, algumas alternativas têm sido utilizadas pela indústria láctea para o seu reaproveitamento, entre elas o uso da ultrafiltração. A ultrafiltração (UF) do soro separa as proteínas, que ficam retidas no concentrado, da lactose e sais, que formam o permeado. Assim, as proteínas do soro, de grande valor nutritivo, são reaproveitadas, restando o permeado, um subproduto ainda com uma grande carga poluidora, o qual também pode ser reaproveitado como fonte de lactose e meio de fermentação, pois, além de ter um grande teor de lactose, contém minerais e vitaminas (MOULIN & GALZY, 1984). Várias pesquisas têm sido realizadas a fim de verificar o uso do soro e do permeado de soro como substrato para fermentação de microrganismos para conversão da lactose em diversos produtos, como levedura de pão, galactose, etanol (MOULIN & GALZY, 1984) e, principalmente, ácido láctico por *Lactobacillus helveticus* (ROY *et alli*, 1986; ROY & GOULET, 1987; ROY *et alli*, 1987; AESCHLIMANN & STOCKAR, 1989; AMRANE & PRINGENT, 1994), além da utilização do permeado como meio de crescimento para fermento (CRISTOPHERSON & ZOTTOLA, 1989a; CRISTOPHERSON & ZOTTOLA, 1989b). Nessas fermentações a lactose é utilizada como fonte de carbono, havendo um suplemento com uma fonte de nitrogênio adicional.

Os produtos lácteos obtidos por fermentação (como o iogurte e o queijo) são resultado da ação de microrganismos e suas enzimas. Na indústria de laticínios, esses microrganismos são chamados de fermentos lácticos (TAMINE, 1990), formados principalmente pelas bactérias lácticas. As bactérias lácticas agem fermentando a lactose do leite a ácido láctico, com conseqüente diminuição do pH, ajudando na coagulação e conferindo um sabor ácido característico. Essas bactérias atuam, também, como agentes de maturação devido às suas atividades proteolíticas e lipolíticas, além de prevenir o crescimento de bactérias contaminantes.

A produção e utilização de culturas lácticas concentradas vêm sendo desenvolvidas nos últimos 30 anos. Culturas concentradas são usadas para a inoculação no tanque de fermentação ou diretamente no tanque de coagulação (WIGLEY, 1977), eliminando as diversas fases intermediárias de subcultura das bactérias e diminuindo os riscos de contaminação. No método tradicional, o fermento intermediário contém, em média, 10^9 células/ml, sendo inoculado no tanque na concentração de 0,5 a 5%, ficando este com aproximadamente 10^7 células/ml. Com a concentração do fermento pode se atingir uma altíssima concentração de células, por volta de 10^{11} células/ml. Este fermento concentrado pode ser comercializado tanto na forma congelada como na forma liofilizada, ficando os laticínios livres da produção do fermento, economizando custos de investimento, energia, espaço e trabalho, embora o custo do fermento pronto seja elevado (DELBEKE, 1985). Este fermento é produzido, atualmente, para a fabricação de vários tipos de queijos.

A concentração do fermento pode ser feita por centrifugação, difusão ou ultrafiltração, tendo-se como meta a obtenção da maior taxa de sobrevivência possível junto com a manutenção de uma alta atividade da cultura. A taxa de sobrevivência da cultura depende das condições de processamento (meio de crescimento, presença de compostos criogênicos, liofilização e secagem) e do método de concentração celular. Para concentrar as células por centrifugação, pode-se fazer uma neutralização contínua do meio de crescimento mantendo o pH por volta de 5,8-6,0, produzindo, desta forma, uma cultura com um grande número de células. Neste caso, a formação de lactato pode ser inibitória e a ação mecânica pode causar algum dano físico às células. Pelas técnicas de difusão de cultura e ultrafiltração pode-se atingir 10^{11} ufc ml⁻¹, removendo-se o lactato do meio de crescimento (TAMINE, 1990) e concentrando a biomassa. Segundo PRINGENT *et alli* (1988), o processo de difusão apresenta restrições impostas pelo tamanho da unidade de difusão, sendo o processo de ultrafiltração adequado para este fim.

Assim, a filtração tangencial apresenta-se como uma nova alternativa para a concentração de células. Nos últimos anos, com o desenvolvimento das membranas minerais, tornou-se possível a esterilização do aparelho "in-situ" com vapor, ampliando as áreas de atuação desta técnica, podendo ser utilizada nas indústrias farmacêuticas e de alimentos. Esse processo pode ter um vasto potencial quando é desejada uma alta concentração celular para poder alcançar altas taxas do produto metabólico final ou quando é desejada uma alta

concentração celular para extração de produtos intracelulares ou produção de fermento (CRESPO *et alli*, 1992), por permitir a integração da fermentação e das etapas de separação, mantendo, simultaneamente, uma alta concentração celular e removendo, continuamente, o produto do fermentador (TEJAYADI & CHERYAN, 1995). Vários trabalhos existem mostrando a ultrafiltração e/ou microfiltração como método de concentração de células (HENRY JR. & ALLRED, 1972; REID & ADLAM, 1976; TANNY *et alli*, 1980; LE & ATKINSON, 1985), mas poucos deles tratam especificamente da produção de fermento concentrado (PRINGENT *et alli*, 1988), sendo necessário mais estudos sobre o assunto. Embora essas técnicas já estejam sendo utilizadas para este fim, detalhes da produção não são publicados (PRINGENT *et alli*, 1988).

A eficiência do processo de ultrafiltração (UF) e/ou microfiltração (MF) é afetada pelo "fouling" da membrana e pela interação das diversas variáveis do processo (LE & ATKINSON, 1985), precisando existir um compromisso entre as características biológicas e as características físicas do sistema (CRESPO *et alli*, 1992). Vários fatores afetam o desempenho da UF e MF durante a concentração de células, como velocidade tangencial, pressão, temperatura, turbulência, tamanho das partículas, condições do meio, características da membrana e outros (KRONER *et alli*, 1984). Só com a otimização destes parâmetros é possível manter um fluxo alto o suficiente para que a técnica seja economicamente viável. De acordo com KRONER *et alli* (1984), existem vários modelos teóricos para modelar matematicamente estes processos, porém nenhum deles reflete exatamente o resultado experimental, concluindo que as condições ótimas de cada operação devem ser encontradas experimentalmente.

Segundo PRINGENT *et alli* (1988), muitos estudos ainda são necessários para estimar os parâmetros críticos na produção de fermento concentrado por UF ou MF, como tipo de bomba, pressão transmembrana, porosidade da membrana, influência da morfologia da bactéria no "fouling" e no perfil de permeação.

2- OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo estudar a influência do pH, concentração celular e porosidade da membrana na taxa de permeação durante a ultrafiltração de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* crescido em permeado de soro, verificando o efeito de cada um destes parâmetros no fluxo de permeado; visando o aproveitamento do permeado de queijo, um subproduto da indústria queijeira como meio de fermentação e o aprimoramento da técnica de ultrafiltração a fim de ser utilizada como um meio viável para a obtenção de fermento concentrado. O acompanhamento da variação do número de células viáveis no retentado e no permeado durante a ultrafiltração visou também o estudo da concentração do fermento durante a ultrafiltração.

3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1- ULTRAFILTRAÇÃO E MICROFILTRAÇÃO

Os processos de filtração separam as partículas de um fluido de acordo com o peso e o tamanho molecular destas partículas. Durante a filtração, uma solução contendo um ou mais solutos escoam sobre uma membrana semi-permeável, onde o solvente e os solutos menores que os poros da membrana passam através dela, enquanto as partículas maiores são retidas pela membrana, permitindo, assim, a concentração e fracionamento simultâneos dos componentes do fluido (MEMBRANE...,1990).

Existem dois sistemas básicos de filtração: a filtração convencional e a filtração tangencial. Na filtração convencional, o fluido escoam perpendicularmente através da membrana filtrante. Dessa forma, os sólidos do fluxo rejeitados pela membrana se depositam sobre a superfície desta provocando uma grande diminuição do fluxo. Já nos sistemas de filtração tangencial, o escoamento ocorre paralelo à superfície da membrana, a alta velocidade, arrastando grande parte dos sólidos que se acumulam nessa superfície. Neste último sistema também ocorre diminuição do fluxo, porém essa diminuição é mais branda, tornando este sistema mais eficiente, permitindo, assim, o processamento de grandes volumes de fluido (MEMBRANE..., 1990).

Nos sistemas de filtração tangencial, a força motriz é a pressão. As partículas retidas pela membrana são denominadas concentrado ou retentado e o que passa pela membrana é denominado permeado ou filtrado. A filtração tangencial pode ser dividida em osmose reversa, ultrafiltração e microfiltração, de acordo com o tamanho das partículas retidas pela membrana (PAULSON *et alli*, 1984).

A ultrafiltração (UF) utiliza membranas com poros entre 0,002 a 0,2 microns, correspondendo a um peso molecular de 500 a 300.000 daltons (PAULSON *et alli*, 1984). Essas membranas permitem a passagem de água e pequenas moléculas, como íons, e retêm macromoléculas e colóides, como proteínas e gorduras, operando sem a aplicação de calor e sem o uso de condições químicas ou físicas severas (BEATON, 1979). A microfiltração (MF)

separa sólidos em suspensão, utilizando membranas de 0,02 a 2,0 microns (PAULSON *et alli*, 1984). Ela remove microrganismos, óleos emulsionados, amido e outros (MEMBRANE..., 1990). Na realidade, a separação não é dada somente pelo tamanho do poro da membrana, sendo afetada pelas interações químicas e físicas entre o material que passa pela membrana e a própria membrana (LE & ATKINSON, 1985).

3.2- CARACTERÍSTICAS DAS MEMBRANAS

A membrana é a parte mais importante de um sistema de ultrafiltração e/ou microfiltração (EL-GAZZAR & MARTH, 1991). Existem vários tipos de membranas e equipamentos para a filtração tangencial. As membranas variam de acordo com sua morfologia, composição e configuração, devendo ser cada um desses fatores escolhido de acordo com o tipo de material a ser fracionado e as condições de operação, como pH, temperatura e pressão (PAULSON *et alli*, 1984).

Morfologicamente, as membranas podem ser classificadas como assimétricas (anisotrópicas) ou microporosas (isotrópicas) (MEMBRANE..., 1990). As membranas assimétricas possuem um corpo principal de natureza esponjosa, com poros extremamente abertos, que serve de suporte para uma camada fina de 0,1 a 0,2 micrômetros de espessura a qual é, efetivamente, a camada da membrana que ultrafiltra. Já as membranas microporosas possuem poros de tamanho uniforme em toda sua extensão (VIOTTO, 1993).

Existem vários polímeros que podem ser utilizados para produzir as membranas (EL-GAZZAR & MARTH, 1991). As primeiras membranas fabricadas eram compostas de acetato de celulose. Essa primeira geração de membranas apresenta limites em relação ao pH (3 a 8) e a temperatura (até 50 °C), além de sensibilidade a microrganismos e desinfetantes. Essas condições limitam os processos de limpeza utilizados pela indústria (EL-GAZZAR & MARTH, 1991). A segunda geração de membranas é feita de polímeros sintéticos, como derivados de polissulfona ou poliolefina, apresentando maior resistência ao pH (2 a 12) e temperatura (até 75 °C). Posteriormente, foram desenvolvidas membranas minerais, compostas por uma fina camada de óxido mineral, geralmente óxido de zirconila, colocada sobre um suporte poroso como alumina, aço inox ou carbono. Essa terceira geração suporta toda faixa

de pH e maiores temperaturas (até 400 °C), apresenta resistência a solventes orgânicos e inorgânicos (DAUFIN *et alli*, 1991), além de possuir grande resistência mecânica (MAUBOIS, 1980), oferecendo maior resistência às condições de operação e limpeza (DAUFIN *et alli*, 1991). Estas características (estabilidade química, mecânica e térmica) tornam esta terceira geração de membranas apropriadas para o uso industrial.

Geometricamente, há 4 tipos básicos de configurações de membrana: tubular, de placas, de fibras capilares e espiral. Essa classificação é feita de acordo com a forma das membranas e o modo como elas estão arranjadas. As diversas configurações contêm e dão suporte às membranas (PAULSON *et alli*, 1984). Cada tipo tem vantagens e desvantagens em relação ao desempenho, custo de investimento, custo operacional, volume morto e eficiência de limpeza (MAUBOIS, 1980).

O desempenho da membrana é avaliado através de sua taxa de permeação, que consiste na quantidade de fluido filtrado (fluxo de permeado) durante um certo período. Durante a filtração o fluxo vai decaindo. Esse declínio ocorre em dois estágios: primeiro, há uma queda brusca no fluxo e, depois, um declínio mais gradual (VIOTTO, 1993). Várias teorias e modelos existem para explicar esta queda do fluxo (LE & HOWELL, 1984). De acordo com CHERYAN (1986a) a queda brusca é devida ao fenômeno denominado “fouling” da membrana. O “fouling” é resultado da acumulação de partículas na superfície da membrana (adsorção) e/ou cristalização e precipitação de solutos menores sobre a superfície e dentro dos poros da membrana. Já o declínio mais gradual do fluxo ocorre devido à polarização da concentração. A polarização da concentração é um fenômeno provocado por partículas grandes, rejeitadas pela membrana, que formam uma camada altamente viscosa sobre esta membrana chamada de camada secundária.

Vários fatores afetam o fluxo, como a natureza do fluido (seus componentes) e as condições de operação – temperatura, pressão e pH (CHERYAN, 1986a). O fator de concentração também altera o fluxo, pois o aumento da concentração provoca um aumento da viscosidade, diminuindo a taxa de permeação e, assim, diminuindo o fluxo (CHERYAN, 1986a). O aumento da velocidade tangencial e o aumento da turbulência arrastam os sólidos acumulados, reduzindo a espessura da camada de gel polarizada e, então, aumentando a taxa de permeação (CHERYAN, 1986a).

O fim do processamento deve ser imediatamente seguido pelo enxágue com água de toda a planta, incluindo-se os tanques, bombas, tubulações e acessórios, até que se obtenha água limpa em todas as saídas. A regra básica na limpeza e manutenção das membranas é nunca deixar a membrana secar em contato com o fluido após o processamento. Uma membrana é considerada limpa quando o fluxo original com água pura é restaurado (CHERYAN, 1986a).

Para a limpeza da membrana utiliza-se soda e ácido. Os resíduos orgânicos, como proteínas e gorduras, são removidos por detergentes alcalinos à base de hidróxido de sódio. Os compostos minerais (inorgânicos) são removidos por ácidos, como o nítrico e o fosfórico. Pode-se, ainda, utilizar cloro na forma de hipoclorito, o qual dilata os poros e arrasta o material alojado dentro destes (CHERYAN, 1986a). Quando o “fouling” da membrana é mais severo, utiliza-se, também, detergentes enzimáticos com proteases e lipases (BEATON, 1979).

3.3- UTILIZAÇÃO DA ULTRAFILTRAÇÃO E MICROFILTRAÇÃO PARA CONCENTRAR MICRORGANISMOS

A filtração tangencial demonstra ser uma nova alternativa para a concentração de células, apresentando algumas vantagens sobre métodos tradicionais como centrifugação, filtração convencional, secagem e liofilização, pela possibilidade de ser praticada em larga escala e continuamente, não sendo relevante a pequena diferença de densidade entre a bactéria e o meio, além de manter as células hidratadas e minimizar o acúmulo de células e macromoléculas sobre o filtro. Dessa forma, pode-se manter um fluxo alto por longos períodos sem necessidade de agentes flocculantes (HENRY JR. & ALLRED, 1972; CRESPO *et alli*, 1992). Nos últimos anos, com o desenvolvimento das membranas minerais, tornou-se possível a esterilização do aparelho “in-situ” com vapor, ampliando as áreas de atuação desta técnica, podendo ser empregada nas indústrias farmacêuticas e de alimentos.

A filtração tangencial começou a ser utilizada para concentrar células nos anos 70. HENRY JR. & ALLRED (1972) concentraram *Micrococcus* sp., analisando o efeito da concentração de bactérias, pressão e outros parâmetros durante o processamento. REID & ADLAM (1976) concentraram células de *Corybacterium parvum* com membranas de poros de

0,2 nm. Eles conseguiram concentrar 60 litros de meio (com 1,7 mg de células/ ml) a 15 litros de meio e, a seguir, concentraram esses 15 litros a 8 litros de meio, chegando a uma concentração final de 10,3 mg de células/ ml. Na década de 80, novas aplicações surgiram, como sua utilização para a esterilização a frio (MERIN *et alli*, 1983a; MAUBOIS, 1991).

A eficiência do processo é afetada pelo “fouling” da membrana e pela interação das diversas variáveis do processo (LE & ATKINSON, 1985), precisando existir um compromisso entre as características biológicas e as características físicas do sistema (CRESPO *et alli*, 1992). Vários fatores afetam o desempenho da ultrafiltração e microfiltração durante a concentração de células, como velocidade tangencial, pressão, temperatura, turbulência, tamanho das partículas, condições do meio, características da membrana e outros (KRONER *et alli*, 1984), existindo várias pesquisas sobre a influência de cada um destes parâmetros no fluxo de permeação. Só com a otimização destes parâmetros é possível manter um fluxo alto o suficiente para que a técnica seja economicamente viável. De acordo com KRONER *et alli* (1984), existem vários modelos teóricos para modelar matematicamente estes processos, porém nenhum deles reflete exatamente o resultado experimental, tendo os autores concluído que as condições ótimas de cada operação devem ser encontradas experimentalmente.

3.3.1- Influência dos parâmetros: pressão, velocidade tangencial, temperatura, concentração celular e porosidade da membrana

De acordo com LE & ATKINSON (1985), a velocidade e a pressão têm uma grande influência na formação da camada secundária, sendo obtido um melhor fluxo quando é combinada uma pressão baixa com alta velocidade (KRONER *et alli*, 1984).

Estudando a influência da temperatura, KRONER *et alli* (1984) concentraram por ultrafiltração *E.coli* a duas diferentes temperaturas: 5 e 20 °C, observando um fluxo bem maior a temperatura mais alta, atribuindo esta diferença principalmente a mudanças na viscosidade da suspensão. Este resultado também foi encontrado por outros autores (HENRY JR. & ADLAM, 1972).

CHERYAN (1986b) cita que a microfiltração é um processo que não interfere na integridade da célula, mantendo-a com todas as suas características originais. No entanto, TANNY *et alli* (1980), testando a capacidade aglutinadora da *E.coli* K-12 após a microfiltração, verificaram que em baixas taxas de fluxo (450 ml /min) a capacidade era mantida. Porém, a altas taxas de permeação (1,1 l /min), as bactérias perdiam esta capacidade. Sendo a aglutinação um fenômeno que ocorre devido a uma proteína da membrana da bactéria, eles supuseram que o processamento provocou a perda ou modificação desta proteína. CRESPO *et alli* (1992) encontraram um resultado similar ao estudar a ultrafiltração de *Propionibacterium acidi-propionici*, encontrando uma proteína de membrana no meio após algumas horas de processamento, evidenciando a modificação da membrana do microrganismo durante o processamento. LE & ATKINSON (1985) recomendam minimizar a turbulência causada pela bomba, se for desejado que a superfície dos microrganismos mantenha-se intacta.

Analisando o efeito da concentração celular no fluxo de permeado, TANNY *et alli* (1980), ao estudar a concentração de bactérias patogênicas, verificaram que, com uma concentração inicial de 10^9 células/ml., concentrar 5 vezes (de 5 litros para 1 litro) demorava 80 minutos e, com uma concentração inicial de 10^8 células/ml, concentrar 5 vezes demorava 50 minutos, concluindo que a concentração inicial de microrganismos na cultura é um fator importante na taxa de permeação. KRONER *et alli* (1984), comparando a concentração de *Escherichia coli* com a concentração de *Bacillus cereus*, observaram que com a primeira, eles conseguiram atingir um maior fator de concentração devido a menor viscosidade do meio, atribuindo essa diferença de viscosidade à diferença de tamanho entre *E.coli* e *B.cereus*. Logo, a viscosidade do meio é um dos fatores que determina a máxima concentração celular possível.

Embora pareça lógico que quanto maior o tamanho do poro a ser utilizado maior o fluxo, esta proposição não é válida experimentalmente. Alguns modelos existem para explicar a interação entre as partículas e os poros da membrana. Segundo CHERYAN (1986b), quando o tamanho da partícula (microrganismo) é da mesma ordem de magnitude do poro, é possível que algumas células fiquem assentadas sobre o poro, bloqueando-o. Se, por outro lado, o tamanho do poro for bem menor que o microrganismo, as partículas não irão se assentar sobre o poro, podendo ser arrastadas pelo fluxo. Esse modelo é ilustrado na Figura 1.

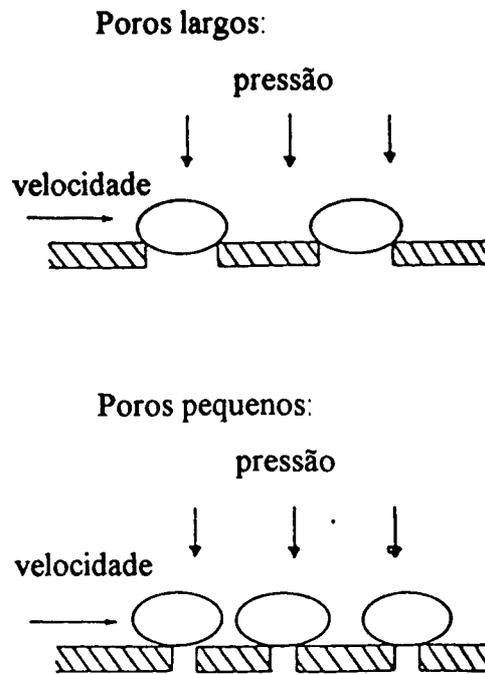


Figura 1- Representação esquemática do efeito do tamanho do poro e do tamanho da partícula no “fouling” das membranas. Fonte: CHERYAN, 1986b

O modelo de LE & HOWELL (1984) ainda detalha mais esta interação. Segundo este modelo, quando uma suspensão coloidal passa através de uma membrana de ultrafiltração, ou seja, quando o tamanho das partículas é maior que o tamanho do poro, os poros não são completamente bloqueados, uma vez que alguns deles ficam escondidos pelas partículas vizinhas, não havendo espaço para uma outra partícula bloqueá-lo (Figura 2). A razão entre as áreas bloqueadas da membrana e as áreas escondidas irá depender do tamanho da partícula e do tamanho e espaçamento dos poros.

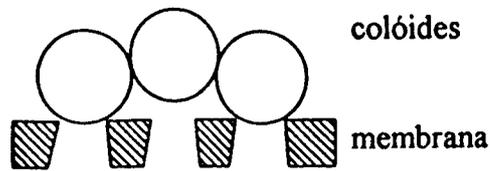


Figura 2- Representação esquemática do efeito da combinação do tamanho do poro, tamanho das partículas e distância entre os poros no fluxo de permeação. Fonte: LE & HOWELL, 1984

Verificando a influência do tamanho do poro na taxa de fluxo durante a microfiltração, LE & ATKINSON (1985) utilizaram três membranas com tamanhos de poros diferentes para concentrar *Erwinia carotovora*: 0,2 μm ; 0,45 μm e 0,6 μm . Com a membrana de 0,6 μm eles obtiveram um fluxo 20% maior que com a membrana de 0,2 μm . Porém, a membrana de 0,45 μm apresentou o dobro do fluxo da membrana de 0,6 μm . Com esse resultado, eles concluem que o melhor tamanho de poro só pode ser obtido experimentalmente, não sendo o melhor fluxo obtido com a membrana de maior porosidade. Os autores acreditam que este efeito é devido à relação entre o tamanho das células bacterianas e o tamanho do poro e também devido à distância entre os poros, de acordo com o modelo de LE & HOWELL (1984). MERIN *et alli* (1983a) encontraram um resultado semelhante ao analisar a concentração de bactérias em salmoura de queijo por microfiltração, utilizando membranas de porosidades 0,2 μm , 0,65 μm , 0,8 μm e 1,2 μm . Eles observaram um aumento do fluxo com o aumento da porosidade da membrana, com exceção da membrana de 0,2 μm , a qual apresentou um fluxo maior que o da membrana de 0,65 μm .

3.4- FERMENTO

Na indústria queijeira, o fermento é responsável por algumas características essenciais do produto fermentado (KOSIKOWSKI, 1982), como a produção de ácido láctico, com diminuição do pH gerando sabor e aroma característicos do produto. A acidificação ainda previne o crescimento de patógenos. O fermento também possui atividade proteolítica, e às vezes lipolítica, atuando como agente de maturação. Alguns produzem componentes voláteis,

como diacetil e acetaldeído, contribuindo para o desenvolvimento do “flavour” do produto (TAMINE, 1990). Outros produzem agentes antimicrobiais, as bacteriocinas, ajudando também a evitar a contaminação por patógenos (COFFEY *et alli*, 1994).

Vemos, então, que as características importantes de um bom fermento são: capacidade de crescimento rápido, produção de ácido, atividade proteolítica, tolerância a sal e resistência a bacteriófagos (TAMINE, 1990), devendo estas características ser testadas na escolha da cepa utilizada.

Para cada tipo de queijo, utiliza-se as espécies bacterianas apropriadas para o tipo de fermentação requerida e, conseqüentemente, para o desenvolvimento das características desejadas, como aroma, sabor e textura (TAMINE,1990). O fermento é formado, principalmente, por bactérias láticas, podendo ser utilizadas outras culturas de microrganismos para a fabricação de queijos específicos, como *Propionibacterium* na fabricação de queijo suíço e *Brevibacterium* na fabricação de queijo limburguer. Utiliza-se, ainda, alguns fungos, também para dar sabor e aroma específicos em certos tipos de queijo, como o *Penicillium* utilizado na fabricação de Camembert e Roquefort.

3.5- BACTÉRIAS LÁTICAS

As bactérias láticas são largamente utilizadas na indústria alimentícia como fermento para a produção de diversos produtos fermentados, tendo uma grande importância econômica (STANIER *et alli*, 1986). Por isso, atualmente, grande atenção tem sido dada a estas bactérias e seu metabolismo.

As bactérias láticas são assim classificadas por produzirem o ácido láctico como principal ou único produto do metabolismo fermentativo. Elas não apresentam cadeia respiratória, sendo consideradas microaerófilas e obtendo toda a energia através da fermentação de carboidratos. São gram positivas e catalase negativas (STANIER *et alli*, 1986).

Por possuírem uma limitada atividade biossintética, essas bactérias são muito exigentes nutricionalmente, requerendo diversos fatores de crescimento. No meio ambiente, estão associadas a habitats ricos em nutrientes, como leite, carne e legumes. Algumas bactérias fazem parte da microbiota bucal e intestinal dos mamíferos. Em laboratório, a adição de peptona, extrato de levedura ou outros hidrolisados proteicos no meio de cultura é geralmente necessária para prover um meio favorável para esses microrganismos (STANIER *et alli*, 1986).

No leite, a concentração de peptídios de baixo peso molecular e aminoácidos livres não é suficiente para suportar o crescimento ótimo destas bactérias, precisando elas de um eficiente sistema proteolítico para metabolizar as proteínas (COFFEY *et alli*, 1994). O sistema proteolítico é formado por proteinases e peptidases. As proteinases degradam a caseína e outras proteínas em peptídios, estando associadas à parede celular e apresentando uma grande variação quanto ao número, localização e especificidade entre as diferentes cepas. (COGAN & ACCOLAS, 1990). Os peptídios entram na célula bacteriana e são hidrolisados intracelularmente pelas peptidases, sendo degradados a aminoácidos (SHARPE, 1979). Algumas cepas não têm atividade proteolítica, sendo Ptr^- , dependendo da atividade das cepas Ptr^+ para crescer no meio (COGAN & ACCOLAS, 1990).

Além da atividade proteolítica, duas outras atividades metabólicas são importantes comercialmente: a produção de ácido láctico a partir da lactose e a produção de 'flavour' (diacetil, acetato e gás carbônico a partir do citrato e acetaldeído a partir da treonina e/ou açúcar). O transporte e subsequente metabolismo da lactose varia consideravelmente entre as espécies. De um modo geral, o transporte da lactose é codificado por plasmídeo, sendo a lactose clivada por uma β -galactosidase (COGAN & ACCOLAS, 1990).

A classificação das bactérias lácticas em diferentes gêneros está baseada na morfologia, modo de fermentação da glicose, temperatura de crescimento, configuração do ácido láctico produzido e tolerância a altas concentrações de sal, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1: Subdivisão taxonômica das bactérias lácticas

gênero	forma celular	modo de fermentação da glicose	configuração do ácido láctico
<i>Lactococcus</i>	esferas em cadeia	homofermentativo	L
<i>Leuconostoc</i>	esferas em cadeias	heterofermentativo	D
<i>Pediococcus</i>	esferas em tétrades	homofermentativo	DL
<i>Streptococcus</i>	esferas em cadeia	homofermentativo	L
<i>Lactobacillus</i>	bastonetes	variável entre as espécies	variável entre as espécies

Fonte: STANIER *et alli* (1986)

Destes gêneros, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* e *Lactobacillus* são utilizados pela indústria de laticínios, sendo os dois primeiros mesófilos e os dois últimos termófilos (MARSHALL, 1987). Dentro do gênero *Lactococcus*, três espécies são as mais utilizadas industrialmente como fermento, mostradas na Tabela 2.

Tabela 2: Características de algumas espécies de *Lactococcus* utilizadas como fermento láctico

característica	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetilactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
crescimento a 39,5 °C	+	+	-
crescimento a 50 °C	-	-	-
NH ₃ a partir de arginina	+	+	-
ácido a partir de maltose	+	+	-
CO ₂ e diacetil a partir de citrato	-	+	-
porcentagem de NaCl que inibe o crescimento	4,0-6,5	4,0-6,5	2,0-4,0

Fonte: SHARPE (1979)

Como podemos ver na Tabela 2, as subespécies *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* distinguem-se pela inabilidade da última em produzir amônia a partir de arginina, uma vez que não possui a enzima arginina deaminase (MARSHAL, 1987). A subespécie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetilactis* distingue-se da *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* pelo fato de a primeira possuir um plasmídeo que a permite produzir diacetil a partir de citrato.

3.6- SORO E PERMEADO DE SORO

O soro é um subproduto da indústria queijeira. A fabricação de um quilo de queijo produz, em média, 8,5 kg de soro (VIOTTO, 1993). Dados de 1995 mostram que a produção mundial de soro é da ordem de 40 milhões de toneladas (TEJAYADI & CHERYAN, 1995). A maior parte do soro produzido no Brasil é doce (VIOTTO, 1993), cuja composição é mostrada na Tabela 3.

Tabela 3: Composição do soro doce

componente	porcentagem
sólidos totais	6,5
lactose	4,9
proteína (N × 6,38)	0,8
ácido láctico	0,1-0,2
cinzas	0,5

Fonte: HARPER & SEIBERLING (1976)

O soro é um dos resíduos mais poluentes da indústria alimentícia, sendo muito perecível. Em 100 kg de soro temos cerca de 3,5 kg de Demanda Biológica de Oxigênio e 6,8 kg de Demanda Química de Oxigênio (VIOTTO, 1993).

Sendo o soro um meio rico em proteínas e lactose, algumas alternativas têm sido utilizadas pela indústria láctea para o seu reaproveitamento, entre elas o uso da ultrafiltração. A ultrafiltração (UF) do soro separa as proteínas, que ficam retidas no concentrado, da lactose e sais, que formam o permeado, como mostra a Tabela 4. Assim, as proteínas do soro, de grande valor nutritivo, são reaproveitadas, restando o permeado, um subproduto ainda com uma grande carga poluidora, o qual também pode ser reaproveitado como fonte de lactose e meio de fermentação.

Tabela 4: Composição do permeado de soro

amostra	peso (kg)	porcentagem do componente				
		sólidos totais	lactose	cinzas	nitrogênio total	NNP ^c
soro de Cottage	617	7.26	4.7	0.612	0.145	0.051
concentrado A ^a	308	8.88	5.5	0.657	0.238	0.058
permeado A	308	5.75	3.8	0.570	0.047	0.040
concentrado B ^b	51	22.36	11.5	0.970	1.320	0.188
permeado B	566	6.00	4.0	0.582	0.040	0.038

^a após 50% de volume reduzido

^b após 90% do volume reduzido

^c NNP - nitrogênio-não-proteico

Fonte: MC DONOUGH *et alli* (1971)

3.6.1- Utilização do permeado de soro para a fermentação

Tendo o permeado um grande teor de lactose, além de minerais e vitaminas (MOULIN & GALZY, 1984), ele pode ser utilizado para a extração da lactose ou como meio de fermentação (ZADOW, 1984). Neste último caso, a lactose seria utilizada como fonte de carbono, sendo necessário, ainda, um suplemento com uma fonte de nitrogênio. Várias pesquisas têm sido realizadas a fim de verificar o uso do soro e do permeado de soro como substrato para fermentação (em batelada ou contínua) de microrganismos para conversão da lactose em diversos produtos, como levedura de pão, galactose, etanol (MOULIN & GALZY, 1984) e, principalmente, ácido láctico por *Lactobacillus helveticus* (ROY *et alli*, 1986; ROY & GOULET, 1987; ROY *et alli*, 1987; AESCHLIMANN & STOCKAR, 1989; AMRANE & PRINGENT, 1994), além da utilização do permeado como meio de crescimento para fermento (CRISTOPHERSON & ZOTTOLA, 1989a; CRISTOPHERSON & ZOTTOLA, 1989b). Em várias destas pesquisas procurou-se determinar as condições ótimas de pH e temperatura, além da fonte de nitrogênio mais adequada e sua quantidade, tanto para a obtenção dos produtos como para a produção de biomassa (fermento).

AMRANE & PRINGENT (1993) compararam a produção de ácido pelo *Lactobacillus helveticus* em diferentes meios à base de soro: soro suplementado com extrato de levedura e

peptona, soro ultrafiltrado (permeado) e soro ultrafiltrado clarificado. Eles verificaram a necessidade de suplementar estes meios com uma fonte de nitrogênio para haver uma boa produção de ácido. No meio ultrafiltrado, a produção de ácido foi 20% menor que no soro.

AESCHLIMANN & STOCKAR (1990) verificaram o efeito da suplementação do permeado de soro com extrato de levedura, tanto na fermentação em batelada como na fermentação contínua, concluindo que a suplementação aumenta a concentração de ácido láctico. TIMMER & KROMKAMP (1994), também estudando a influência da suplementação do permeado de soro com extrato de levedura durante a fermentação do permeado por *Lactobacillus helveticus*, verificaram um aumento da biomassa com o aumento da concentração de extrato de levedura inicial.

CRISTOPHERSON & ZOTTOLA (1989a e 1989b) estudaram a utilização do permeado de soro e de leite desnatado reconstituído como meio de crescimento para a produção de fermento láctico, acompanhando o crescimento e a atividade de várias cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetilactis*, verificando que as culturas mantiveram-se estáveis após várias transferências no permeado, mantendo uma boa atividade acidificante e alta concentração celular, concluindo que o permeado de soro pode servir como meio para crescimento de fermento.

3.6.2- Utilização de bioreatores acoplados a membranas

Ao acoplar uma unidade de ultrafiltração ou microfiltração a um bioreator, permite-se a integração da fermentação e das etapas de separação, mantendo, simultaneamente, uma alta concentração celular e removendo, continuamente, o produto do fermentador (TEJAYADI & CHERYAN, 1995). Com a remoção do produto inibidor, é possível atingir uma maior concentração celular porque as células estão continuamente recebendo novos nutrientes e o produto está sendo retirado. Esse processo de fermentação pode ter um vasto potencial quando é desejada uma alta concentração celular para poder alcançar altas taxas do produto metabólico final ou quando é desejada uma alta concentração celular para extração de produtos intracelulares ou produção de fermento (CRESPO *et alli*, 1992).

Segundo MAUBOIS (1991), os subprodutos do leite e seus derivados obtidos por ultrafiltração e microfiltração, como o permeado do soro, são excelentes substratos para fermentação, sendo a lactose convertida em inúmeros produtos de interesse da indústria. Pode-se aumentar a produtividade destas fermentações através da associação da unidade de fermentação com uma unidade de ultrafiltração ou microfiltração. De acordo com BOYAVAL & CORRE (1987), esse modelo é adequado para a produção de ácido a partir da lactose porque separa o ácido produzido das bactérias, não prejudicando o metabolismo destas e obtendo maiores taxas de produtividade.

Vários estudos foram realizados utilizando permeado de soro como substrato para fermentação, acoplando a membrana a um bioreator: produção de ácido láctico por *Lactobacillus helveticus* (BOYAVAL *et alli*, 1987; TIMMER & KROMKAMP, 1994) e por *Lactobacillus bulgaricus* (MEHAIA & CHERYAN, 1986; TEJAYADI & CHERYAN, 1995) e produção de ácido propiônico por *Propionibacterium acidi-propionici* (BOYAVAL & CORRE, 1987; COLOBAN *et alli*, 1993). Em alguns destes estudos (MEHAIA & CHERYAN, 1986; BOYAVAL & CORRE, 1987; BOYAVAL *et alli*, 1987; TIMMER & KROMKAMP, 1994) os autores observaram um aumento de produtividade em relação à fermentação sem a utilização das membranas.

Outros estudos foram realizados para a produção de biomassa a partir de soro (BLANC & GOMA, 1989; BOYAVAL *et alli*, 1992) e permeado de soro (PRINGENT *et alli*, 1988; TEJAYADI & CHERYAN, 1988), também acoplando uma membrana a um-bioreator.

3.7- FERMENTO CONCENTRADO

Tradicionalmente, a preparação do fermento requer uma série de etapas de propagação para a obtenção de grandes quantidades de fermento. Primeiramente, a cultura-estoque, a qual é preparada em condições assépticas, é transferida para a cultura-mãe (um volume maior também preparado em laboratório sob condições assépticas). A cultura-mãe é, então, inoculada no fermento intermediário (que tem, aproximadamente, 100 vezes o volume da cultura-mãe), o qual, por sua vez, irá ser inoculado no fermento industrial.

Por exemplo, processar 10.000 litros de leite em queijo, por dia, com 2% de inóculo, iria requerer a seguinte propagação (TAMINE, 1990):

cultura-estoque	→	cultura-mãe	→	fermento intermediário	→	tanque
0,4 ml		40 ml		4 litros		200 litros

Essa preparação do fermento industrial requer tempo, operadores, além de estar sujeita a contaminação por bacteriófagos. Para minimizar este problema, muitas pesquisas têm sido feitas nesta área para preservar e concentrar o fermento, visando eliminar estas etapas de subcultura (TAMINE, 1990).

As primeiras culturas concentradas foram comercializadas na década de 60, congeladas em nitrogênio líquido. Essas culturas eram crescidas, neutralizadas, concentradas por centrifugação e rapidamente congeladas em nitrogênio, sendo comercializadas em latas colocadas em caixas com gelo seco. Foi na década de 70 que começaram a ser produzidas e comercializadas culturas que podiam ser inoculadas diretamente no tanque de coagulação, por conter uma altíssima concentração de células (WIGLEY, 1977).

No método tradicional, o fermento intermediário contém, em média, 10^9 células/ml, sendo inoculado no tanque na concentração de 0,5 a 5%, ficando este com aproximadamente 10^7 células/ml. Com a concentração do fermento pode se atingir uma altíssima concentração de células, por volta de 10^{11} células/ml, podendo este fermento concentrado ser inoculado diretamente no tanque de fermentação ou no tanque de coagulação (Figura 3). Este fermento concentrado pode ser comercializado tanto na forma congelada como na forma liofilizada, ficando os laticínios livres da produção do fermento, economizando custos de investimento, energia, espaço e trabalho, embora o custo do fermento pronto seja elevado (DELBEKE, 1985). Este fermento é produzido, atualmente, para a fabricação de vários tipos de queijos. Já no começo dos anos 80 havia, aproximadamente, 200 fábricas de queijo (a maioria pequenas) nos Estados Unidos usando fermento concentrado de uma única marca (DELBEKE, 1985).

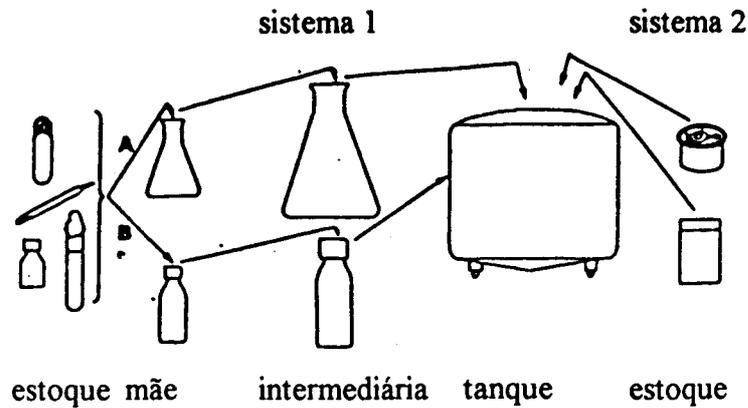


Figura 3- Sistemas de preparação de cultura. Sistema 1: a cultura-estoque pode ser líquida, liofilizada ou congelada a -196°C . Sistema 2: a cultura-estoque pode ser liofilizada ou concentrada e congelada a -196°C . Fonte: TAMINE (1990)

2.7.1-Produção de fermento concentrado

A concentração do fermento pode ser feita por centrifugação, difusão ou ultrafiltração, tendo-se como meta a obtenção da maior taxa de sobrevivência possível junto com a manutenção de uma alta atividade da cultura. A taxa de sobrevivência da cultura depende das condições de processamento (meio de crescimento, presença de compostos criogênicos, liofilização e secagem) e do método de concentração celular. Para concentrar as células por centrifugação, pode-se fazer uma neutralização contínua do meio de crescimento, mantendo o pH por volta de 5,8-6,0, produzindo, desta forma, uma cultura com um grande número de células. Neste caso, a formação de lactato pode ser inibitória e a ação mecânica pode causar algum dano físico às células. Pelas técnicas de difusão de cultura e ultrafiltração pode-se atingir 10^{11} ultrafiltração c ml^{-1} , removendo-se o lactato do meio de crescimento (TAMINE, 1990) e concentrando a biomassa. Segundo PRINGENT *et alli* (1988), o processo de difusão apresenta restrições impostas pelo tamanho da unidade de difusão, sendo o processo de ultrafiltração adequado para este fim.

BOYAVAL *et alli* (1992) realizaram um estudo com dois fermentadores sucessivos, cada um deles acoplado a uma membrana de ultrafiltração. No primeiro fermentador, eles colocaram soro e *Lactobacillus acidophilus*. Com a ultrafiltração deste meio, eles obtiveram a concentração de *L.acidophilus* e o permeado foi utilizado para alimentar o segundo

fermentador, no qual colocaram *Bifidobacterium bifidum*, sendo este microrganismo também concentrado por ultrafiltração. Os autores mostram a possibilidade de obter-se fermento concentrado usando a ultrafiltração.

PRINGENT *et alli* (1988) estudaram a produção de fermento concentrado através da concentração de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* acoplando fermentação contínua e ultrafiltração, chegando a uma concentração de, aproximadamente, 6.10^{10} células/ml. Eles observaram mudanças morfológicas e redução do comprimento das células com o aumento da concentração celular. Observaram, também, um maior período de latência na produção de ácido (medido pelo pH) com o aumento da concentração celular.

TEJAYADI & CHERYAN (1988) também fizeram um estudo sobre o uso da ultrafiltração na concentração de *Lactobacillus bulgaricus* para a produção de fermento concentrado a partir da fermentação de permeado de soro, concluindo que este método é adequado para a concentração de bactérias. Testando diversas velocidades e pressões, eles concluem que a combinação de baixa pressão com alta velocidade gera um maior fluxo de permeado. Observaram, também, uma diminuição do fluxo com o aumento da concentração, atribuindo este fenômeno ao aumento de viscosidade. Verificaram que o permeado de soro, quando fermentado, contribui significativamente no "fouling" da membrana. De acordo com CRESPO *et alli* (1992), as características do meio filtrante não permanecem as mesmas durante o processo de fermentação.

Segundo PRINGENT *et alli* (1988), muitos estudos são necessários para estimar os parâmetros críticos na produção de fermento concentrado por ultrafiltração ou microfiltração, como tipo de bomba, pressão transmembrana, porosidade da membrana, influência da morfologia da bactéria no "fouling" e no perfil de permeação.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- MATERIAIS

4.1.1- Equipamentos

- Unidade piloto de ultrafiltração marca ALFA LAVAL, modelo UFS-1, utilizada com cartucho de UF marca ROMICON de fibras capilares de polissulfona, com peso molecular de corte de 50.000 daltons, modelo H15-43-PM50, com área de 1,4 m², 635 mm de comprimento e 1,1 mm de diâmetro interno da fibra;
- Unidade de bancada de ultrafiltração marca TECH SEP acoplada a uma bomba helicoidal marca WEG, modelo 90-S-390, de 1150 rpm, utilizada com cartuchos de UF e MF marca CARBOSEP, tubulares, com suporte poroso de carbono revestidos internamente com uma película de 30 µm de óxido de zirconila, com 40 cm de comprimento e 6 mm de diâmetro interno e 10 mm de diâmetro externo, correspondendo a uma área de 75 cm²; modelos M6, M9 e M8 (de pesos nominais moleculares de corte de 0,08 µm, 300.000 daltons e 50.000 daltons, respectivamente);
- estufa BOD marca FANEM, modelo 347 F;
- banho-maria bacteriológico marca FANEM modelo 100
- banho-maria marca FANEM, modelo 102/6;
- fluxo laminar vertical marca VECO;
- microscópio ótico binocular marca CARLZEISS modelo Standard
- mufla marca FORLABO, temperatura até 1200°C;
- estufa de secagem e esterilização marca FANEM modelo 315 SE;
- digestor de proteínas para micro Kjehdal marca SARGE Aparelhos Científicos Ltda. modelo 40-25;
- destilador de nitrogênio marca TECNAL, modelo TE 036;
- potenciômetro portátil marca WTW modelo PH 320.

Os demais equipamentos utilizados são os comuns de laboratório.

4.1.2- Microrganismo

O microrganismo utilizado foi a bactéria *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 1996, obtida no laboratório de Microbiologia do Departamento de Tecnologia - FEA. A atividade da cultura em leite foi mantida por repicagens semanais em número de 8 repiques, retornando a cultura congelada.

4.1.3- Meio de manutenção

Como meio de manutenção da bactéria foi utilizado o leite desnatado em pó reconstituído a 11% de sólidos, marca Molico, Nestlé.

4.1.4- Meio de crescimento

O permeado de soro foi utilizado como meio de crescimento das bactérias, sendo obtido a partir da ultrafiltração de soro de queijo parmesão. A ultrafiltração foi realizada na unidade-piloto utilizando membranas de fibras capilares Romicon (item 4.1.1), com peso molecular de corte de 50.000 daltons. A pressão de entrada foi de 1,7 kgf / cm² e a pressão de saída de 0,7 kgf / cm², a 50°C. Foram ultrafiltrados 2 lotes de soro de queijo parmesão distintos, chamados de meio 1 e meio 2, os quais foram congelados.

4.2- MÉTODOS

4.2.1- Etapas dos processamentos

Os processamentos realizados seguiram o seguinte fluxograma (Figura 4), sendo compostos de duas etapas principais: a etapa de fermentação e a etapa de ultrafiltração.

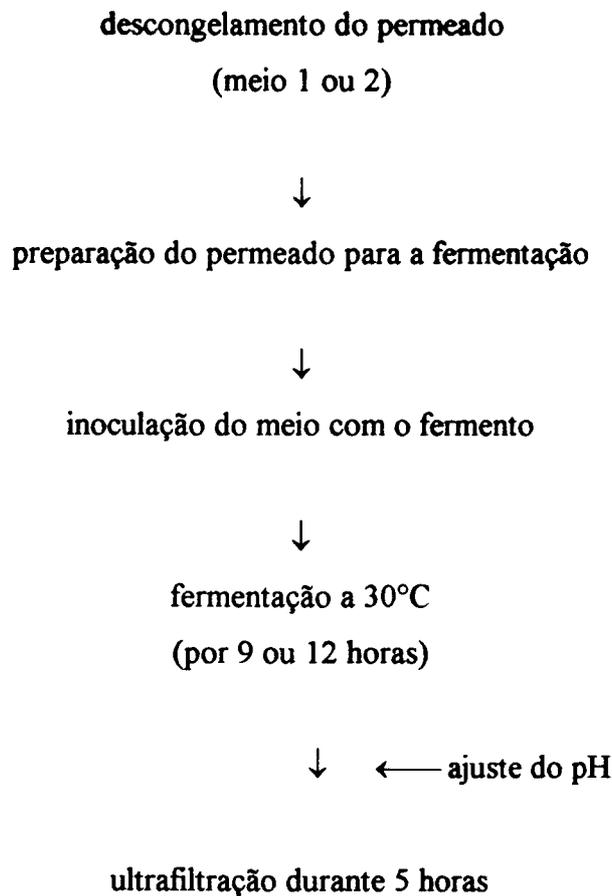


figura 4- Fluxograma dos processamentos realizados

4.2.1.1- Preparação do meio de crescimento para a fermentação

A cada processamento, o meio de crescimento (permeado de soro) era descongelado e suplementado (com 0,5% de extrato de levedura e 0,5% de peptona). A seguir, acidificado (pH 5,1), aquecido a 90°C por 30 minutos para induzir a precipitação de algumas proteínas, filtrado em papel de filtro, neutralizado (pH ajustado para 6,5) e pasteurizado (63°C por 30 minutos), estando pronto para ser inoculado com o fermento.

4.2.1.2- Inoculação e fermentação do meio de crescimento

Para cada processamento foi inoculado 10^2 células/ml de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (fermento) em 1 litro de meio de crescimento em um erlenmeyer de 1 litro. Após a inoculação, o material foi incubado a 30°C (fermentação estática) por 9 ou 12 horas. No final da fermentação, eram colhidas amostras para avaliação do número de células, pH e atividade do fermento.

4.2.1.3- Ajuste do pH

Em alguns processamentos (mostrados nas tabelas 1 a 16 do anexo), o meio foi acidificado (com ácido clorídrico 1N) para atingir pH 5,7 ou neutralizado (com NaOH 1N) para atingir pH 6,5 antes da ultrafiltração.

4.2.1.4- Ultrafiltração

A ultrafiltração foi realizada na unidade de bancada com membranas tubulares Carbosep, com 75 cm² de área, sendo utilizadas membranas com diferentes tamanhos de poro, variando conforme o processamento: 0,08 µm, 300.000 daltons e 50.000 daltons. Antes de iniciar a UF, foi realizada a assepsia das membranas procedendo-se uma limpeza com 100 ppm de hipoclorito de sódio por 15 minutos a 2 bars, seguido de enxágüe com água estéril, restando um volume morto de 220 ml. Cada ultrafiltração foi realizada durante 5 horas, exceto nos casos onde o volume inicial esgotou-se antes de 5 horas de ultrafiltração, à temperatura ambiente e pressão de 2 bars, considerando-se o tempo zero o momento em que o equipamento era ligado. As ultrafiltrações foram realizadas para concentrar o fermento, sendo o retentado recirculado de volta ao recipiente de alimentação e o permeado retirado.

Durante a ultrafiltração, foram feitas as seguintes medidas: volume de permeado retirado, pH, número de células viáveis e atividade do fermento. A medida do permeado foi realizada durante toda a ultrafiltração, pesando-se o permeado retirado a cada 3 minutos durante a primeira hora e a cada 5 minutos nas demais 4 horas. Ao final de cada hora de

ultrafiltração, eram retiradas amostras do permeado e do concentrado destinadas às análises de pH, número de células viáveis e atividade do fermento. As análises de pH foram executadas imediatamente e as amostras destinadas ao controle de número de células viáveis foram mantidas na geladeira a 4°C até o final das 5 horas de ultrafiltração e então executado o plaqueamento. A atividade do fermento foi medida através de amostras do concentrado retiradas após duas horas de ultrafiltração e após quatro horas de ultrafiltração.

Logo após o término da ultrafiltração, foi feito um enxágüe com água em todo o equipamento. Para restabelecer o fluxo original, a membrana foi lavada de acordo com o seguinte procedimento (segundo o manual do fabricante): lavagem com hidróxido de sódio 0,2N por 30 minutos a 80°C seguido de enxágüe até a neutralidade; lavagem com ácido nítrico (5 ml de ácido concentrado por litro) por 30 minutos a 55°C seguido de enxágüe até a neutralidade; lavagem com hipoclorito de sódio (300 ppm) por 30 minutos a 50°C seguido de enxágüe até a neutralidade.

4.2.2- Condições dos processamentos realizados

4.2.2.1- Taxa de permeação dos meios 1 e 2 sem fermentar

Os processamentos 1 e 2 foram realizados a fim de verificar as taxas de permeação dos meios 1 e 2. Estes processamentos foram realizados com a membrana de 300.000 daltons, à pressão de 2 bars e temperatura ambiente, como mostra a tabela 5.

Tabela 5: Condições dos processamentos nos quais foi medida a taxa de permeação dos meios 1 e 2 sem fermentar (processamentos 1 e 2)

processamento	membrana	horas de fermentação	pH inicial da UF	meio de fermentação
1	300.000 daltons	sem fermentar	6,5	1
2	300.000 daltons	sem fermentar	6,5	2

4.2.2.2- Processamentos para a avaliação dos parâmetros

Foram realizados 12 processamentos diferentes mostrados na tabela 6.

Tabela 6: Condições dos processamentos realizados para a avaliação de parâmetros

processamento	membrana	horas de fermentação	pH inicial da UF	meio de fermentação
3	0,08 μm	12	5,7	1
4	300.000 daltons	12	5,7	1
5	50.000 daltons	12	5,7	1
6	0,08 μm	12	6,5	1
7	300.000 daltons	12	6,5	1
8	50.000 daltons	12	6,5	1
9	300.000 daltons	9	5,7	1
10	300.000 daltons	9	6,5	1
11	300.000 daltons	12	6,5	2
12	300.000 daltons	12	6,5	2
13	300.000 daltons	9	5,7	2
14	300.000 daltons	9	6,5	2

Como podemos ver pela tabela 6, os processamentos 3 a 14 variam em 4 pontos:

- a) membrana utilizada: 0,08 μm , 300.000 daltons ou 50.000 daltons;
- b) pH inicial da ultrafiltração: 5,7 ou 6,5;
- c) número de horas de fermentação: 9 ou 12 horas;
- d) meio utilizado: meio 1 ou meio 2.

4.2.2.3- Processamentos com pH estável

Os processamentos 15 e 16 foram realizados com pH mantido em torno de 6,0 ($\pm 0,5$), realizados com o meio 2. Nestes processamentos, o meio foi neutralizado para pH 6,5 após 12

horas de fermentação e ultrafiltrados com a membrana de 300.000 daltons, temperatura ambiente e pressão de 2 bars. A variação do pH foi medida com um potenciômetro e o pH mantido em torno de 6,0 por gotejamento manual de soda com uma bureta. No processamento 15 foi utilizada soda 1N nas duas primeiras horas e 2N no restante da UF; no processamento 16 foi utilizada soda 2N durante todo o processamento. As condições destes processamentos são mostradas na tabela 7.

Tabela 7: Condições dos processamentos nos quais o pH da ultrafiltração foi mantido estável em torno de 6,0 (processamentos 15 e 16)

processamento	membrana	horas de fermentação	pH inicial da UF	meio de fermentação
15	300.000 daltons	12	6,5	2
16	300.000 daltons	12	6,5	2

4.2.3- Medidas dos parâmetros

4.2.3.1- Medida da vazão, fluxo (J_p) e fator de concentração volumétrica (F_{cv}) durante a ultrafiltração

A partir dos dados de permeado retirado, foi calculada a vazão (l / h), a qual é dada pela massa de permeado (g) \times 0,06 / tempo (min). Então, calculou-se o fluxo (J_p), dividindo a vazão (l / h) pela área da membrana (m²). A partir da medida do fluxo, foi traçada a curva de permeação: fluxo de permeado \times tempo. O fator de concentração (F_{cv}) foi calculado através da divisão do volume inicial total pelo volume do concentrado (calculado pelo volume total - peso do permeado extraído, considerando-se 1ml = 1g) (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1981)

4.2.3.2- Avaliação do número de células viáveis e análise microscópica das colônias

O número de células viáveis foi determinado através do método de plaqueamento em profundidade em meio ágar MRS (Oxoid), usando-se diluições seriadas com água peptonada 0,1% e incubação a 30°C (VANDERZANT & SPLITTSTOESSER, 1992). As contagens foram feitas após 48 e 72 horas.

As análises microscópicas das colônias foram realizadas através da observação de lâminas coradas por coloração de gram (VANDERZANT & SPLITTSTOESSER, 1992).

4.2.3.3- Cálculo da concentração de células iniciais da ultrafiltração

Ao final da assepsia da membrana de ultrafiltração, restava um volume morto de 220 ml constituído de água estéril, a qual diluiu o meio fermentado colocado no recipiente de alimentação do equipamento de ultrafiltração. Foi necessário, portanto, recalcular o número de células iniciais da ultrafiltração, provenientes de amostras coletadas do erlenmeyer de fermentação, multiplicando-se o valor encontrado das amostras por 1,22.

4.2.3.4- Medida da atividade do fermento

A atividade do fermento foi realizada adicionando-se 1 ml do fermento a 99 ml de leite em pó reconstituído a 11% e pasteurizado por 30 minutos a 63°C, sendo as garrafas de leite pré-incubadas em um banho a 30°C por 30 minutos antes da adição do fermento. A incubação (leite + fermento) foi feita a 30°C e a determinação da acidificação produzida (°D) medida por titulação com soda N/9 com indicador fenoftaleína (MARTINS, 1976). Os tempos de incubação foram: zero horas (medida da acidez do leite + fermento) e 6 horas (Δ 6). Todas as medidas foram feitas em duplicata.

4.2.4 Análises físico-químicas do meio de crescimento

A composição do meio de crescimento foi determinada conforme as análises abaixo, realizadas em triplicata.

Açúcares Redutores Totais: realizada de acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz (1976), o qual está baseado na precipitação quantitativa do óxido cuproso da solução de Fehling pela ação redutora do açúcar

Proteína Total: Método Kjeldahl (AOAC, 1984)

NNP: Semelhante ao método descrito para proteína total, com anterior precipitação com TCA (ácido tricloroacético) e filtração. A seguir, procede-se com o filtrado como acima (Método Kjeldahl) (AOAC, 1984)

Cinzas: realizada de acordo com as normas do Laboratório Nacional de Referência Animal (1981), o qual utiliza incineração na mufla a 500-550°C

Sólidos Totais: realizada de acordo com as normas do Laboratório Nacional de Referência Animal (1981), o qual utiliza secagem na estufa a 105°C

pH: Medida da concentração de íons hidrogênio através do potenciômetro (AOAC, 1984).

Acidez: realizada de acordo com as normas do Laboratório Nacional de Referência Animal (1981), o qual utiliza neutralização com hidróxido de sódio N/ 9 (soda Dornic) com o indicador fenoftaleína

5-RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- COMPOSIÇÃO DO PERMEADO DE SORO UTILIZADO COMO MEIO DE FERMENTAÇÃO

O microrganismo *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* foi crescido em permeado de soro de queijo parmesão. Foram preparados dois lotes de permeado de queijo parmesão distintos, processado nas mesmas condições, chamados de meio 1 e meio 2.

Quando o permeado foi autoclavado sem nenhum tratamento, apareceram grumos após 12 horas de fermentação. Esse permeado com grumos, durante a UF, apresentou uma baixíssima taxa de permeação. Este problema de precipitação de proteínas durante a esterilização também foi encontrado por outros autores (CHAMPAGNE *et alli*, 1991; NORTON *et alli*, 1993; ZAYED & WINTER, 1995). Para contornar o problema, o permeado foi submetido a um tratamento (item 4.2.1.1), a fim de poder ser utilizado como meio para a fermentação sem o aparecimento de grumos, podendo ser, então, ultrafiltrado.

A Tabela 8 mostra a composição dos meios 1 e 2 após o tratamento por eles sofrido, prontos para serem utilizados como meio de fermentação. Como podemos observar na Tabela 8, os dois meios têm composições diferentes, sendo que esta diferença provavelmente interfere nos processos de fermentação e ultrafiltração. ROY *et alli* (1987) encontraram diferentes valores de crescimento específico (μ) de *Lactobacillus helveticus* em dois lotes comerciais distintos de soro de queijo tipo cheddar em pó, atribuindo esta diferença à diferente composição dos meios.

Tabela 8: Composição do permeado de soro de queijo parmesão utilizado como meio de crescimento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

componente	meio 1	meio 2
NNP (%)	0,18	0,18
nitrogênio total (%)	0,23	0,28
sólidos totais (%)	5,00	4,57
cinzas (%)	0,46	0,36
açúcares redutores totais (%)*	4,37	4,51
pH	6,55	6,50
acidez (°D)	10,2	12,8

* utilizando solução de lactose como padrão

A grande quantidade de nitrogênio nos meios 1 e 2 é causada pela suplementação destes meios com extrato de levedura e peptona. A porcentagem de nitrogênio total e nitrogênio não proteico no meio 2 sem suplementação é de 0,05% e 0,07%, respectivamente. RAUCORT *et alli* (1989), utilizando permeado de soro doce de queijo suplementado com 1% de extrato de levedura autolisado, acharam 0,56 % de nitrogênio total no meio.

5.2- CRESCIMENTO DE *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NOS MEIOS 1 E 2

Os meios 1 e 2 foram inoculados com 10^2 ufc/ml de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e foi feita uma curva de crescimento em cada um dos meios. A Figura 5 mostra a comparação do crescimento do microrganismo e o valor do pH nesses dois meios.

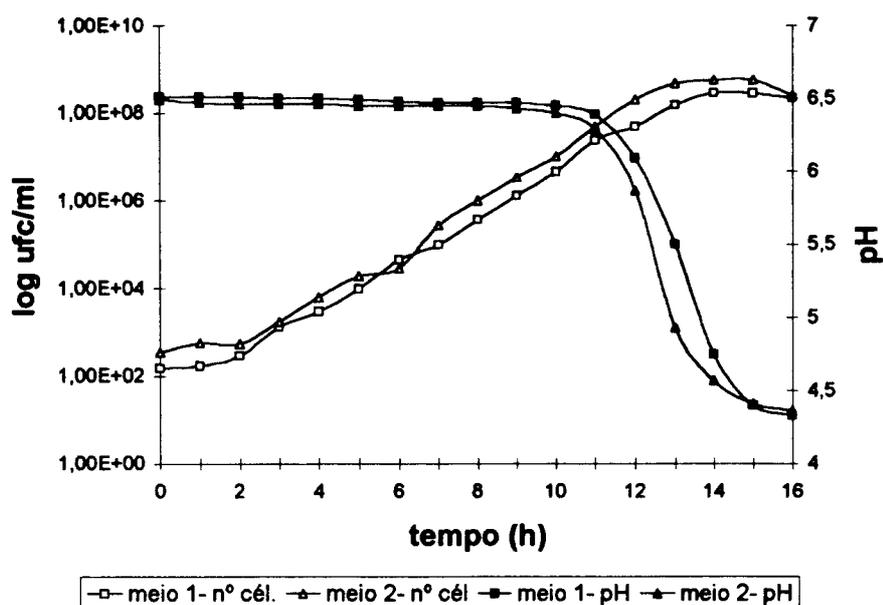


Figura 5- Curvas de crescimento do *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* nos meios 1 e 2 (permeado de soro de queijo suplementado) e variação do pH durante o crescimento

Como podemos observar na Figura 5, o microrganismo em estudo apresentou um crescimento semelhante nos meios 1 e 2, alcançando o final da fase logarítmica em torno de 12 a 13 horas, com uma concentração máxima de células de 10⁸ ufc/ml. Verificamos que, ao final de 9 horas de fermentação, o pH encontra-se em torno de 6,5 e ao final de 12 horas de fermentação o pH encontra-se em torno de 5,7. Logo, nos processamentos com 9 horas de fermentação e pH inicial da UF 5,7 foi necessário abaixar o pH do meio fermentado com ácido clorídrico 1N e nos processamentos com 12 horas de fermentação e pH inicial da UF 6,5 foi necessário aumentar o pH com hidróxido de sódio 1N.

5.3- TAXA DE PERMEACÃO DOS MEIOS 1 E 2

Os meios 1 e 2 foram ultrafiltrados em uma membrana de 300.000 daltons sem serem fermentados, para averiguar qual era a taxa de permeação destes meios (processamentos 1 e 2, item 4.2.2.1), como mostra a Figura 6 abaixo. Pela Figura 6 podemos observar que o meio 1

apresentou uma taxa de permeação ligeiramente maior em relação ao meio 2 durante as primeiras 2 horas de UF; nas outras horas subseqüentes de UF a taxa de permeação do meio 2 foi maior que a do meio 1. Vemos também que a queda de fluxo durante a UF é bastante lenta nos dois casos. A vazão (g/min) do meio 1 variou de 5,8 (inicial) até 4,3 (final), correspondendo a uma variação de fluxo ($l/h/m^2$) 46,4 a 34,4 e a vazão do meio 2 variou de 6,0 (inicial) a 4,4 (final), correspondendo a uma variação de fluxo ($l/h/m^2$) de 48,0 a 35,2.

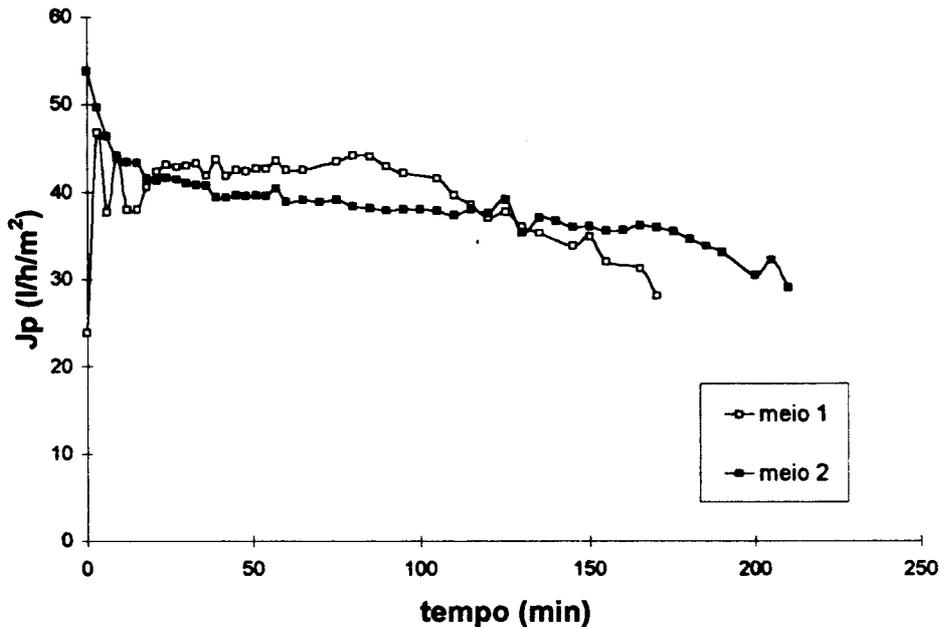


Figura 6- Curvas de permeação da UF dos meios 1 e 2 sem fermentar, utilizando a membrana de 300.000 daltons, pressão 2 bars e temperatura ambiente

O fluxo da água neste equipamento com a membrana utilizada é de, aproximadamente, $200 l/h/m^2$. Apesar de o fluxo dos meios ser baixo quando comparado ao fluxo de água pura, ele é alto quando comparado ao fluxo obtido com o permeado fermentado. Nos processamentos com o meio fermentado, o fluxo final chega a, aproximadamente, $6,4 l/h/m^2$.

5.4- VARIAÇÃO DO FLUXO

Foram realizados um total de 16 processamentos diferentes, nos quais foram utilizados 3 membranas de porosidade diferentes (0,08 μm , 300.000 daltons e 50.000 daltons), 2 pHs iniciais da UF diferentes (5,7 e 6,5), 2 concentrações celulares iniciais da UF diferentes (10^6 ufc/ml e 10^8 uf/ml) e 2 lotes de permeado de soro distintos (meio 1 e meio 2) como mostram as tabelas 5, 6 e 7 (itens 4.2.2.1, 4.2.2.2. e 4.2.2.3). O planejamento dos processamentos foi realizado a fim de poder ser estudada a influência de cada um desses fatores durante a UF. Os resultados dos processamentos são mostrados no anexo, detalhadamente.

Percebe-se que, em todos os processamentos, o fluxo diminuiu ao longo do tempo de UF. O perfil da taxa de permeação durante os diversos processamentos foi semelhante, porém ocorreu uma variação de acordo com as características próprias de cada processamento. Com base nesses dados, foi feito um estudo da influência de cada um dos seguintes parâmetros na taxa de permeação: porosidade da membrana, pH inicial da UF, meio de fermentação utilizado e concentração celular inicial da UF.

Foi observado que, ao longo dos processamentos, pode ocorrer, ocasionalmente, entrada de ar na mangueira do permeado, provocando, durante alguns minutos, a diminuição na quantidade de permeado retirado.

5.4.1- Influência da porosidade da membrana no fluxo

Os processamentos 3, 4 e 5 e os processamentos 6, 7 e 8 foram delineados para verificar se a porosidade da membrana influencia a taxa de permeação. Eles foram realizados com todas as condições iniciais mantidas iguais, diferindo somente na membrana utilizada, como mostra a Tabela 9.

Tabela 9: Influência da porosidade da membrana na taxa de permeação durante a UF do permeado de soro suplementado e fermentado por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

processamento	membrana utilizada	pH inicial da UF	total de permeado retirado	pH final da UF
3	0,08 μm	5,7	649 ml	4,20
4	300.000 d	5,7	657 ml	4,20
5	50.000 d	5,7	614 ml	4,25
6	0,08 μm	6,5	755 ml	4,15
7	300.000 d	6,5	478 ml	4,26
8	50.000 d	6,5	764 ml	-

- dado não obtido

Com base nos dados da Tabela 9 e analisando o perfil de permeação dos processamentos 3, 4 e 5 (Figura 7), vemos que o fluxo variou um pouco entre os processamentos nos primeiros trinta minutos de UF, comportando-se de maneira bastante similar no restante do tempo, indicando que nos primeiros 30 minutos foi formada a camada secundária de células, a qual passou a ser o fator preponderante na taxa de permeação durante a UF. A Figura 8 mostra o total de permeado retirado ao longo da UF nestes 3 processamentos.

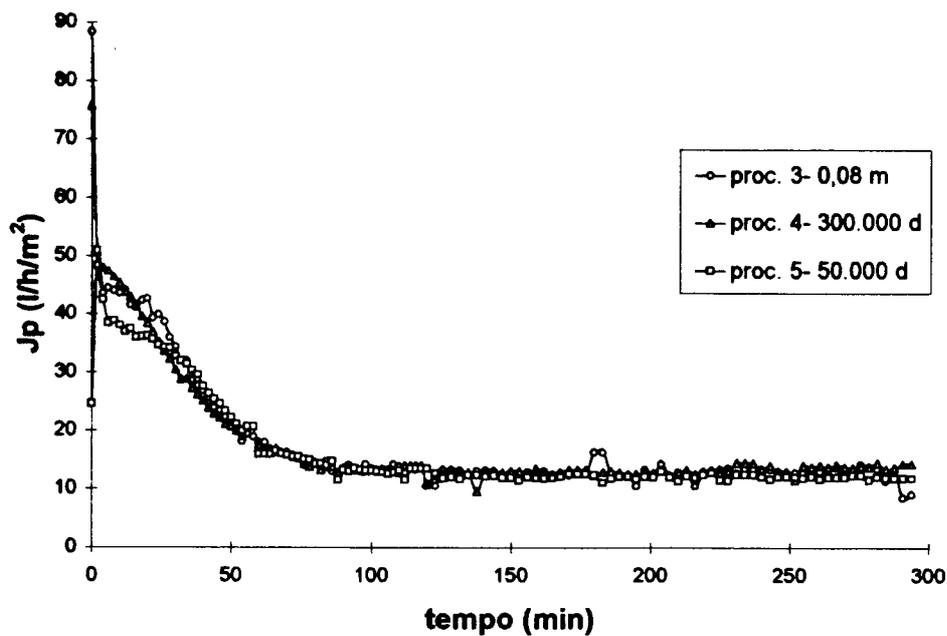


Figura 7- Curvas de permeação da UF de permeado de soro suplementado e fermentado por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* nos processamentos 3, 4 e 5 (utilizando as membranas de 0,08 μm , 300.000 d e 50.000 d, respectivamente)

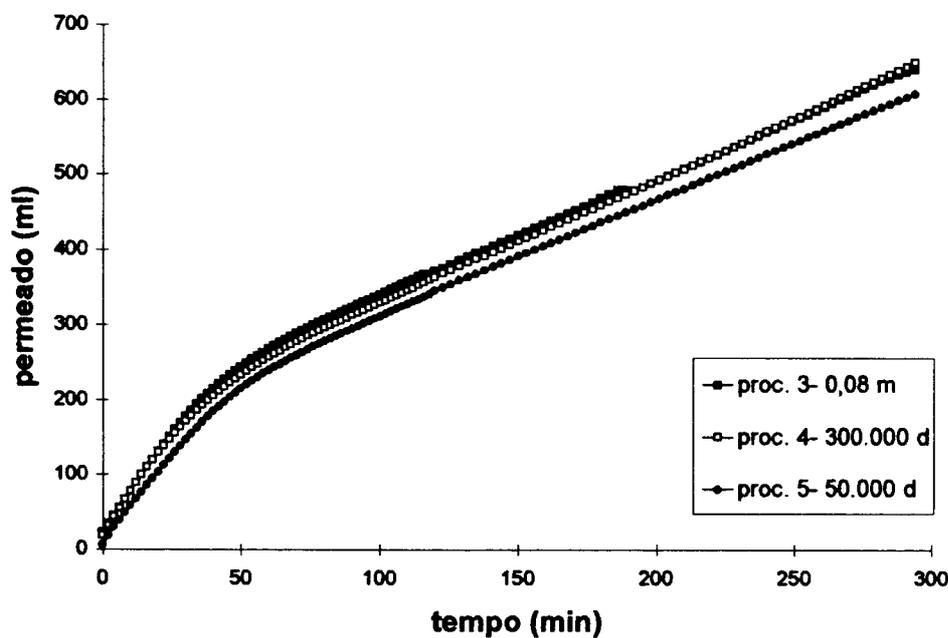


Figura 8- Volume de permeado retirado ao longo da UF de permeado de soro suplementado e fermentado por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* durante os processamentos 3, 4 e 5 (utilizando as membranas de 0,08 μm , 300.000 d e 50.000 d, respectivamente)

Analisando os dados dos processamentos 6, 7 e 8, mostrados na Tabela 9 e na Figura 9, vemos que os processamentos 6 e 8 foram bastante similares, com um perfil de permeação semelhante, mais uma vez indicando-nos que a porosidade da membrana não é um fator determinante na taxa de permeação. Ainda pela Figura 9, podemos observar que o processamento 7 destoou dos demais, tendo uma taxa de permeação muito baixa, gerando um perfil de permeação diferente dos processamentos 6 e 8. Como este resultado não era esperado, este processamento foi repetido 2 vezes, porém utilizando o meio 2 como substrato para a fermentação (Figura 25). A Figura 10 mostra o total de permeado retirado ao longo da UF nestes 3 processamentos.

MERIN *et alli* (1983a) e LE & ATKINSON (1985), utilizando a microfiltração para concentrar microrganismos, observaram diferenças na taxa de permeação para membranas de diferentes porosidades. MERIN *et alli* (1983a), ao analisar a concentração de bactérias em salmoura de queijo por microfiltração utilizando membranas de poro 0,2 μm , 0,65 μm , 0,8 μm e 1,2 μm , observaram um aumento do fluxo com o aumento da porosidade da membrana, com exceção da membrana de 0,2 μm , a qual apresentou um fluxo maior que o fluxo da membrana de 0,65 μm . LE & ATKINSON (1985), ao comparar o fluxo de *Erwinia carotovora* através de 3 membranas de porosidades diferentes – 0,2 μm , 0,45 μm e 0,6 μm – observaram um maior fluxo com a membrana de 0,45 μm , seguido da membrana de 0,6 μm e da membrana de 0,2 μm , concluindo que o desempenho de membranas de diferentes porosidades não pode ser previsto, precisando ser testado para cada caso.

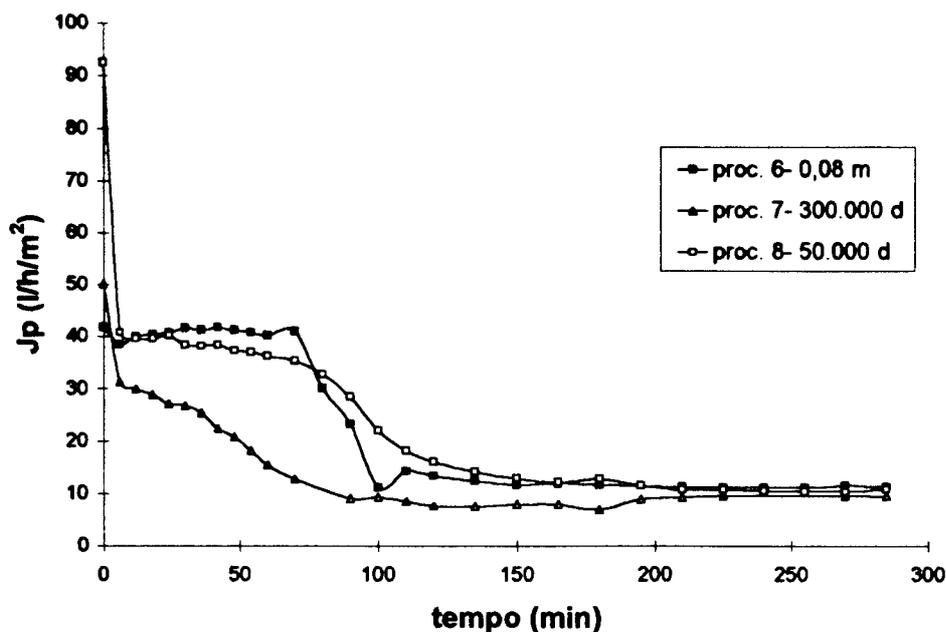


Figura 9- Curvas de permeação da UF de permeado de soro suplementado e fermentado por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* nos processamentos 6, 7 e 8 (utilizando as membranas de 0,08 µm, 300.000 d e 50.000 d, respectivamente)

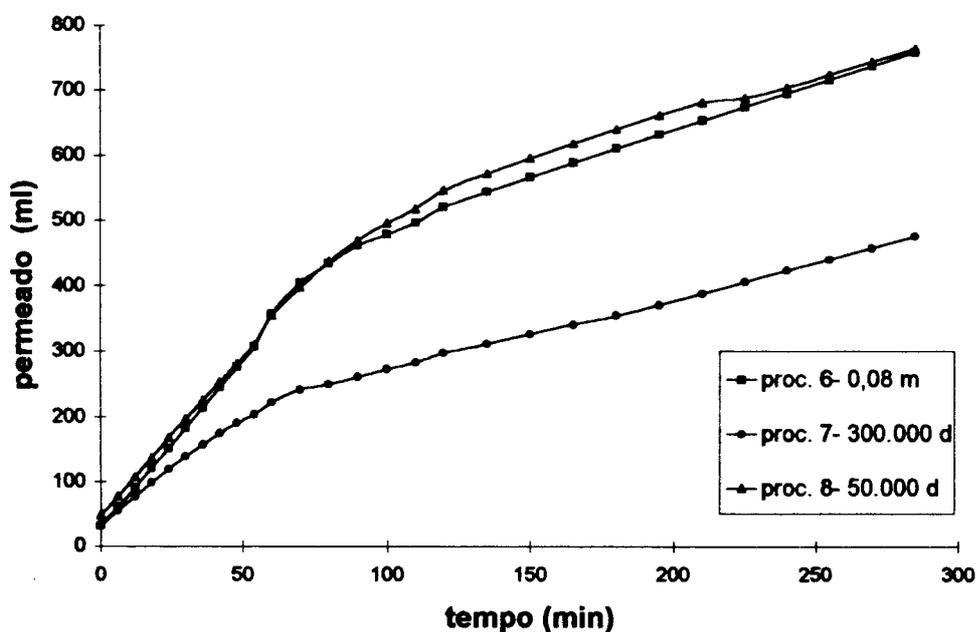


Figura 10- Volume de permeado retirado durante a UF de permeado de soro suplementado e fermentado por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* nos processamentos 6, 7 e 8 (utilizando as membranas de 0,08 µm, 300.000 d e 50.000 d, respectivamente)

5.4.2- Influência do pH no fluxo

Para a avaliação da influência do pH na taxa de permeação, foram realizados pares de processamentos com todas as condições iniciais iguais, diferindo somente no pH inicial da UF. Os resultados destes processamentos estão mostrados juntos na Tabela 10.

Tabela 10: Influência do pH inicial da UF na taxa de permeação durante a UF de permeado de soro suplementado e fermentado por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

processamento	membrana	pH inicial da UF	meio utilizado	horas de fermentação	fluxo médio de permeação	total de permeado retirado
3	0,08 μm	5,7	1	12	17,3 l/h/m ²	649 (ml)
6	0,08 μm	6,5	1	12	20,2 l/h/m ²	755 (ml)
4	300.00 d	5,7	1	12	17,5 l/h/m ²	657 (ml)
7	300.000 d	6,5	1	12	12,7 l/h/m ²	478 (ml)
5	50.000 d	5,7	1	12	16,3 l/h/m ²	613 (ml)
8	50.000 d	6,5	1	12	20,4 l/h/m ²	764 (ml)
9	300.000 d	5,7	1	9	19,8 l/h/m ²	743 (ml)
10	300.000 d	6,5	1	9	28,2 l/h/m ²	1060 (ml)
13	300.000 d	5,7	2	9	12,5 l/h/m ²	469 (ml)
14	300.000 d	6,5	2	9	18,3 l/h/m ²	687 (ml)

Comparando-se, pela Tabela 10, os pares de processamento 3/6, 4/7, 5/8, 9/10 e 13/14, que diferem entre si somente no valor do pH inicial da UF, vemos claramente que nos processamentos onde o pH inicial da UF era maior, obteve-se uma maior quantidade de permeado, sendo o processamento 7 uma exceção.

Acompanhando a variação de pH ao longo da UF, podemos perceber que, nos processamentos onde ocorreu um declínio mais lento do pH (processamentos onde o pH inicial da UF é mais alto), o fluxo também demora mais a declinar, como mostram as Figuras 11 a 16, indicando-nos que, para a manutenção de uma alta taxa de permeação, é essencial que o pH

permaneça alto. Vemos que esta relação também ocorre com o par de processamentos 13/14 (Figuras 17 e 18). Os processamentos 13 e 14 são repetições dos processamentos 9 e 10, respectivamente, sendo que os primeiros (processamentos 13 e 14) foram realizados com o meio 2 e os últimos (processamentos 9 e 10) com o meio 1. Na avaliação da influência do pH na taxa de permeação, a repetição com o meio 2 foi importante, vindo a corroborar as conclusões obtidas com o par 9/10.

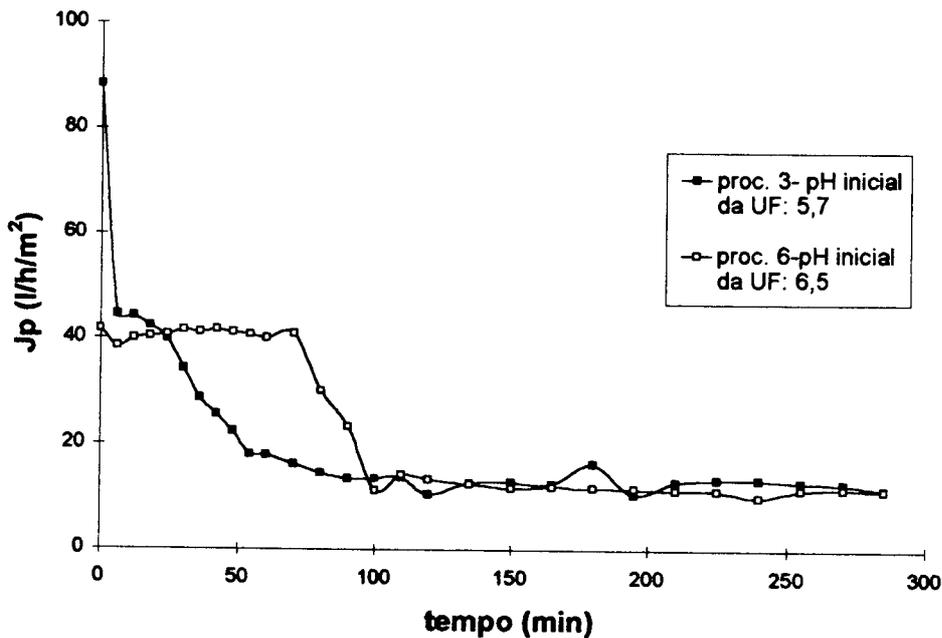


Figura 11- Curvas de permeação da UF de permeado de soro suplementado e fermentado por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* nos processamentos 3 e 6 (pH inicial da UF 5,7 e 6,5, respectivamente)

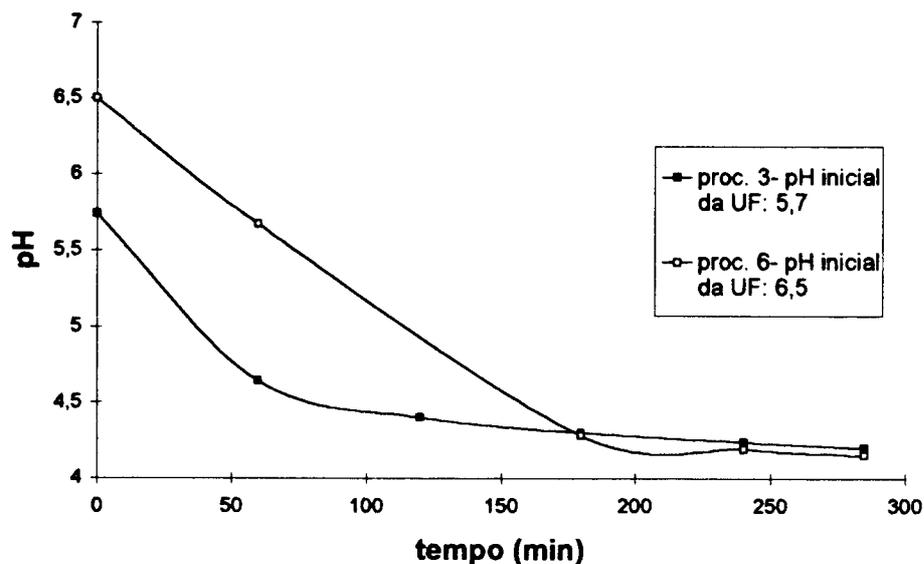


Figura 12- Variação do pH ao longo da UF de permeado de soro suplementado e fermentado por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* nos processamentos 3 e 6 (pH inicial da UF 5,7 e 6,5, respectivamente)

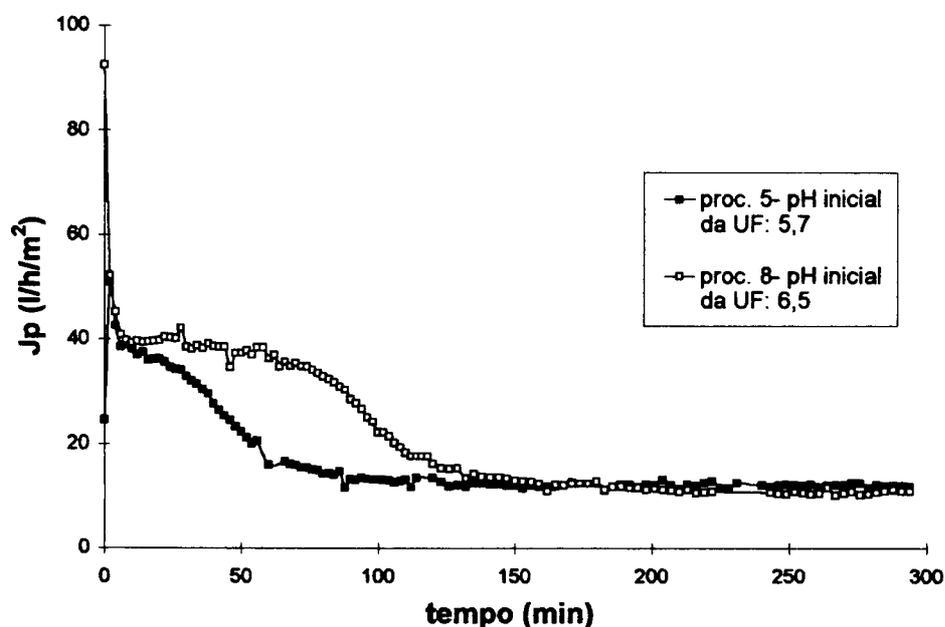


Figura 13- Curvas de permeação da UF de permeado de soro suplementado e fermentado por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* nos processamentos 5 e 8 (pH inicial da UF 5,7 e 6,5, respectivamente)

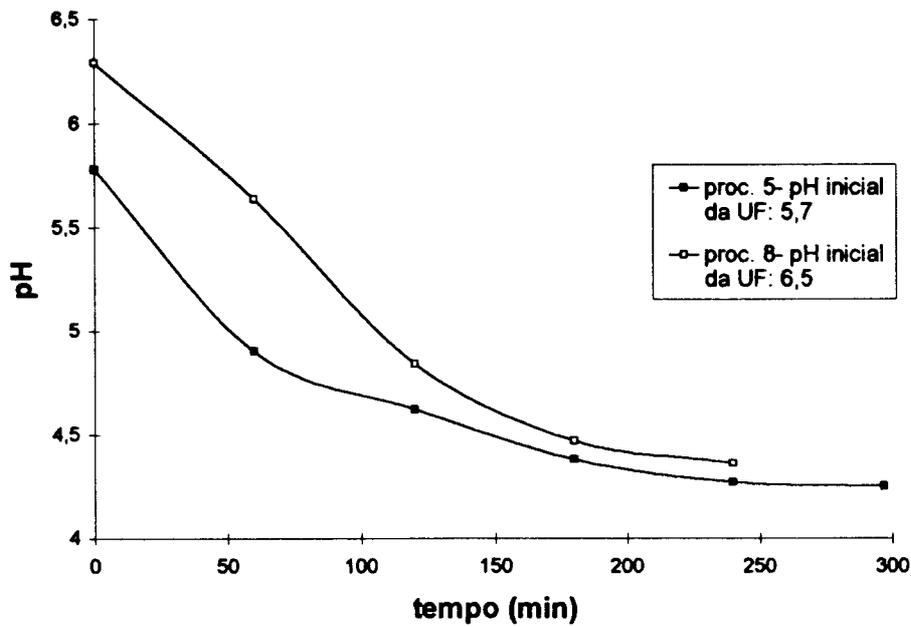


Figura 14- Variação do pH ao longo da UF de permeado de soro suplementado e fermentado por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* nos processamentos 5 e 8 (pH inicial da UF 5,7 e 6,5, respectivamente)

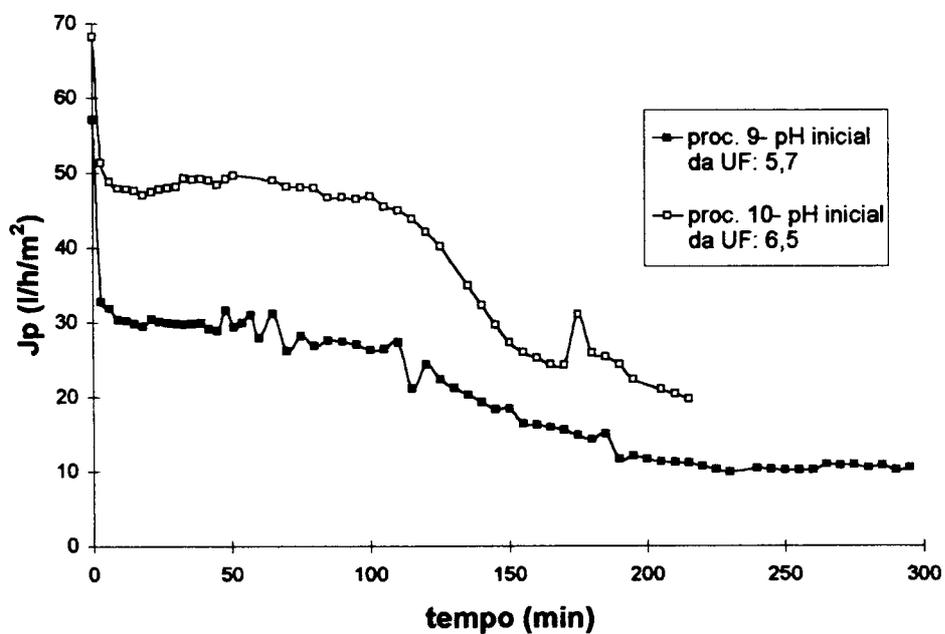


Figura 15- Curvas de permeação da UF de permeado de soro suplementado e fermentado por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* nos processamentos 9 e 10 (pH inicial da UF 5,7 e 6,5, respectivamente)

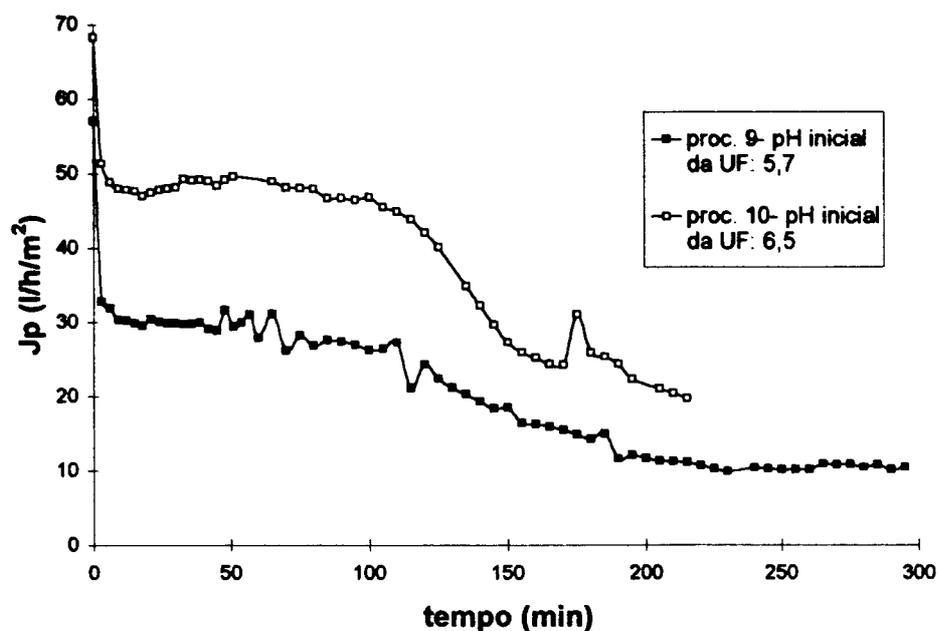


Figura 16- Variação do pH ao longo da UF de permeado de soro suplementado e fermentado por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* nos processamentos 9 e 10 (pH inicial da UF 5,7 e 6,5, respectivamente)

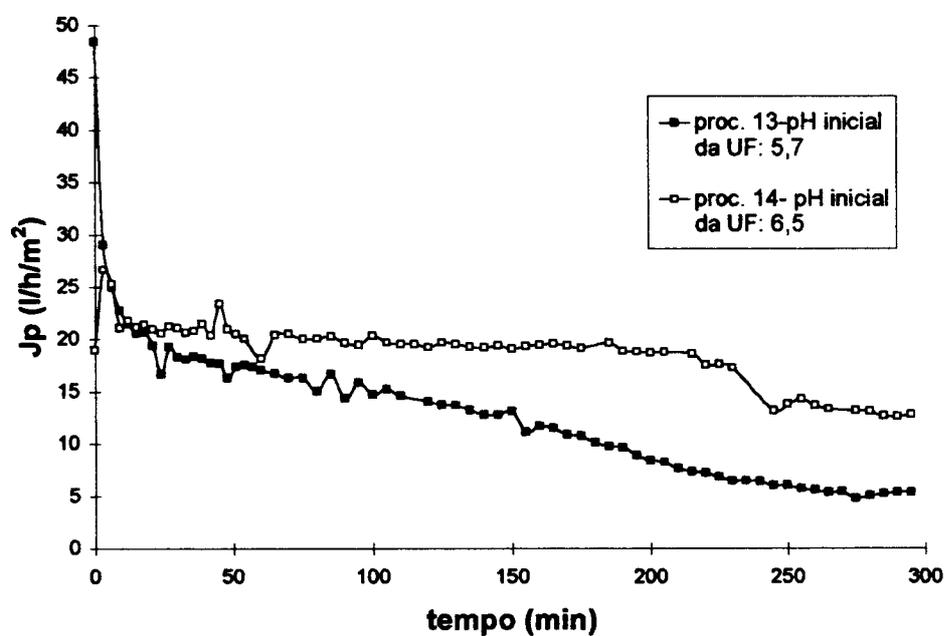


Figura 17- Curvas de permeação da UF de permeado de soro suplementado e fermentado por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* nos processamentos 13 e 14 (pH inicial da UF 5,7 e 6,5, respectivamente)

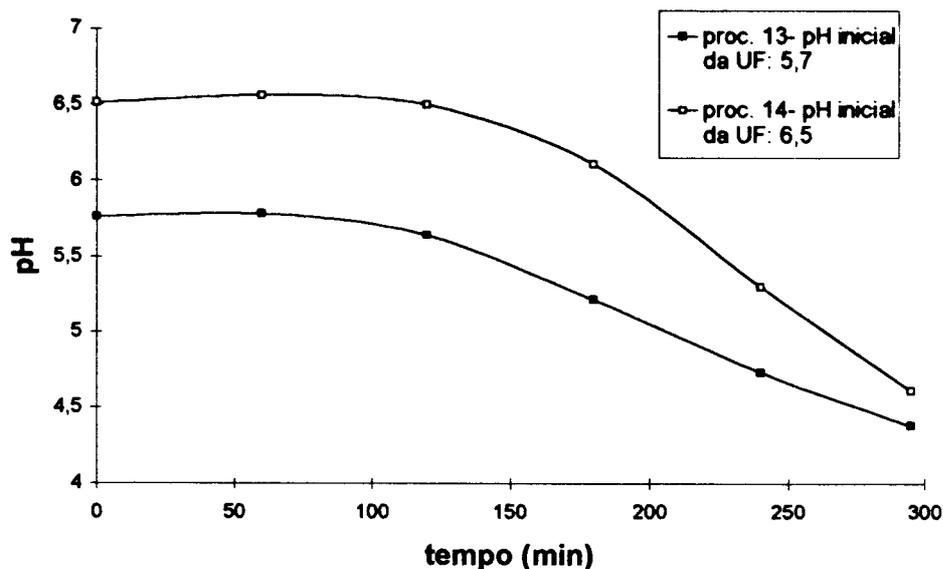


Figura 18- Variação do pH ao longo da UF de permeado de soro suplementado e fermentado por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* nos processamentos 13 e 14 (pH inicial da UF 5,7 e 6,5, respectivamente)

5.4.3- Influência do número de células iniciais no fluxo

Para avaliar a influência da concentração de células inicial na UF, alguns processamentos foram realizados com o meio após 12 horas de fermentação e outros foram realizados após 9 horas de fermentação. Nos processamentos com 12 horas de fermentação, a concentração celular do meio fermentado no início da UF encontrava-se em torno de $1,3 \cdot 10^8$ ufc/ml, enquanto nos processamentos realizados após 9 horas de fermentação, a concentração celular inicial encontrava-se em torno de $2,8 \cdot 10^6$ ufc/ml. A Tabela 11 abaixo mostra grupos de processamentos que se diferenciam somente pelo número de horas de fermentação, mantendo todas as outras condições iniciais iguais.

Tabela 11: Influência da concentração inicial de células no fluxo de permeação durante a UF de permeado de soro suplementado e fermentado por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

processamento	pH inicial	meio utilizado	horas de fermentação	n° de células inicial	total de permeado retirado
4	5,7	1	12	$3,1 \cdot 10^8$	657 ml
9	5,7	1	9	$3,0 \cdot 10^6$	743 ml
7	6,5	1	12	$1,0 \cdot 10^8$	478 ml
10	6,5	1	9	$1,5 \cdot 10^6$	1060 ml
11	6,5	2	12	$1,0 \cdot 10^8$	382 ml
12	6,5	2	12	$1,6 \cdot 10^8$	435 ml
14	6,5	2	9	$1,4 \cdot 10^7$	687 ml

Ao compararmos, diretamente, os processamentos que só se diferenciam pelas horas de fermentação (Tabela 11), percebemos que nos processamentos com 9 horas de fermentação, nos quais a concentração celular é menor, o total de permeado retirado foi maior se comparado aos processamentos realizados após 12 horas de fermentação, onde a concentração celular é maior. TANNY *et alli* (1980) chegaram à mesma conclusão ao estudar a concentração de bactérias patogênicas por microfiltração. Ao testar duas concentrações iniciais diferentes de *E. coli*: 10^8 cel/ml e 10^9 cel/ml, eles observaram que uma maior concentração celular levou à diminuição do fluxo. TEJAYADI & CHERYAN (1988), estudando a UF de *Lactobacillus bulgaricus* crescidos em permeado de soro suplementado com extrato de levedura, também observaram um declínio do fluxo com o aumento da concentração celular, atribuindo esta diminuição no fluxo ao aumento de viscosidade do meio, à medida que vai ocorrendo a concentração. LE & ATKINSON (1985) também observaram uma diminuição do fluxo com o aumento da concentração celular.

Analisando as curvas de permeação dos processamentos 4/ 9 e 11/12/ 14 (Figuras 19 e 21, respectivamente), vemos que o perfil de permeação é diferente com 9 horas de fermentação e com 12 horas de fermentação. Com 9 horas de fermentação, o fluxo caiu mais devagar, mantendo-se estável por mais tempo, e com 12 horas de fermentação, o fluxo caiu mais rápido. Se olharmos também a variação do pH (Figuras 20 e 22), vemos que o pH cai mais devagar nos processamentos com 9 horas de fermentação. Essa queda mais lenta do pH

foi devida ao menor número de células; conseqüentemente, menos ácido foi produzido. Assim, com a queda mais lenta do pH, o fluxo também demora mais a declinar, como já discutido anteriormente (item 5.4.2). Mais uma vez vemos que a comparação dos processamentos realizados com o meio 2 entre si (processamentos 11, 12 e 14) corrobora a comparação dos processamentos realizados com o meio 1 (processamentos 4 e 9).

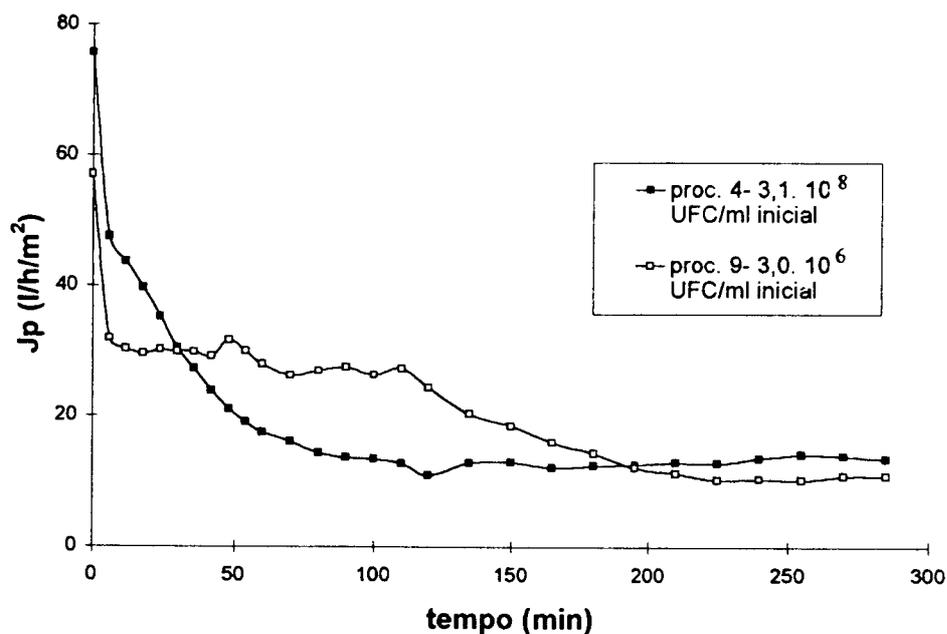


Figura 19- Curvas de permeação da UF de permeado de soro suplementado e fermentado por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* nos processamentos 4 e 9 (nº de células iniciais da UF $3,1 \cdot 10^8$ e $3,0 \cdot 10^6$, respectivamente)

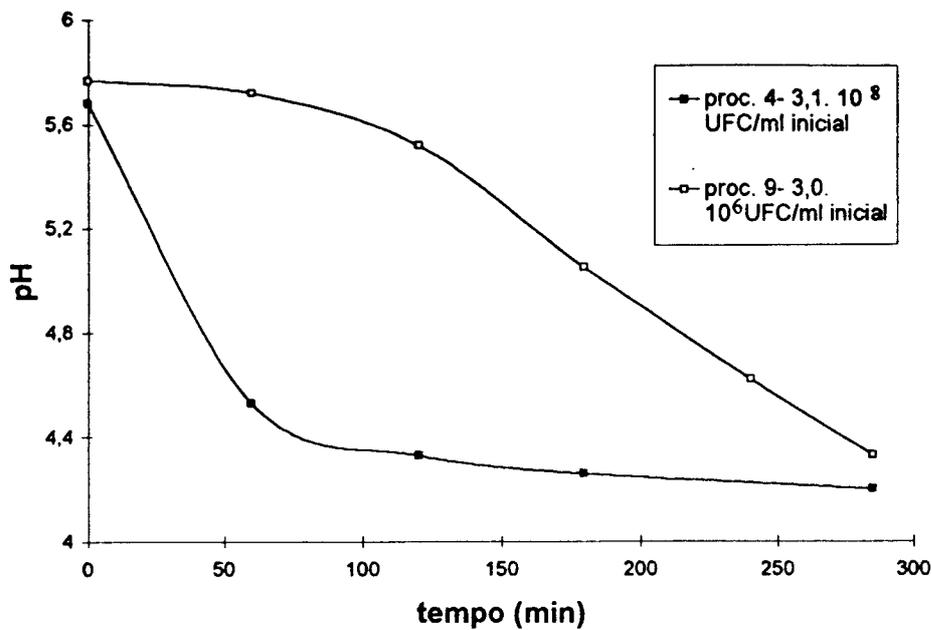


Figura 20- Variação do pH ao longo da UF de permeado de soro suplementado e fermentado por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* nos processamentos 4 e 9 (nº de células iniciais da UF $3,1 \cdot 10^8$ e $3,0 \cdot 10^6$, respectivamente)

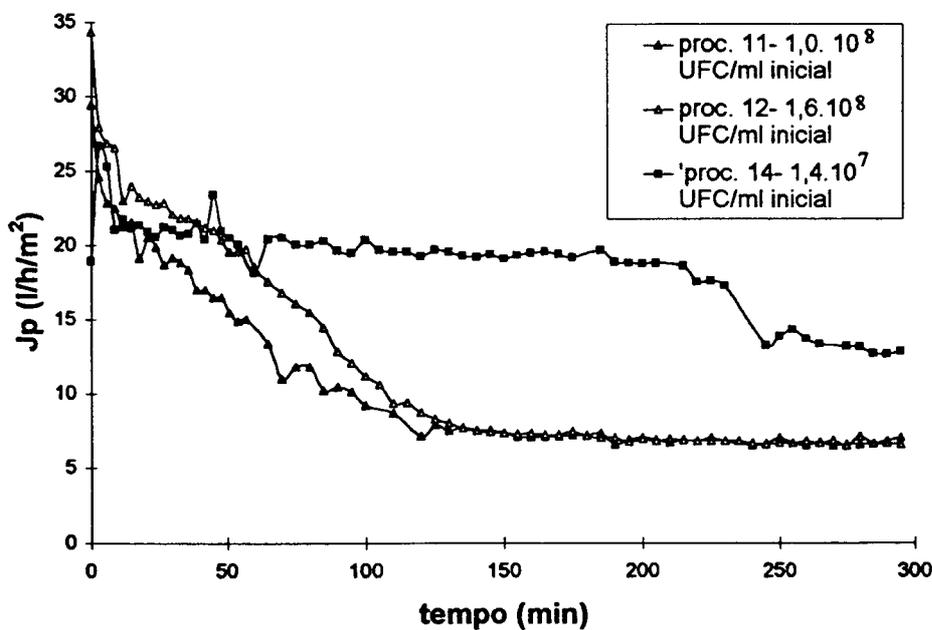


Figura 21- Curvas de permeação da UF de permeado de soro suplementado e fermentado por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* nos processamentos 11, 12 e 14 (nº de células iniciais da UF $1,0 \cdot 10^8$, $1,6 \cdot 10^8$ e $1,4 \cdot 10^7$, respectivamente)

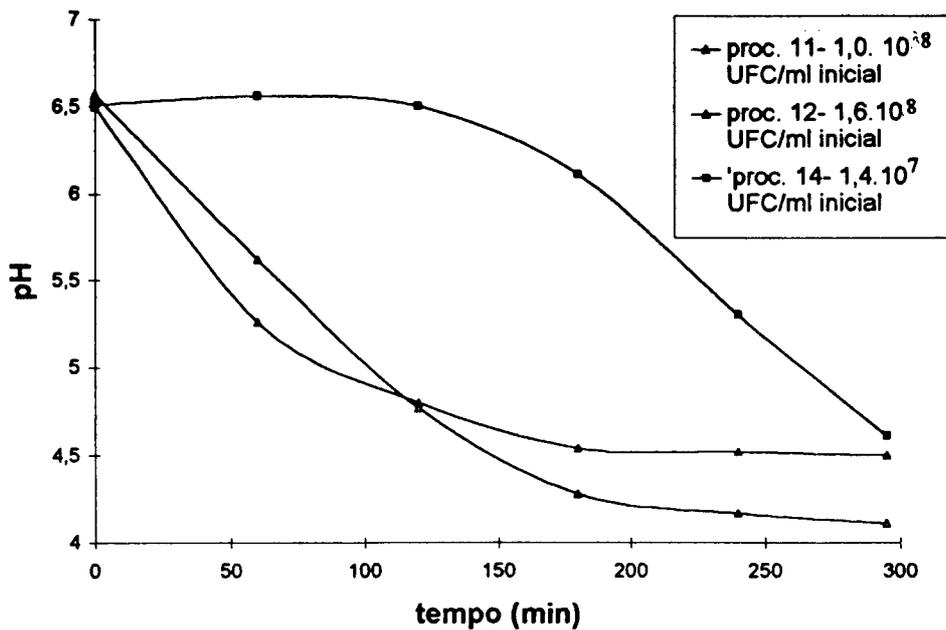


Figura 22- Variação do pH ao longo da UF de permeado de soro suplementado e fermentado por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* nos processamentos 11, 12 e 14 (nº de células iniciais da UF $1,0 \cdot 10^8$, $1,6 \cdot 10^8$ e $1,4 \cdot 10^7$, respectivamente)

Ao comparar os processamentos com 9 horas de fermentação com os processamentos com 12 horas de fermentação, concluímos que, tanto o menor número de células circulando, como o declínio mais lento do pH, devem contribuir para o aumento da taxa de permeação nos processamentos com 9 horas de fermentação.

5.4.4-Influência da composição do meio de fermentação no fluxo

Os processamentos 7, 9 e 10 foram repetidos utilizando o meio 2 como substrato para a fermentação. Para tal, foram mantidas todas as condições iniciais iguais, diferindo somente no meio utilizado. A Tabela 12 abaixo lista os resultados destes processamentos e suas repetições.

Tabela 12: Influência da composição do meio no fluxo de permeação durante a UF de permeado de soro suplementado e fermentado por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

processamento	meio utilizado	pH inicial da UF	horas de fermentação	total de permeado retirado	fluxo médio de permeado	pH final da UF
9	1	5,7	9	743 ml	19,8 l/h/m ²	4,33
13	2	5,7	9	469 ml	12,5 l/h/m ²	4,38
10	1	6,5	9	1060 ml	28,2 l/h/m ²	4,77
14	2	6,5	9	687 ml	18,3 l/h/m ²	4,61
7	1	6,5	12	478 ml	12,7 l/h/m ²	4,26
11	2	6,5	12	382 ml	10,2 l/h/m ²	4,50
12	2	6,5	12	435 ml	11,6 l/h/m ²	4,11

Como vemos na Tabela 12, os processamentos realizados com 9 horas de fermentação (processamentos 9 e 10) foram repetidos com o meio 2, chamados de processamentos 13 e 14, respectivamente.

Comparando os processamentos 9 e 13, vemos que no processamento 9, realizado com o meio 1, a taxa de permeação foi superior à do processamento 13, realizado com o meio 2. O mesmo ocorreu com os processamentos 10 e 14, realizados com os meios 1 e 2, respectivamente. O fluxo destes processamentos podem ser observados nas Figuras 23 e 24. Este resultado nos mostra que a utilização de meios com composições ligeiramente diferentes altera a taxa de permeação durante a UF. Vemos que, nestes casos, processamentos com o meio 1 levaram a uma maior taxa de permeação que processamentos com o meio 2.

É interessante notar como a UF mudou quando foram utilizados meios ligeiramente diferentes. Esse fato é de grande importância industrial, uma vez que, caso a indústria resolva trabalhar com permeado de soro como substrato, esses permeados provavelmente não serão exatamente iguais e, então, a indústria estará sujeita a diferentes condições de UF.

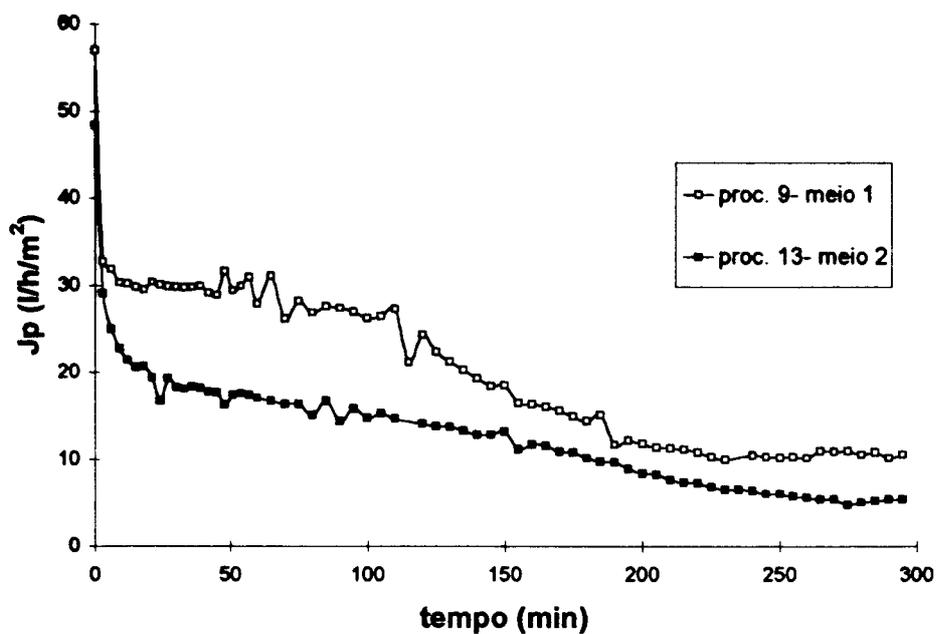


Figura 23- Curvas de permeação da UF de permeado de soro suplementado e fermentado por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* nos processamentos 9 e 13 (meio 1 e meio 2, respectivamente)

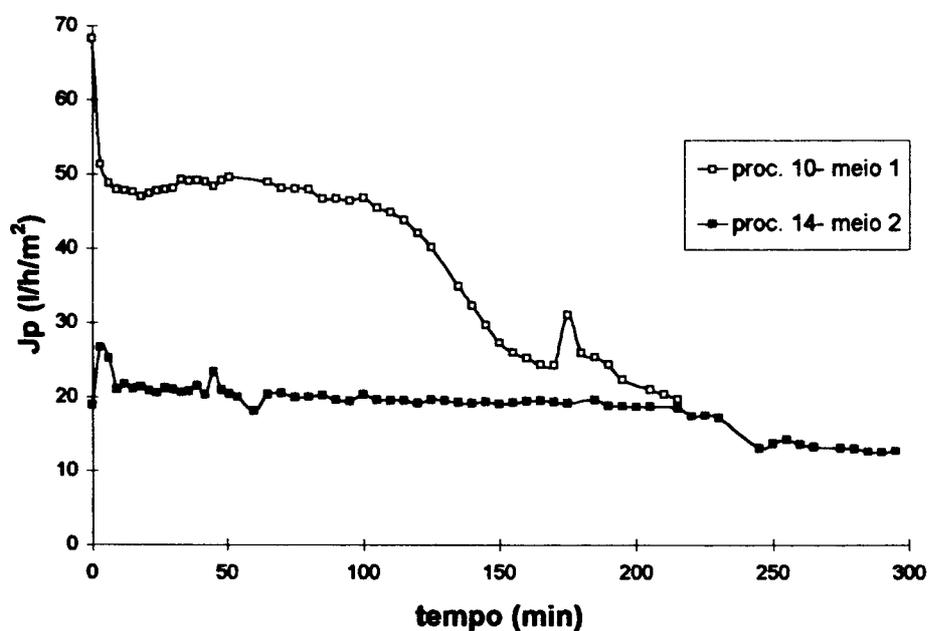


Figura 24- Curvas de permeação da UF de permeado de soro suplementado e fermentado por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* nos processamentos 10 e 14 (meio 1 e meio 2, respectivamente)

Comparando o processamento 7 realizado com o meio 1 com suas repetições realizadas com o meio 2 (processamentos 11 e 12) pela Figura 25, vemos que o processamento 7 teve uma taxa de permeação ligeiramente maior que os processamentos 11 e 12.

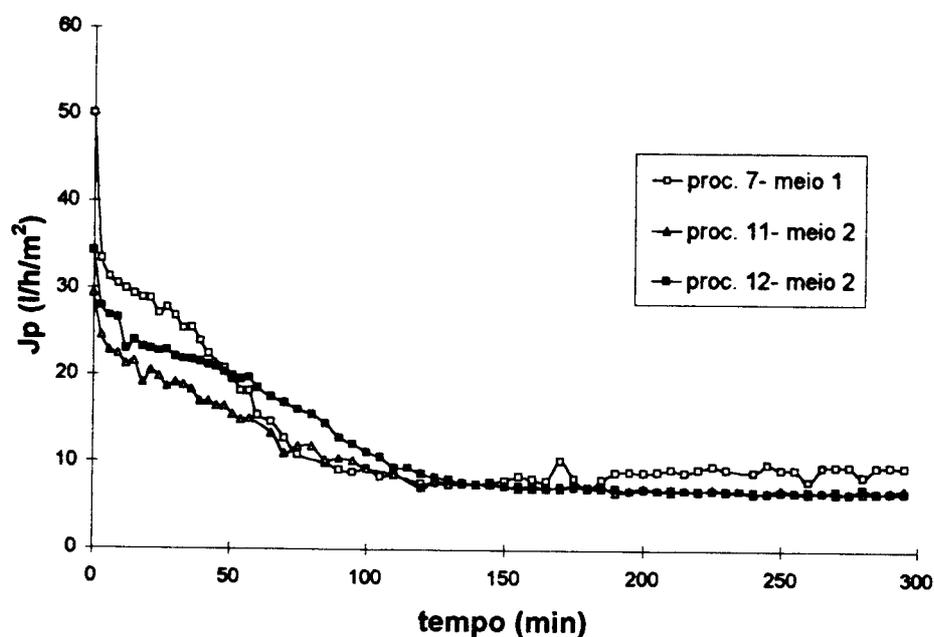


Figura 25- Curvas de permeação da UF de permeado de soro suplementado e fermentado por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* nos processamentos 7 (meio 1), 11 e 12 (meio 2)

Como mostra a Figura 25, vemos que a curva de permeação destes 3 processamentos é bem semelhante, diferentemente dos outros processamentos realizados com o meio 1 e suas repetições realizadas com o meio 2 (Figuras 23 e 24), nos quais houve uma grande diferença na taxa de permeação entre os processamentos realizados com o meio 1 e os realizados com o meio 2. Esperava-se, portanto, que a diferença de fluxo entre o processamento 7 e suas repetições realizadas com o meio 2 fosse maior.

5.5-VARIAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS AO LONGO DOS PROCESSAMENTOS

As membranas utilizadas foram eficazes como barreira para a passagem de células, embora tenha ocorrido a presença de células no permeado mesmo com a membrana de menor porosidade. A concentração celular média no retentado ficou em torno de 10^8 ufc/ml (Tabelas 3 a 16 do anexo). Quando foram utilizadas a membrana de $0,08 \mu\text{m}$ e a de 300.000 daltons, a concentração celular no permeado variou de processamento para processamento, desde 10^1 ufc/ml até 10^3 ufc/ml, ficando a média em torno de 10^2 ufc/ml. Quando foi utilizada a membrana de 50.000 daltons (processamentos 5 e 8), a concentração celular no permeado foi menor que com as outras membranas, não ultrapassando 71 ufc/ml (Tabelas 5 e 8 do anexo). MERIN *et alli* (1983b), ao estudar a concentração de bactérias em soro de queijo por microfiltração utilizando *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetilactis* e *Leuconostoc citrovorum* como inóculo na concentração de 10^4 ufc/ml, também observaram uma diferença da concentração de células no permeado de acordo com a porosidade da membrana utilizada., obtendo 10^3 ufc/ml no permeado com a membrana de $1,2 \mu\text{m}$, 10^2 ufc/ml no permeado com a membrana de $0,8 \mu\text{m}$ e 80 ufc/ml no permeado com a membrana de $0,45 \mu\text{m}$.

As células do concentrado, quando observadas diretamente sob o microscópio ótico, apresentaram-se normais, sem nenhum dano aparente.

As contagens foram realizadas após 48 e 72 horas de incubação. Verificou-se que 48 horas já era suficiente para que todas as colônias crescessem, não havendo um aumento de colônias de 48 para 72 horas. Durante a contagem das colônias nas placas, observou-se que a grande maioria das colônias eram colônias típicas do microrganismo, sendo brancas opacas, aparecendo no meio do ágar de forma arredondada ou alongada. Por vezes, apareciam algumas colônias atípicas, com algumas características diferentes, como colônias superficiais e grandes, colônias superficiais e rosadas, colônias de um branco leitoso ou branco translúcido. Algumas colônias típicas eram observadas no microscópio ótico e todas as colônias atípicas também. As colônias típicas apresentaram morfologia celular de cocos em cadeia. A observação microscópica das colônias atípicas mostrou que elas eram formadas por contaminantes como outras bactérias (como *Micrococcus* sp.) e leveduras, o que já era esperado, uma vez que o

equipamento de UF não era um sistema totalmente fechado que garantisse a assepsia completa do processo, sendo os processamentos realizados da maneira mais asséptica possível. Foi observado também a presença de contaminantes no retentado dos processamentos que mediram a taxa de permeação dos meios 1 e 2, nos quais foram utilizados os meios sem fermentação (processamentos 1 e 2).

Nos processamentos realizados não foi possível chegar a uma alta concentração celular, ficando o número de células variando em torno de uma média, 1.10^8 a 5.10^8 ufc/ml ao longo de 5 horas de UF, como mostra a Tabela 13. Como podemos ver por esta tabela, em alguns processamentos, chegou-se a alcançar uma concentração celular de 10^9 ufc/ml, sendo que esse patamar não foi mantido ao longo das horas, mostrando-nos que ocorreu morte celular durante a UF. O aumento da concentração celular leva a um aumento de viscosidade, com conseqüente diminuição do fluxo (TANNY *et alli*, 1980; KRONER *et alli*, 1984). Logo, o acúmulo de células mortas leva a diminuição do fluxo sem aumentar a viabilidade celular.

O pH da UF é um fator que pode ter provocado a morte celular. Ao longo da UF o valor do pH diminui devido ao metabolismo celular, chegando a alcançar valores em torno de 4,4. Vários artigos citam a manutenção do pH em torno de 5,5 a 6,0 como fundamental para a manutenção de uma alta concentração celular (GILLILAND, 1976; EFSTATHIOU *et alli*, 1975). Segundo ZAYED & WINTER (1995), a faixa ótima de pH do *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* é entre 6,0 e 6,5. Para comprovar se o pH no final da UF abaixo de 5,0 influenciou na concentração celular, foram realizados dois processamentos onde se manteve o pH em torno de 6,0 ($\pm 0,5$) durante a UF, chamados de processamentos 15 e 16. Como podemos ver na Tabela 13, o processamento 15 foi o único em que a concentração celular manteve-se estável em torno 10^9 ufc/ml durante toda a UF. O processamento 16, o qual foi uma repetição do processamento 15, alcançou a maior concentração atingida dentre todos os processamentos: $8,8. 10^9$ ufc/ml ao final de 5 horas de UF.

Tabela 13: Variação da concentração celular do retentado ao longo das 5 horas de UF de permeado de soro suplementado e fermentado por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* nos diversos processamentos

processamento	concentração celular no retentado					
	inicial	1ª hora	2ª hora	3ª hora	4ª hora	5ª hora
3	$1,9 \cdot 10^8$	$4,1 \cdot 10^8$	$4,5 \cdot 10^8$	$5,2 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^9$	-
4	$3,1 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^9$	$9,4 \cdot 10^8$	$5,1 \cdot 10^8$	$5,1 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^8$
5	$1,1 \cdot 10^8$	$3,2 \cdot 10^8$	$3,8 \cdot 10^8$	$5,7 \cdot 10^8$	$4,1 \cdot 10^8$	-
6	$1,6 \cdot 10^8$	$5,0 \cdot 10^8$	$9,5 \cdot 10^7$	$7,0 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^9$	$3,3 \cdot 10^8$
7	$1,0 \cdot 10^8$	$4,2 \cdot 10^8$	$1,9 \cdot 10^9$	$1,0 \cdot 10^9$	$4,9 \cdot 10^8$	$3,7 \cdot 10^8$
8	$1,8 \cdot 10^8$	$2,2 \cdot 10^8$	$1,6 \cdot 10^8$	$1,6 \cdot 10^8$	$3,4 \cdot 10^8$	$9,3 \cdot 10^7$
9	$3,0 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^7$	$3,5 \cdot 10^7$	$2,1 \cdot 10^8$	$1,7 \cdot 10^8$	$1,7 \cdot 10^8$
10	$1,5 \cdot 10^6$	$2,4 \cdot 10^7$	$1,1 \cdot 10^8$	$3,2 \cdot 10^8$	$3,5 \cdot 10^8$	-
11	$1,0 \cdot 10^8$	-	$6,5 \cdot 10^8$	$2,4 \cdot 10^8$	$2,1 \cdot 10^8$	$4,4 \cdot 10^7$
12	$1,6 \cdot 10^8$	$6,9 \cdot 10^8$	$7,0 \cdot 10^8$	$3,7 \cdot 10^8$	$4,1 \cdot 10^8$	$2,6 \cdot 10^8$
13	$3,2 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^7$	$1,6 \cdot 10^8$	$2,2 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$
14	$1,4 \cdot 10^7$	$6,6 \cdot 10^6$	$2,4 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^8$	$4,0 \cdot 10^8$	$4,3 \cdot 10^8$
15	$2,5 \cdot 10^7$	$1,3 \cdot 10^9$	$1,9 \cdot 10^9$	$4,0 \cdot 10^9$	$3,0 \cdot 10^9$	$3,0 \cdot 10^9$
16	$6,5 \cdot 10^7$	$1,9 \cdot 10^8$	$4,5 \cdot 10^8$	$3,8 \cdot 10^8$	$1,3 \cdot 10^9$	$8,8 \cdot 10^9$

- dados não obtidos

A Figura 26 mostra a média da concentração celular no retentado de todos os processamentos com 12 horas de fermentação, agrupados em dois blocos: processamentos sem controle de pH durante a UF (processamentos 3, 4, 5, 6, 7, 13 e 14) e processamentos com o pH mantido estável durante a UF (processamentos 15 e 16). Vemos que, nos processamentos onde o pH foi mantido estável, as médias da concentração celular no retentado foram as maiores obtidas, mostrando-nos que o pH é essencial para a manutenção de uma alta concentração celular ativa.

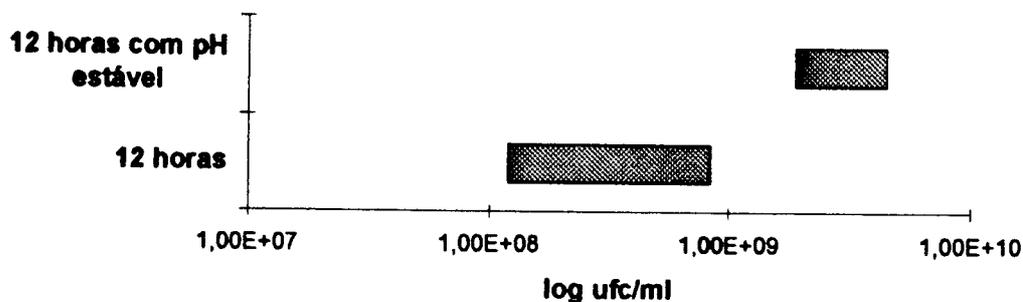


Figura 26- Média da concentração celular no retentado durante a UF de permeado de soro fermentado por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* dos processamentos com 12 horas de fermentação

Como podemos observar na curva de crescimento da bactéria *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Figura 5), ao final de 12 horas de fermentação a curva atinge o final da fase exponencial, mantendo-se estável até 16 horas de fermentação e, então, começa a declinar. Logo, contando 12 horas de fermentação mais 5 horas de UF (17 horas de processamento total), as células já entraram na fase de declínio, podendo ser este um dos fatores que levaram a concentração celular a abaixar, não se mantendo no patamar de 10^9 ufc/ml. Nos processamentos realizados com 9 horas de fermentação, chegamos a um total de 14 horas de processamento (9 horas de fermentação mais 5 horas de UF), não permitindo a entrada das bactérias na fase de declínio. As Figuras 27, 28 e 29 mostram a comparação entre pares de experimentos com todas as condições iniciais iguais, diferindo apenas no número de horas de fermentação (9 ou 12 horas de fermentação), mostrados na Tabela 11. Como podemos ver nestas figuras, nos experimentos com 9 horas de fermentação, a concentração celular inicial foi de 10^6 ufc/ml no início da UF chegando a 10^8 ufc/ml no final desta, mesmo patamar atingido nos processamentos com 12 horas de fermentação. Observa-se que, nos experimentos com 9 horas de fermentação, a concentração celular aumentou, porém não atinge a concentração de 10^9 ufc/ml.

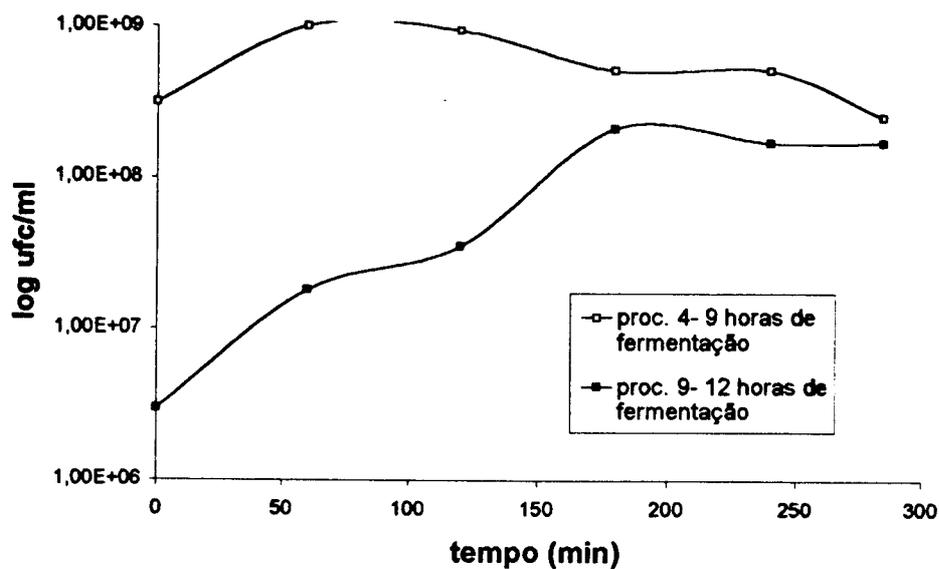


Figura 27 - Variação da concentração celular no retentado durante a UF de permeado de soro suplementado e fermentado por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* nos processamentos 4 e 9 (9 e 12 horas de fermentação, respectivamente)

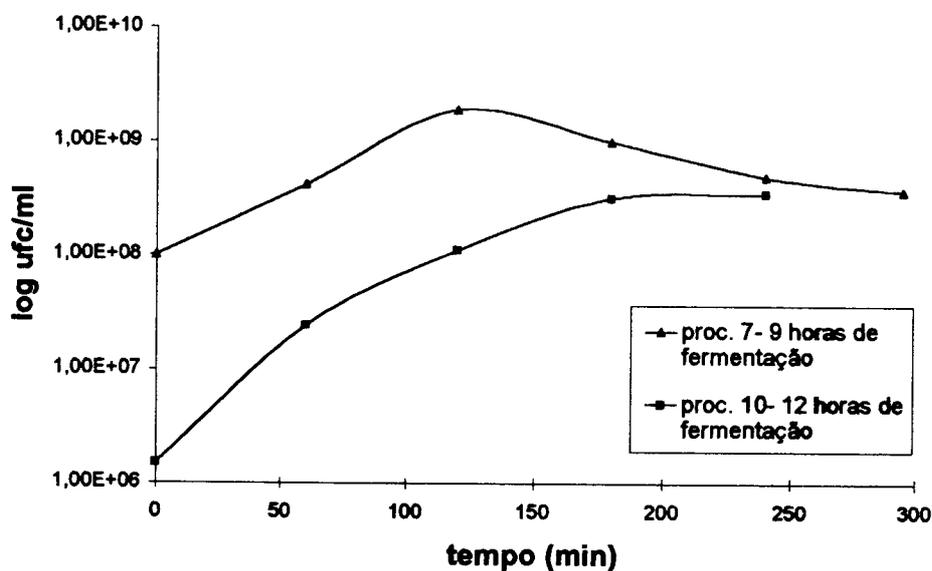


Figura 28 - Variação da concentração celular no retentado durante a UF de permeado de soro suplementado e fermentado por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* nos processamentos 7 e 10 (9 e 12 horas de fermentação, respectivamente)

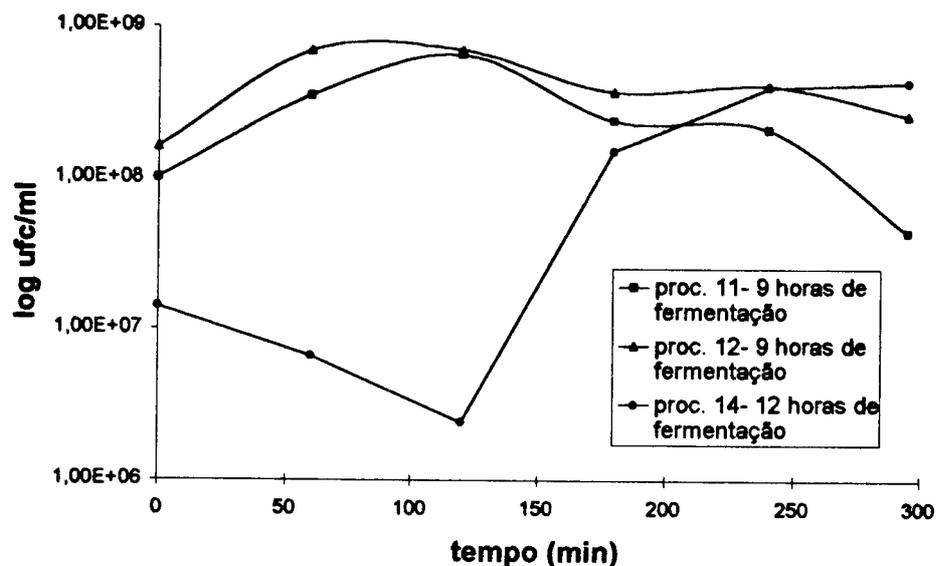


Figura 29 - Variação da concentração celular no retentado durante a UF de permeado de soro suplementado e fermentado por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* nos processamentos 11, 12 (9 horas de fermentação) e 14 (12 horas de fermentação, respectivamente)

5.6- ATIVIDADE DO FERMENTO

Para verificar se a UF produziu alguma injúria na capacidade acidificante das bactérias, em alguns processamentos foram retiradas amostras antes da UF, após 2 horas e após 4 horas de UF. A atividade foi medida conforme descrito no item 4.2.3.4. Os resultados são mostrados na Tabela 14.

Tabela 14: Atividade do *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* após 6 horas de incubação (Δ 6) a 30°C cultivado em soro de queijo e concentrado por UF nos diversos processamentos

processamento	0 horas de UF		2 horas de UF		4 horas de UF	
	Δ 6	n° cel	Δ 6	n° cel	Δ 6	n° cel
5	46,0	1,4. 10 ⁸	50,3	3,8. 10 ⁸	51,6	4,1. 10 ⁸
6	53,6	2,0. 10 ⁸	68,1	7,0. 10 ⁸	60,4	3,3. 10 ⁸
7	49,7	1,2. 10 ⁸	34,3	1,9. 10 ⁹	39,3	4,9. 10 ⁸
9	-	3,7. 10 ⁶	33,2	3,5. 10 ⁷	33,2	1,7. 10 ⁸
11	65,4	1,2. 10 ⁸	65,1	6,5. 10 ⁸	38,5	4,4. 10 ⁷
12	51,6	2,0. 10 ⁸	61,0	7,0. 10 ⁸	53,0	4,1. 10 ⁸
13	27,1	3,9. 10 ⁶	33,7	2,4. 10 ⁷	-	2,2. 10 ⁸
14	23,2	1,7. 10 ⁷	28,4	2,4. 10 ⁶	55,0	4,3. 10 ⁸
16	37,4	8,0. 10 ⁷	45,7	4,5. 10 ⁸	70,1	1,3. 10 ⁹

- dados não obtidos

Como podemos ver pela Tabela 14 e pela Figura 30, a atividade do fermento tende a aumentar à medida que a concentração celular aumenta, como já descrito na literatura por outros autores (OSBORNE & BROWN, 1980). Como a concentração celular muda durante a UF, não foi possível verificar se a UF influencia a atividade acidificante do fermento. Aparentemente, o processo de UF não reduz a viabilidade celular. O processamento 16, no qual o pH foi mantido estável, foi o que apresentou uma maior concentração celular e, conseqüentemente, uma maior atividade acidificante.

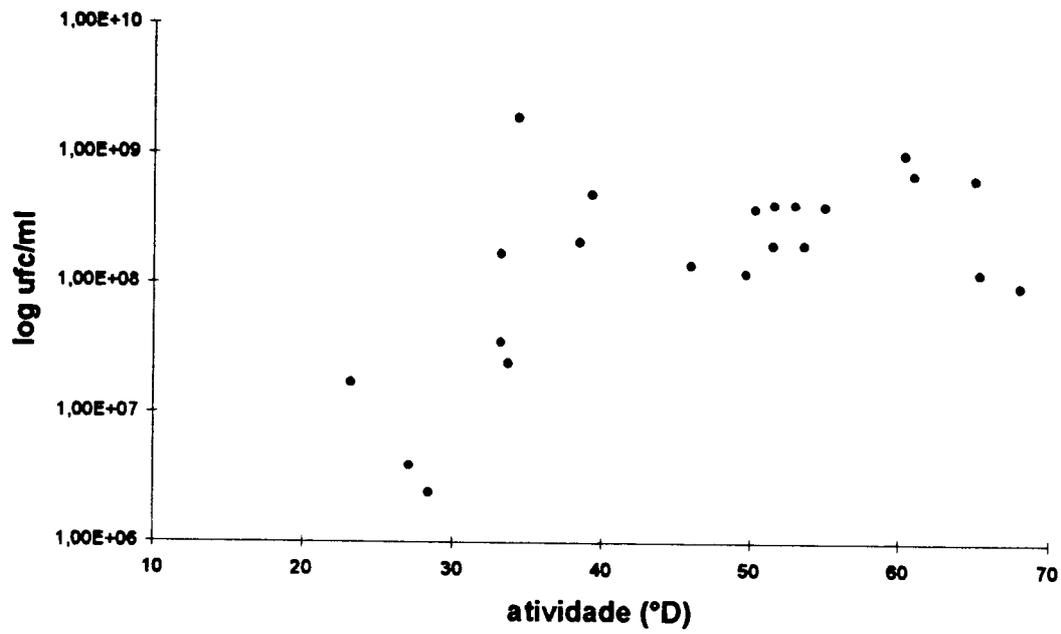


Figura 30- Acidificação produzida após 6 horas de incubação a 30 °C por 1 ml de cultura de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* concentrado em 99 ml de leite em pó desnatado e reconstituído a 11% de sólidos

6- CONCLUSÕES

O permeado de soro suplementado com extrato de levedura e peptona mostrou-se um meio adequado para o crescimento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

As membranas de UF utilizadas foram eficazes como barreira para a passagem das células, ficando o retentado com uma média de células de 10^8 ufc/ml e o permeado com uma média de células de 10^2 ufc/ml.

O uso de permeado de soro de lotes distintos provocou diferentes taxas de permeação após estes permeados terem sido fermentados por 9 horas.

Membranas de diferentes porosidades levaram à mesma taxa de permeação. O aumento da concentração celular provocou diminuição na taxa de permeação.

O pH também influenciou a taxa de permeação, havendo um aumento do fluxo com o aumento do pH da ultrafiltração.

A concentração celular dependeu fortemente do pH do meio, sendo necessária a manutenção de um pH constante, próximo de 6,0, para obtenção de uma alta concentração celular.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- AESCHLIMANN, A.; STOCKAR, U. The production of lactic acid from whey permeate by *Lactobacillus helveticus*. Biotechnology Letters, v. 11, n. 3, p. 195-200, 1989.
- 2- AESCHLIMANN, A.; STOCKAR, U. The effect of yeast extract supplementation on the production of lactic acid from whey permeate by *Lactobacillus helveticus*. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 32, n. 4, p. 398-402, 1990.
- 3- AMRANE, A.; PRINGENT, Y. Influence of media composition on lactic acid production rate from whey by *Lactobacillus helveticus*. Biotechnology Letters, v. 15, n. 3, p. 239-244, 1993.
- 4- AMRANE, A.; PRINGENT, Y. Lactic acid production from lactose in batch culture; analysis of the data with help of a mathematical model; relevance for nitrogen source and preculture assesment. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 40, n. 5, p. 644-649, 1994.
- 5- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis chemists. 14 ed. Washington D. C, 1984.
- 6- BEATON, N. C. Ultrafiltration and reverse osmosis in the dairy industry-an introduction to sanitary considerations. Journal of Food Protection , v. 42, n. 7, p. 584-590, 1979.
- 7- BLANC, P.; GOMA, G. Propionic acid and biomass production using continuous ultrafiltration fermentation of whey. Biotechnology Letters, v. 11, n. 3, p. 189-194, 1989.
- 8- BOYAVAL, P.; CORRE, C. Continuous fermentation of sweet whey permeate for propionic acid production in a CSTR with UF recycle. Biotechnology Letters, v. 9, n. 11, p. 801-806, 1987.

- 9- BOYAVAL, P.; CORRE, C.; TERRE, S. Continuous lactic acid fermentation with concentrated product recovery by ultrafiltration and electro dialysis. Biotechnology Letters, v. 9, n. 3, p. 207-212, 1987.
- 10- BOYAVAL, P.; MADEC, M. N; CORRE, C. Concentrated starter productions in a two stage cell-recycle bioreactor plant. Biotechnology Letters, v. 14, n. 7, p. 589-592, 1992.
- 11- CHAMPAGNE, C. P.; DETOURNAY, H.; HARDY, M. J. Effect of medium on growth and subsequent survival, after freeze-drying, of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Journal of Industrial Microbiology, v. 7, n. 2, p. 147-150, 1991.
- 12- CHERYAN, M. Fouling of ultrafiltration membranes. In: CHERYAN, M. Ultrafiltration handbook. Lancaster: Technomic, 1986a. cap. 6, p. 171-196.
- 13- CHERYAN, M. Ultrafiltration applications. In: CHERYAN, M. Ultrafiltration handbook. Lancaster: Technomic, 1986b. cap. 8, p. 231-350.
- 14- CHRISTOPHERSON, A.; ZOTTOLA, E. A. Whey permeate as a medium for mesophilic acid Streptococci. Journal of Dairy Science, v. 72, n. 7, p. 1701-1706, 1989a.
- 15- CHRISTOPHERSON, A. T.; ZOTTOLA, E. A. The use of whey permeates as starter media in cheese production. Journal of Dairy Science, v. 72, n. 11, p. 2862-2868, 1989b.
- 16- COGAN, T. M.; ACCOLAS, J. P. Starter cultures: types, metabolism and bacteriophage. In: ROBINSON, R. K. ed. Dairy microbiology: the microbiology of milk products. 2. ed. London: Elsevier Applied Science, 1990. v. 1, cap. 6, p. 77-114.
- 17- COLOBAN, A., ROGER, L.; BOYAVAL, P. Production of propionic acid from whey permeate by sequential fermentation, ultrafiltration and cell recycling. Biotechnology and Bioengineering, v. 42, n. 9, p. 1091-1098, 1993.

- 18- COFFEY, A. G., DALY, C.; FITZGERALD, G. The impact of biotechnology on the dairy industry. Biotechnology Advances, v. 12, n. 4, p. 625-633, 1994.
- 19- CRESPO, J. P. S. G.; XAVIER, A. M. R.B.; BARRETO, M. T. O.; GONÇALVES, L. M. D.; ALMEIDA, J. S.; CARRONDO, M. J. T. Tangencial flow filtration for continuous cell recycle culture of acidogenic bacteria. Chemical Engineering Science, v. 47, n. 1, p. 205-214, 1992.
- 20- DAUFIN, G.; MERIN, U.; LABBÉ, J. P.; QUÉMEIRAS, A.; KERHERVÉ, F. L. Cleaning of inorganic membranes after whey and milk ultrafiltration. Biotechnology and Bioengineering, v. 38, n. 1, p. 82-89, 1991.
- 21- DELBEKE, R. Direct vat inoculation of milk with lyophilized starter for making gouda cheese. Milchwissenschaft, v. 40, n. 11, p. 653-657, 1985.
- 22- EFSTATHIOU, J. D.; MCKAY, L. L.; MORRIS, H. A.; ZOTTOLA, E. A. Growth and preservation parameters for preparation of a mixed species culture concentrate for cheese manufacture. Journal of Milk and Food Technology, v. 38, n. 8, p. 444-448, 1975.
- 23- EL-GAZZAR, F.; MARTH, E. H. Ultrafiltration and reverse osmosis in dairy technology: a review. Journal of Food Protection, v. 54, n. 10, p. 801-809, 1991.
- 24- GILLILAND, S. E. Preparation and storage of concentrated cultures of lactic streptococci. Journal of Dairy Science, v. 60, n. 5, p. 805-809, 1976.
- 25- HARPER, W. J.; SEIBERLING, D. A. General process for manufactured products. In: HARPER, W. J.; HALL, C. W., ed. Dairy technology and engineering. Wesport: AVI, 1976. cap. 5, p. 211.
- 26- HENRY Jr, J. D.; ALLRED, R. C. Concentration of bacterial cells by cross flow filtration. Developments in Industrial Microbiology, v. 13, p. 177-190, 1972.

- 27- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 2 ed. São Paulo, 1976. v. 1.
- 28- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. List of terms and definitions for membrane separation processes and equipment. Bulletin of International Dairy Federation, n. 134, p. 6-11, 1981.
- 29- KOSIKOWSKI, F. V. Cultures and starters. In: KOSIKOWSKI, M. Cheese and fermented milk foods. 2. ed. New York: F. V. Kosikowski and Associates, 1982. cap. 3, p. 16-36.
- 30- KRONER, K. H.; SHUTTE, H.; HUSTEDT, H.; KULA, M. R. Crossflow in the downstream processing of enzymes. Process Biochemistry, v. 19, n. 2, p. 67-74, 1984.
- 31- LABORATÓRIO NACIONAL DE REFERÊNCIA ANIMAL. Métodos analíticos para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. Brasília, 1981. v. 2.
- 32- LE, M. S.; ATKINSON, T. Crossflow microfiltration for recovery of intracellular products. Process Biochemistry, v. 20, n. 1, p. 26-31, 1985.
- 33- LE, M. S.; HOWELL J. A. An alternative model for ultrafiltration. Chemical Engineering Research and Design, v. 62, n. 6, p. 373-380, 1984.
- 34- MARSHALL, V. M. Fermented milks and their future trends. I. Microbiological aspects. Journal of Dairy Research, v. 54, n. 4, p. 559-574, 1987.
- 35- MARTINS, J. F. P. Fermentos lácticos concentrados e congelados. Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos, n. 45, p. 17, 1976.
- 36- MAUBOIS, J. L. Ultrafiltration of the whey. Journal of the Society of Dairy Technology, v. 33, n. 2, p. 55-58, 1980.

- 37- MAUBOIS, J. L. New applications of membrane technology in the dairy industry. The Australian Journal of Dairy Technology, v. 46, n. 2, p. 91-95, 1991.
- 38- MCDONOUGH, F. E.; MATTINGLY, W. A.; VESTAL, J. H. Protein concentrate from cheese whey by ultrafiltration. Journal of Dairy Science, v. 54, n. 10, p. 1406-1409, 1971.
- 39- MEHAIA, M. A.; CHERYAN, M. Hollow fiber bioreactor for ethanol production application to the conversion of lactose by *Kluyveromyces fragilis*. Enzyme and Microbial Technology, v. 6, n. 3, p. 117-120, 1984.
- 40- MEHAIA, M. A.; CHERYAN, M. Lactic acid from acid whey permeate in a membrane recycle bioreactor. Enzyme and Microbial Technology, v. 8, n. 5, p. 289-292, 1986.
- 41- MEMBRANE separation technology offers processors unlimited potential. Food Technology, v. 44, n. 9, p. 108-113, 1990.
- 42- MERIN, U.; GORDIN, S.; TANNY, G. B. Microfiltration of cheese brine. Journal of Dairy Research, v. 50, n. 4, p. 503-509, 1983a.
- 43- MERIN, U.; GORDIN, S.; TANNY, G. B. Microfiltration of sweet cheese whey. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology, v. 18, n. 2, p. 153-160, 1983b.
- 44- MOULIN, G.; GALZY, P. Whey, a potential substrate for biotechnology. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, v. 1, p. 347-374, 1984.
- 45- NORTON, S.; LACROIX, C.; VUILLEMARD, J. C. Effect of pH on morphology of *Lactobacillus helveticus* in free-cell batch and immobilized-cell continuous fermentation. Food Biotechnology, v. 7, n. 3, p. 235-251, 1993.
- 46- OSBORNE, R. J. W.; BROWN, J. V. Properties of single-strain starter bacteria grown in diffusion culture. Journal of Dairy Research, v. 47, n. 1, p. 141-150, 1980.

- 47- PAULSON, D. J.; WILSON, R. L.; SPATZ, D. D. Crossflow membrane technology and its applications. Food Technology, v. 38, n. 12, p. 77-87, 1984.
- 48- PRIGENT, C.; CORRE, C.; BOYAVAL, P. Production of concentrated *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* by coupling continuous fermentation and ultrafiltration. Journal of Dairy Research, v. 55, n. 4, p. 569-577, 1988.
- 49- RAUCOURT, A.; GIRARD, D.; PRINGENT, Y.; BOYAVAL, P. Lactose continuous fermentation with cells recycled by ultrafiltration and lactate separation by eletrodialysis: model identification. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 30, n. 5, p. 528-534, 1989.
- 50- REID, D. E.; ADLAM, C. Large-scale harvesting and concentration of bacteria by tangential flow filtration. Journal of Applied Bacteriology, v. 41, n. 2, p. 321-324, 1976.
- 51- ROY, D.; GOULET, J. Continuous production of lactic acid from whey permeate by free and calcium alginate entrapped *Lactobacillus helveticus*. Journal of Dairy Science, v. 70, n. 3, p. 506-513, 1987.
- 52- ROY, D., GOULET, J.; LEDUY, A. Batch fermentation of ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus* for lactic acid production. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 24, n. 3, p. 206-213, 1986.
- 53- ROY, D.; LEDUY, A.; GOULET, J. Kinetics of growth and lactic acid production from whey permeate by *Lactobacillus helveticus*. The Canadian Journal of Chemical Engineering, v. 65, n. 4, p. 597-603, 1987.
- 54- SHARPE, E. Lactic acid bacteria in the dairy industry. Journal of the Society of Dairy Technology, v. 32, n. 1, p. 9-18, 1979.
- 55- STANIER, R. Y.; INGRAHAM, J. L.; WHEELIS, M. L.; PAINTER, P. R. Gram-positive fermentative eubacteria. In: STANIER, R. Y.; INGRAHAM, J. L.;

WHEELIS, M. L.; PAINTER, P. R. The microbial world. 5.ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1986. cap.23 , p. 495-504.

- 56- TAMINE, A. Y. Microbiology of 'starter cultures'. In: ROBINSON, R. K. ed. Dairy microbiology: the microbiology of milk products. 2. ed. London: Elsevier Applied Science, 1990. v. 2, cap. 4, p. 131-201.
- 57- TANNY, G. B.; MIRELMAN, D.; PISTOLE, T. Improved filtration technique for concentration and harvesting bacteria. Applied and Environmental Microbiology, v. 40, n. 2, p. 269-273, 1980.
- 58- TEJAYADI, S.; CHERYAN, M. Downstream processing of lactic acid-whey permeate fermentation broths by hollow fiber ultrafiltration. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 19, n. 1, p. 61-70, 1988.
- 59- TEJAYADI, S.; CHERYAN, M. Lactic acid from cheese whey permeate. Productivity and economics of a continuous membrane bioreactor. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 43, n. 2, p. 242-248, 1995.
- 60- TIMMER, J. M. K.; KROMKAMP, J. Efficiency of lactic acid production by *Lactobacillus helveticus* in a membrane cell recycle reactor. FEMS Microbiology Reviews, v. 14, n. 1, p. 29-38, 1994.
- 61- VANDERZANT, C.; SPLITSTOESSER, F. D. Compendium of methods for the microbiological examination of foods 3 ed. Washington D. C.: American Public Health Association, 1992. 1219 p.
- 62- VIOTTO, W. H. Ultrafiltração de soro doce de queijo minas frescal: efeito de pré-tratamentos do soro no desempenho da membrana e na composição e solubilidade do concentrado proteico de soro. Campinas, 1993. 212 p. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

- 63- WIGLEY, R. C. The use of commercially available concentrated starters. Journal of the Society of Dairy Technology, v. 30, n. 1, p. 45-46, 1977.
- 64- ZADOW, J. G. Lactose: properties and uses. Journal of Dairy Science, v. 67, n. 11, p. 2654-2679, 1984.
- 65- ZAYED, G.; WINTER, J. Batch and continuous production of lactic acid from salt whey using free and immobilized cultures lactobacilli. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 44, n. 3-4, p. 362-366, 1995.

8- ANEXO

Tabela 1: Dados do processamento 1

parâmetros medidos	horas de ultrafiltração		
	1ª hora	2ª hora	3ª hora
permeado retirado a cada hora	309	308	223
permeado total retirado	309	618	841
concentrado retirado a cada hora	49	56	41
pH do concentrado	6,51	6,51	6,52
pH do permeado	6,50	6,52	6,52
ufc/ml no concentrado	$1,4 \cdot 10^2$	$5,1 \cdot 10^2$	-
ufc/ml no permeado	<10	<10	<10

- dado não obtido

volume inicial: 1000 ml + 220 ml = 1220 ml

fator de concentração: 3,2

fluxo com água: 25 g/min

pH inicial: 6,52

concentração cél inicial: <10 ufc/ml

variação de temperatura ambiente: 28-30°C

Tabela 2: Dados do processamento 2

parâmetros medidos	horas de ultrafiltração			
	1ª hora	2ª hora	3ª hora	4ª hora
permeado retirado a cada hora	317	287	273	145
permeado total retirado	317	605	877	1023
concentrado retirado a cada hora	15	13	28	6
pH do concentrado	6,51	6,49	6,53	-
pH do permeado	6,47	6,52	6,52	6,51
ufc/ml no concentrado	13	$2,5 \cdot 10^2$	$3,1 \cdot 10^2$	$5,0 \cdot 10^3$
ufc/ml no permeado	<10	<10	<10	<10

- dado não obtido

volume inicial: 990 ml + 220 ml = 1210 ml

fator de concentração: 6,5

fluxo com água: 23 g/min

pH inicial: 6,51

concentração cél inicial: <10 ufc/ml

variação de temperatura ambiente: 20-22 °C

Tabela 3: Dados do processamento 3

parâmetros medidos	horas de ultrafiltração				
	1ª hora	2ª hora	3ª hora	4ª hora	5ª hora
permeado retirado a cada hora	263	104	94	97	90
permeado total retirado	263	367	462	559	649
concentrado retirado a cada hora	45	32	34	29	5
pH do concentrado	4,64	4,40	4,30	4,24	4,20
pH do permeado	4,91	4,49	4,27	4,23	4,23
ufc/ml no concentrado	$4,1 \cdot 10^8$	$4,5 \cdot 10^8$	$5,2 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^9$	-
ufc/ml no permeado	$2,3 \cdot 10^2$	$1,7 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^2$	44	$1,0 \cdot 10^2$

- dado não obtido

volume inicial: 950 ml + 220 ml = 1170 ml

fator de concentração: 2,2

fluxo com água: 25g/min

pH após a fermentação: 5,74

pH inicial da UF: 5,74 (sem ajuste)

concentração cél inicial: $1,9 \cdot 10^8$

variação de temperatura ambiente: 24-28°C

Tabela 4: Dados do processamento 4

parâmetros medidos	horas de ultrafiltração				
	1ª hora	2ª hora	3ª hora	4ª hora	5ª hora
permeado retirado a cada hora	253	107	95	98	103
permeado total retirado	253	361	455	553	657
concentrado retirado a cada hora	42	34	37	25	38
pH do concentrado	4,53	4,33	4,26	-	4,20
pH do permeado	4,88	4,48	4,30	4,32	4,19
ufc/ml no concentrado	$1,0 \cdot 10^9$	$9,4 \cdot 10^8$	$5,1 \cdot 10^8$	$5,1 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^8$
ufc/ml no permeado	-	20	-	5,5	34

- dados não obtidos

volume inicial: 1000 ml + 220 ml = 1220 ml

fator de concentração: 2,2

fluxo com água: 28,5g/min

pH após a fermentação: 5,68

pH inicial da UF: 5,68 (sem ajuste)

concentração cél inicial: $3,1 \cdot 10^8$

variação de temperatura ambiente: 21-24°C

Tabela 5: Dados do processamento 5

parâmetros medidos	horas de ultrafiltração				
	1ª hora	2ª hora	3ª hora	4ª hora	5ª hora
permeado retirado a cada hora	236	105	91	91	90
permeado total retirado	236	341	433	523	613
concentrado retirado a cada hora	24	32	39	35	34
pH do concentrado	4,90	4,62	4,38	4,27	4,25
pH do permeado	5,24	-	4,50	4,35	4,28
ufc/ml no concentrado	$3,2 \cdot 10^8$	$3,8 \cdot 10^8$	$5,7 \cdot 10^8$	$4,1 \cdot 10^8$	$2,7 \cdot 10^8$
ufc/ml no permeado	71	31	-	30	12

- dado não obtido

volume inicial: 975 ml + 220 ml = 1195 ml

fator de concentração: 2,1

fluxo com água: 27g/min

pH após a fermentação: 5,78

pH inicial da UF: 5,78 (sem ajuste)

concentração cél inicial: $1,1 \cdot 10^8$

variação de temperatura ambiente: 22-27°C

Tabela 6: Dados do processamento 6

parâmetros medidos	horas de ultrafiltração				
	1ª hora	2ª hora	3ª hora	4ª hora	5ª hora
permeado retirado a cada hora	303	190	92	85	86
permeado total retirado	303	493	585	670	755
concentrado retirado a cada hora	13	31	17	28	13
pH do concentrado	5,67	-	4,28	4,19	4,15
pH do permeado	5,93	4,99	4,39	4,22	4,15
ufc/ml no concentrado	$5,0 \cdot 10^8$	$9,5 \cdot 10^7$	$7,0 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^9$	$3,3 \cdot 10^8$
ufc/ml no permeado	$1,4 \cdot 10^3$	$3,5 \cdot 10^2$	$3,5 \cdot 10^2$	<10	<10

- dado não obtido

volume inicial: 960 ml + 220 ml = 1180 ml

fator de concentração: 2,8

fluxo com água: 22 g/min

pH após a fermentação: 5,97

pH inicial da UF: ajustado para 6,50

concentração cél inicial: $1,6 \cdot 10^8$

variação de temperatura ambiente: 27-30°C

Tabela 7: Dados do processamento 7

parâmetros medidos	horas de ultrafiltração				
	1ª hora	2ª hora	3ª hora	4ª hora	5ª hora
permeado retirado a cada hora	203	79	60	66	70
permeado total retirado	203	282	342	408	478
concentrado retirado a cada hora	35	33	20	35	28
pH do concentrado	5,27	4,53	4,36	4,28	4,26
pH do permeado	5,55	4,91	4,41	4,28	4,26
ufc/ml no concentrado	$4,2 \cdot 10^8$	$1,9 \cdot 10^9$	$1,0 \cdot 10^9$	$4,9 \cdot 10^8$	$3,7 \cdot 10^8$
ufc/ml no permeado	$1,4 \cdot 10^3$	$5,6 \cdot 10^2$	3,0	$9,1 \cdot 10^2$	30

volume inicial: 950 ml + 220 ml = 1170 ml

fator de concentração: 1,7

fluxo com água: 27 g/min

pH após a fermentação: 5,97

pH inicial da UF: ajustado para 6,46

concentração cél inicial: $1,0 \cdot 10^8$

variação de temperatura ambiente: 28-29°C

Tabela 8: Dados do processamento 8

parâmetros medidos	horas de ultrafiltração				
	1ª hora	2ª hora	3ª hora	4ª hora	5ª hora
permeado retirado a cada hora	309	209	100	71	76
permeado total retirado	309	518	618	688	764
concentrado retirado a cada hora	28	34	23	31	34
pH do concentrado	5,64	4,84	4,47	4,36	-
pH do permeado	5,87	5,15	4,62	4,41	4,33
ufc/ml no concentrado	$2,2 \cdot 10^8$	$1,6 \cdot 10^8$	$1,6 \cdot 10^8$	$3,4 \cdot 10^8$	$9,3 \cdot 10^7$
ufc/ml no permeado	-	29	23	13	18

- dados não obtidos

volume inicial: 995 ml + 220 ml = 1215 ml

fator de concentração: 2,6

fluxo com água: 32 g/min

pH após a fermentação: 6,29

pH inicial da UF: 6,29 (sem ajuste)

concentração cél inicial: $1,8 \cdot 10^8$

variação de temperatura ambiente: 22-26°C

Tabela 9: Dados do processamento 9

parâmetros medidos	horas de ultrafiltração				
	1ª hora	2ª hora	3ª hora	4ª hora	5ª hora
permeado retirado a cada hora	237	205	137	87	78
permeado total retirado	237	441	578	665	743
concentrado retirado a cada hora	23	34	24	35	22
pH do concentrado	5,72	5,52	5,05	4,62	4,33
pH do permeado	5,72	5,61	5,18	4,78	4,41
ufc/ml no concentrado	$1,8 \cdot 10^7$	$3,5 \cdot 10^7$	$2,1 \cdot 10^8$	$1,7 \cdot 10^8$	$1,7 \cdot 10^8$
ufc/ml no permeado	22	33	-	8,5	5,5

- dado não obtido

volume inicial: 965 ml + 220 ml = 1185 ml

fator de concentração: 2,7

fluxo com água: 30 g/min

pH após a fermentação: 6,57

pH inicial da UF: ajustado para 5,77

concentração cél inicial: $3,0 \cdot 10^6$

variação de temperatura ambiente: 26-28°C

Tabela 10: Dados do processamento 10

parâmetros medidos	horas de ultrafiltração			
	1ª hora	2ª hora	3ª hora	4ª hora
permeado retirado a cada hora	381	342	227	110
permeado total retirado	381	723	950	1060
concentrado retirado a cada hora	65	21	19	12
pH do concentrado	6,57	6,28	-	4,77
pH do permeado	6,55	6,35	5,60	5,03
ufc/ml no concentrado	$2,4 \cdot 10^7$	$1,1 \cdot 10^8$	$3,2 \cdot 10^8$	$3,5 \cdot 10^8$
ufc/ml no permeado	11	12	6,0	-

- dados não obtidos

volume inicial: 980 ml + 220 ml = 1200 ml

fator de concentração: 8,6

fluxo com água: 24,5 g/min

pH após a fermentação: 6,54

pH inicial da UF: 6,54 (sem ajuste)

concentração cél inicial: $1,5 \cdot 10^6$

variação de temperatura ambiente: 26-29°C

Tabela 11: Dados do processamento 11

parâmetros medidos	horas de ultrafiltração				
	1ª hora	2ª hora	3ª hora	4ª hora	5ª hora
permeado retirado a cada hora	146	79	55	52	50
permeado total retirado	146	225	280	332	382
concentrado retirado a cada hora	24	31	28	26	25
pH do concentrado	5,26	4,80	4,54	4,52	4,50
pH do permeado	5,64	5,05	4,62	4,53	4,48
ufc/ml no concentrado	$4,3 \cdot 10^8$	$6,5 \cdot 10^8$	$2,4 \cdot 10^8$	$2,1 \cdot 10^8$	$4,4 \cdot 10^7$
ufc/ml no permeado	5,5	1,0	2,5	<10	<10

volume inicial: 960 ml + 220 ml = 1180 ml

fator de concentração: 1,5

fluxo com água: 24 g/min

pH após a fermentação: 5,85

pH inicial da UF: ajustado para 6,50

concentração cél inicial: $1,0 \cdot 10^8$

variação de temperatura ambiente: 28-31°C

Tabela 12: Dados do processamento 12

parâmetros medidos	horas de ultrafiltração				
	1ª hora	2ª hora	3ª hora	4ª hora	5ª hora
permeado retirado a cada hora	173	102	57	52	50
permeado total retirado	173	276	333	385	435
concentrado retirado a cada hora	18	29	21	22	20
pH do concentrado	5,62	4,77	4,28	4,17	4,11
pH do permeado	5,95	5,18	4,42	4,24	4,15
ufc/ml no concentrado	$6,9 \cdot 10^8$	$7,0 \cdot 10^8$	$3,7 \cdot 10^8$	$4,1 \cdot 10^8$	$2,6 \cdot 10^8$
ufc/ml no permeado	$7,6 \cdot 10^3$	$2,9 \cdot 10^4$	$5,1 \cdot 10^2$	70	59

volume inicial: 970 ml + 220 ml = 1190 ml

fator de concentração: 1,6

fluxo com água: 20 g/min

pH após a fermentação: 5,80

pH inicial da UF: ajustado para 6,57

concentração cél inicial: $1,6 \cdot 10^8$

variação de temperatura ambiente: 25-27°C

Tabela 13: Dados do processamento 13

parâmetros medidos	horas de ultrafiltração				
	1ª hora	2ª hora	3ª hora	4ª hora	5ª hora
permeado retirado a cada hora	157	117	93	61	41
permeado total retirado	157	274	368	428	469
concentrado retirado a cada hora	24	19	13	28	18
pH do concentrado	5,78	5,64	5,21	4,73	4,38
pH do permeado	5,74	5,69	5,43	5,08	4,60
ufc/ml no concentrado	$1,2 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^7$	$1,6 \cdot 10^8$	$2,2 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$
ufc/ml no permeado	$3,3 \cdot 10^2$	$6,0 \cdot 10^2$	50	$4,4 \cdot 10^2$	$1,4 \cdot 10^2$

volume inicial: 975 ml + 220 ml = 1195 ml

fator de concentração: 1,6

fluxo com água: 31 g/min

pH após a fermentação: 6,46

pH inicial da UF: ajustado para 5,76

concentração cél inicial: $3,2 \cdot 10^6$

variação de temperatura ambiente: 26-28°C

Tabela 14: Dados do processamento 14

parâmetros medidos	horas de ultrafiltração				
	1ª hora	2ª hora	3ª hora	4ª hora	5ª hora
permeado retirado a cada hora	162	148	145	143	88
permeado total retirado	162	311	456	598	687
concentrado retirado a cada hora	17	29	23	33	14
pH do concentrado	6,56	6,50	6,11	5,30	4,61
pH do permeado	6,52	6,51	6,25	5,64	4,77
ufc/ml no concentrado	$6,6 \cdot 10^6$	$2,4 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^8$	$4,0 \cdot 10^8$	$4,3 \cdot 10^8$
ufc/ml no permeado	$1,9 \cdot 10^2$	$7,4 \cdot 10^2$	$1,5 \cdot 10^3$	$7,5 \cdot 10^2$	$1,1 \cdot 10^3$

volume inicial: 975 ml + 220 ml = 1195 ml

fator de concentração: 2,4

fluxo com água: 24,5 g/min

pH após a fermentação: 6,47

pH inicial da UF: ajustado para 6,51

concentração cél inicial: $1,4 \cdot 10^7$

variação de temperatura ambiente: 24-28°C

Tabela 15: Dados do processamento 15

parâmetros medidos	horas de ultrafiltração				
	1ª hora	2ª hora	3ª hora	4ª hora	5ª hora
permeado retirado a cada hora	185	176	180	177	161
permeado total retirado	185	361	540	718	879
concentrado retirado a cada hora	42	27	19	20	29
volume soda colocado a cada hora	31	49	41	57	31
volume de soda total	31	80	121	178	209
temperatura interna	-	38,5	39,9	40,7	-
temperatura ambiente	29	30	31,5	32,5	32,5
ufc/ml no concentrado	$1,3 \cdot 10^9$	$1,9 \cdot 10^9$	$4,0 \cdot 10^9$	$3,0 \cdot 10^9$	$3,0 \cdot 10^9$
ufc/ml no permeado	94	24	16	12	5,0

- dados não obtidos

volume inicial: 1450 ml + 220 ml = 1650 ml

fluxo com água: dado não obtido

pH inicial da UF: ajustado para 6,50

pH durante a UF: mantido ao redor de 6,0 com a adição de soda. Nas duas primeiras horas 1N e nas restantes, 2N.

concentração cél inicial: $2,5 \cdot 10^7$ ufc/ml

variação de temperatura ambiente: 29-33°C

Tabela 16: Dados do processamento 16

parâmetros medidos	horas de ultrafiltração				
	1ª hora	2ª hora	3ª hora	4ª hora	5ª hora
permeado retirado a cada hora	178	137	121	117	117
permeado total retirado	178	315	437	552	669
concentrado retirado a cada hora	14	55	8	18	21
volume soda colocado a cada hora	0	2	5	12	23
volume de soda total	0	2	7	19	42
temperatura interna	25,2	28,7	30,5	31,5	-
temperatura ambiente	21,5	22,0	23,0	23,0	-
ufc/ml no concentrado	$1,9 \cdot 10^8$	$4,5 \cdot 10^8$	$3,8 \cdot 10^8$	$1,3 \cdot 10^9$	$8,8 \cdot 10^9$
ufc/ml no permeado	$1,3 \cdot 10^4$	$2,1 \cdot 10^4$	$1,8 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$	$7,3 \cdot 10^3$

- dados não obtidos

volume inicial: 965 ml + 220 ml = 1185 ml

fluxo com água: 24 g/min

pH inicial da UF: ajustado para 6,50

pH durante a UF: mantido ao redor de 6,0 com a adição de soda 2N

concentração cél inicial: $6,5 \cdot 10^7$

variação de temperatura ambiente: 21- 23 °C