

## Obtenção e caracterização de bebida destilada a partir da fermentação do soro de queijo

*Obtention and characterization of distilled beverage from cheese whey fermentation*

### Autores | Authors

#### ✉ Giuliano DRAGONE

Universidade do Minho  
Departamento de Engenharia Biológica  
Campus de Gualtar  
CEP: 4710-057  
Braga - Portugal  
e-mail: gdragone@deb.uminho.pt

#### Solange Inês MUSSATTO

Universidade do Minho  
Departamento de Engenharia Biológica  
e-mail: solange@deb.uminho.pt

#### Mar VILANOVA

Misión Biológica de Galicia (CSIC)  
Pontevedra - Espanha  
e-mail: mvilanova@mbg.cesga.es

#### José Maria OLIVEIRA José António TEIXEIRA

Universidade do Minho  
Departamento de Engenharia Biológica  
e-mail: jmoliveira@deb.uminho.pt  
jateixeira@deb.uminho.pt

#### João Batista de Almeida e SILVA

Universidade de São Paulo (USP)  
Escola de Engenharia de Lorena  
Departamento de Biotecnologia  
e-mail: joabatista@debiq.eel.usp.br

### Resumo

O presente estudo visou a produção e caracterização de uma nova bebida alcoólica através da fermentação descontínua do soro de queijo e posterior destilação do produto fermentado. Os ensaios fermentativos foram conduzidos a 35 °C e 150 rpm por 92 h, em um bioreator de 7 L (volume total) empregando a levedura *Kluyveromyces fragilis*. O destilado foi separado em três frações de acordo com a concentração de etanol: a cabeça (>80% v/v), o coração (80-40% v/v) e a cauda (<40% v/v). A fração do coração foi diluída para um teor alcoólico de 40% v/v e os principais compostos voláteis (ésteres e alcoóis superiores) foram determinados por Cromatografia Gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC) e Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa (CG-EM). A fração do coração foi também submetida a análise sensorial por um painel de julgadores treinados visando estabelecer descritores visuais, olfativos e gustativos. Com este trabalho concluiu-se que é possível obter uma bebida destilada com odor e gosto agradáveis a partir da fermentação do soro de queijo.

**Palavras-chave:** Soro de queijo; Etanol; *Kluyveromyces fragilis*; Destilação; Fermentação; Análise sensorial.

### Summary

The present study aimed the production and characterization of a new alcoholic beverage through discontinuous fermentation of cheese whey and subsequent distillation of the fermented product. The fermentative assays were performed at 35 °C and 150 rpm during 92 h in a 7-L bioreactor (total volume) using the yeast *Kluyveromyces fragilis*. The distillate was separated into three fractions according to the ethanol concentration: the head (>80% v/v), the heart (80-40% v/v) and the tail (<40% v/v). The heart fraction was diluted to an alcoholic content of 40% v/v and the main volatile compounds (esters and higher alcohols) were determined by gas chromatography with a flame ionization detector (GC-FID) and gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS). The heart fraction was also submitted to sensory analysis by a panel of trained assessors aiming to establish visual, olfactory and gustatory descriptors. It was concluded that it is possible to obtain a distilled beverage with pleasant odor and taste from cheese whey fermentation.

**Key words:** Cheese whey; Ethanol; *Kluyveromyces fragilis*; Distillation; Fermentation; Sensory analysis.

## Obtenção e caracterização de bebida destilada a partir da fermentação do soro de queijo

DRAGONE, G. et al.

### 1 Introdução

O soro de queijo ou soro de leite é o líquido resultante da coagulação do leite durante a elaboração do queijo. O potencial poluidor deste subproduto (DBO = 30000 – 50000 ppm) é aproximadamente 100 vezes maior que o do esgoto doméstico. Porém, pelo alto custo de implantação, a instalação de uma planta de tratamento biológico de soro, muitas vezes torna-se inviável para a maioria das indústrias de laticínios. Consequentemente, grande parte do soro de queijo produzido em diversas partes do mundo ainda é incorporada às águas residuais dos laticínios, sendo a principal fonte poluidora do meio ambiente gerada por esse setor (MARWAHA e KENNEDY, 1988).

Para atender às legislações ambientais, as indústrias têm buscado alternativas para seu aproveitamento ao invés do descarte. As proteínas contidas no soro, por exemplo, podem ser separadas por ultrafiltração e utilizadas como suplemento alimentar ou como matéria-prima para a fabricação de produtos nutricionais. Entretanto, a recuperação das proteínas pouco contribui para a diminuição da carga poluente do soro, formada principalmente pela lactose presente no permeado (MAWSON, 1994).

Sabendo-se que a lactose é responsável pela alta demanda biológica de oxigênio, diversos processos fermentativos têm sido propostos como alternativa para reduzir o problema de desperdício e disposição do soro de queijo. Tanto o soro quanto o permeado de soro (subproduto da produção de proteínas do soro) ou a lactose podem ser utilizados diretamente como substrato para o crescimento microbiano visando a obtenção de produtos de maior valor agregado, tais como: proteínas unicelulares, alcoóis (etanol, butanol), ácidos orgânicos (lático, acético, propiônico e cítrico), vitaminas e biopolímeros (goma xantana) (YANG e SILVA, 1995).

Nos últimos anos, várias pesquisas têm sido realizadas utilizando o soro de queijo para a produção de bebidas de baixo teor alcoólico (KOURKOUTAS et al., 2002; PARRONDO et al., 2000a; b). No entanto, a elaboração de bebidas destiladas a partir do soro de queijo tem sido pouco explorada. Desta forma, visando avaliar novas possibilidades de aproveitamento deste subproduto industrial, o presente trabalho propõe a elaboração e caracterização de uma bebida destilada a partir do fermentado alcoólico resultante da bioconversão da lactose do soro em etanol, utilizando a levedura *Kluyveromyces fragilis*. Essa espécie de microrganismo foi escolhida devido a sua capacidade de crescer em meios que contêm lactose (uma vez que são poucas as espécies que metabolizam este carboidrato) com elevados rendimentos e sem a produção de toxinas. Além disso, a utilização desta levedura em produtos alimentícios é autorizada pela Administração de Drogas

e Alimentos (FDA) dos Estados Unidos (PARRONDO et al., 2000a).

### 2 Material e métodos

#### 2.1 Microrganismo e preparo do inóculo

A levedura *Kluyveromyces fragilis* utilizada neste trabalho foi escolhida da coleção de culturas do Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho (Portugal) e mantida em placas de ágar YPD a 4 °C.

O cultivo do inóculo foi preparado em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de uma solução de soro de queijo em pó (50 g.L<sup>-1</sup> de lactose) mantida em incubadora de movimento rotatório (200 rpm) a 30 °C durante 24 h.

#### 2.2 Preparo das soluções de soro de queijo em pó

O soro de queijo em pó foi fornecido pela empresa Lactogal (Porto/Portugal). As soluções de soro de queijo em pó com diferentes concentrações iniciais de lactose foram acidificadas com ácido cítrico (1 M) até pH 5 e desproteinizadas mediante tratamento térmico (115 °C, 15 min). O precipitado formado foi separado por centrifugação a 8500 rpm e 10 °C durante 15 min e o sobrenadante foi utilizado como meio de fermentação.

#### 2.3 Condições da fermentação e destilação

Os ensaios fermentativos foram conduzidos em um bioreator de 7 L (volume total) contendo 5 L de meio composto por uma solução de soro de queijo em pó com concentração inicial de lactose de 200 g.L<sup>-1</sup>. A fermentação do soro de queijo com concentração inicial de inóculo de 1 g.L<sup>-1</sup> foi mantida a 35 °C e 150 rpm durante 92 h. Os experimentos foram realizados em duplicata. O fermentado alcoólico obtido nesses ensaios foi centrifugado a 8500 rpm e 10 °C durante 15 min para remoção das leveduras e o sobrenadante foi utilizado para destilação. Durante o processo de destilação foram recolhidas amostras de 20 mL cada, as quais foram analisadas para determinação da concentração alcoólica e posteriormente separadas em 3 frações de acordo com a concentração de etanol presente: cabeça (>80% v/v), coração (80-40% v/v) e cauda (<40% v/v).

#### 2.4 Métodos analíticos

Amostras de meio foram centrifugadas a 4000 rpm durante 10 min e o sobrenadante foi utilizado para quantificar as concentrações de lactose e etanol no decorrer do processo fermentativo. O sólido remanescente foi lavado com água destilada e centrifugado, sendo posteriormente diluído com água destilada para análise da biomassa. A concentração de biomassa foi determinada espectro-

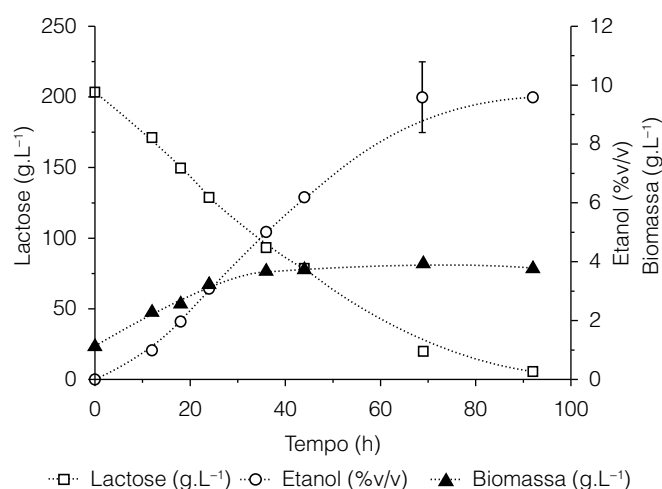
## Obtenção e caracterização de bebida destilada a partir da fermentação do soro de queijo

DRAGONE, G. et al.

fotometricamente a 600 nm. Durante a fermentação, as concentrações de lactose e etanol foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em um cromatógrafo equipado com detector de índice de refração (Jasco 830-RI) e coluna Chrompack (300 x 6,5 mm) a 60 °C, utilizando ácido sulfúrico 5 mM como eluente em um fluxo de 0,5 mL.min<sup>-1</sup>, e um volume de amostra de 20 µL. Os principais compostos voláteis da bebida destilada foram determinados por cromatografia gasosa (CG) com detector de ionização de chama e cromatografia gasosa com espectrometria de massa (CG-EM) de acordo com metodologia previamente estabelecida (DRAGONE et al., 2009).

### 3 Resultados e discussão

A fermentação da solução de soro de queijo em pó com uma alta concentração inicial de lactose (200 g.L<sup>-1</sup>) permitiu obter um fermentado alcoólico com um teor de etanol de 9,6% v/v, após 92 h (Figura 1). Alguns autores têm relatado que a utilização de soro de queijo em pó em vez do soro de queijo bruto (sem tratamento) proporciona uma fonte concentrada de lactose e de outros nutrientes que permitem um processo mais econômico para a produção de etanol (OZMIHICI e KARGI, 2007b; c). Segundo esses autores, os custos da destilação podem ser reduzidos mediante a fermentação de soluções concentradas de soro de queijo em pó (até 200 g.L<sup>-1</sup> de lactose) que possibilitam teoricamente alcançar elevadas concentrações de etanol (10-12% v/v). De acordo com Ozmihci e Kargi (2007a), o custo de produção do soro de queijo em pó a partir do soro de queijo pela secagem por pulverização ou em tambor varia entre US\$ 0,20 e 0,40/kg de soro, o que permite compensar os custos da destilação para a produção de etanol puro.



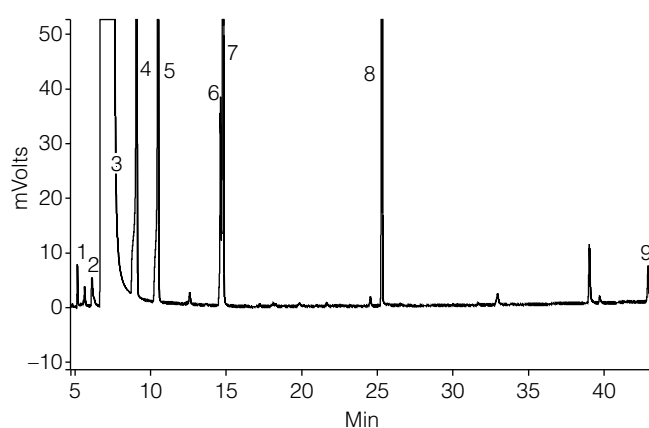
**Figura 1.** Variação das concentrações de lactose, etanol e biomassa durante a fermentação da solução de soro de queijo em pó pela levedura *Kluyveromyces fragilis* a 35 °C e 150 rpm.

Após a destilação do fermentado alcoólico, a fração do coração foi diluída para um teor de etanol de 40% v/v, e posteriormente foram analisados seus principais compostos voláteis por cromatografia gasosa (CG) com detector de ionização de chama (Figura 2) e cromatografia gasosa com espectrometria de massa (CG-EM).

Os resultados mostraram que os alcoóis superiores foram o grupo mais abundante de compostos voláteis presentes nessa fração, com os alcoóis isoamílico, isopentílico, isobutílico e 1-propanol, encontrados em maiores quantidades (Tabela 1).

Segundo Cortés Diéguez et al. (2001), os alcoóis superiores correspondem ao grupo de maior concentração nas bebidas destiladas. A legislação europeia estabelece uma concentração mínima para esses compostos aromáticos em destilados de 140 g.hL<sup>-1</sup> de álcool absoluto (AA). A bebida destilada obtida neste estudo apresentou uma concentração de alcoóis superiores (254 g.hL<sup>-1</sup> AA) acima dessas exigências mínimas, cumprindo portanto com a legislação europeia.

Dentre os ésteres, o acetato de etila foi o que apresentou a maior concentração (15,6 mg.L<sup>-1</sup>). Esse composto exerce um efeito significativo nas características organolépticas dos vinhos e das bebidas destiladas. Sua presença em baixas concentrações resulta em um agradável aroma frutal, proporcionando por outro lado características de deterioração quando encontrado em níveis superiores a 150 mg.L<sup>-1</sup> (APOSTOLOPOULOU et al., 2005). De acordo com Mingorance-Cazorla et al. (2003), concentrações elevadas de acetato de etila indicam uma provável contaminação por bactérias acéticas. Portanto, a concentração de acetato de etila no destilado de soro



**Figura 2.** Cromatograma (CG/DIC) dos compostos voláteis encontrados na fração do coração (40% v/v etanol) da bebida destilada: 1) acetaldeído; 2) acetato de etila; 3) etanol; 4) 1-propanol; 5) 2-metil-1-propanol; 6) 2-metil-1-butanol; 7) 3-metil-1-butanol; 8) 4-nonanol; 9) 2-feniletanol.

## Obtenção e caracterização de bebida destilada a partir da fermentação do soro de queijo

DRAGONE, G. et al.

**Tabela 1.** Concentração dos principais compostos voláteis presentes na bebida destilada.

|          | Composto                                | Concentração ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) |
|----------|---|---------------------------------------|
| Alcoóis  | 3-metil-1-butanol (isoamílico)          | 332300                                |
|          | 2-metil-1-propanol (isobutílico)        | 264600                                |
|          | 1-propanol                              | 316800                                |
|          | 2-metil-1-butanol (isopentílico)        | 82200                                 |
|          | 2-feniletanol                           | 19700                                 |
|          | 1-butanol                               | 137                                   |
|          | 1-hexanol                               | 8                                     |
| Ésteres  | Acetato de etila                        | 15600                                 |
|          | Octanoato de etila (Caprilato de etila) | 267                                   |
|          | Butanoato de etila (Butirato de etila)  | 145                                   |
|          | Hexanoato de etila (Caproato de etila)  | 102                                   |
|          | Aldeídos                                | Acetaldeído                           |
|          | Furfural                                | 394                                   |
| Ácidos   | Ácido hexadecanoico (Ácido palmítico)   | 2409                                  |
|          | Ácido tetradecanoico (Ácido merístico)  | 2003                                  |
|          | Ácido dodecanoico (Ácido láurico)       | 1404                                  |
|          | Ácido decanoico (Ácido cáprico)         | 923                                   |
|          | Ácido octanoico (Ácido caprílico)       | 799                                   |
|          | Ácido hexanoico (Ácido caproico)        | 598                                   |
| Terpenos | Linalol                                 | 13                                    |

de queijo obtido neste trabalho apresentou um nível apropriado para conferir um aroma agradável.

Além dos alcoóis superiores e ésteres, outros componentes, incluindo aldeídos, ácidos e terpenos, foram também identificados na bebida destilada. Dentre os aldeídos, o acetaldeído foi o composto encontrado em maior proporção ( $9,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ). De acordo com Silva e Malcata (1999) o acetaldeído e seu dietilacetal (1,2-dietoxietano) são normalmente responsáveis por mais do 90% do conteúdo total de aldeídos em bebidas destiladas. Esse composto é um subproduto da fermentação alcoólica e apresenta descritores sensoriais que variam desde o aroma de nozes e xerez até o de maçãs maduras (FUGELSSANG, 1997). O furfural apresentou uma baixa concentração ( $394 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), bem menor do que o nível considerado como limiar de seu odor ( $88000 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) (ESCUADERO et al., 2004). Esse composto é formado durante a destilação devido à degradação de açúcares fermentáveis (pentoses) pelo aquecimento em condições ácidas e/ou reações de Maillard (MANGAS et al., 1996). Desta forma, altas concentrações de furfural podem ser atribuídas à presença de elevadas quantidades de

**Tabela 2.** Descritores visuais, olfativos e gustativos da bebida destilada obtida a partir da fermentação de solução de soro de queijo em pó.

| Descritores         |                       |                               |
|---------------------|-----------------------|-------------------------------|
| Fase visual         | Fase olfativa         | Fase gustativa                |
| Cristalino          | Tostados              | Suave                         |
| Limpo               | Pedra de carboneto    | Muito agradável na boca       |
| Brilhante           | Defumado              | Retronasal igual que em nariz |
| Algo velado         | Lembra a genebra      | Sensação doce                 |
| Necessita filtração | Frutos secos          | Ligeiramente picante          |
|                     | Creme de Uísque-leite | Largo na boca                 |
|                     | Requeimado            | Untuoso                       |
|                     | Leite queimado        |                               |
|                     | Agradável             |                               |
|                     | Lácteos               |                               |

pentoses residuais devido a condições de fermentação inadequadas. Seu odor esta associado com o de amêndoas amargas e canela (APOSTOLOPOULOU et al., 2005). A Tabela 1 mostra que o ácido hexadecanoico apresentou a concentração mais elevada dentre os ácidos graxos de cadeia longa, seguido pelos ácidos tetradecanoico, dodecanoico, decanoico, octanoico e hexanoico. Segundo Silva e Malcata (1999), esse tipo de ácidos exerce um pequeno efeito no *flavor* das bebidas destiladas.

Após caracterizada, a fração do coração da bebida destilada foi submetida a uma análise sensorial por um painel de julgadores treinados (Misión Biológica de Galicia (CSIC), Pontevedra/Espanha) visando estabelecer descritores visuais, olfativos e gustativos. Os resultados dessa análise estão apresentados na Tabela 2. Conforme observado, nas fases olfativa e gustativa, a bebida destilada obtida a partir da fermentação da solução de soro de queijo em pó foi julgada como agradável e muito agradável, respectivamente.

## 4 Conclusões

O presente trabalho permitiu concluir que é possível obter uma bebida destilada com odor e gosto agradáveis a partir da fermentação de uma solução de soro de queijo em pó com elevada concentração inicial de lactose ( $200 \text{ g.L}^{-1}$ ). A análise dos principais compostos voláteis confirmou que a bebida cumpre com as exigências estabelecidas pela legislação europeia para a produção de destilados.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES/Grices o apoio financeiro (BEX2150/07-7) e à empresa Lactogal o fornecimento da matéria-prima.

**Obtenção e caracterização de bebida destilada a partir da fermentação do soro de queijo**DRAGONE, G. *et al.***Referências**

- APOSTOLOPOULOU, A. A.; FLOUROS, A. I.; DEMERTZIS, P. G.; AKRIDA-DEMERTZI, K. Differences in concentration of principal volatile constituents in traditional Greek distillates. **Food Control**, Kidlington, v. 16, n. 2, p. 157-164, 2005.
- CORTÉS DIÉGUEZ, S.; GIL De LA PEÑA, M. L.; FERNÁNDEZ GÓMEZ, E. Concentration of volatiles in marc distillates from Galicia according to storage conditions of the grape pomace. **Chromatographia**, Wiesbaden, v. 53, n. 1, p. 406-411, 2001.
- DRAGONE, G.; MUSSATTO, S. I.; OLIVEIRA, J. M.; TEIXEIRA, J. A. Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. **Food Chemistry**, Kidlington, v. 112, n. 4, p. 929-935, 2009.
- ESCUADERO, A.; GOGORZA, B.; MELUS, M. A.; ORTIN, N.; CACHO, J.; FERREIRA, V. Characterization of the aroma of a wine from Maccabeo. Key role played by compounds with low odor activity values. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 11, p. 3516-3524, 2004.
- FUGELANG, K. C. **Wine microbiology**. New York: Chapman & Hall, 1997.
- KOURKOUTAS, Y.; DIMITROPOULOU, S.; KANELAKI, M.; MARCHANT, R.; NIGAM, P.; BANAT, I. M.; KOUTINAS, A. A. High-temperature alcoholic fermentation of whey using *Kluyveromyces marxianus* IMB3 yeast immobilized on delignified cellulosic material. **Bioresource Technology**, Kidlington, v. 82, n. 2, p. 177-181, 2002.
- MANGAS, J.; RODRÍGUEZ, R.; MORENO, J.; BLANCO, D. Changes in the major volatile compounds of cider distillates during maturation. **Lebensmittel Wissenschaft und-Technologie**, San Diego, v. 29, n. 4, p. 357-364, 1996.
- MARWAHA, S. S.; KENNEDY, J. F. Review: whey pollution problem and potential utilization. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 23, n. 4, p. 323-336, 1988.
- MAWSON, A. J. Bioconversions for whey utilization and waste abatement. **Bioresource Technology**, Kidlington, v. 47, n. 3, p. 195-203, 1994.
- MINGORANCE-CAZORLA, L.; CLEMENTE-JIMÉNEZ, J. M.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, S.; LAS HERAS-VÁZQUEZ, F. J.; RODRÍGUEZ-VICO, F. Contribution of different natural yeasts to the aroma of two alcoholic beverages. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 19, n. 3, p. 297-304, 2003.
- OZMIHCI, S.; KARGI, F. Continuous ethanol fermentation of cheese whey powder solution: effects of hydraulic residence time. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, New York, v. 30, n. 2, p. 79-86, 2007a.
- OZMIHCI, S.; KARGI, F. Effects of feed sugar concentration on continuous ethanol fermentation of cheese whey powder solution (CWP). **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 41, n. 6-7, p. 876-880, 2007b.
- OZMIHCI, S.; KARGI, F. Kinetics of batch ethanol fermentation of cheese-whey powder (CWP) solution as function of substrate and yeast concentrations. **Bioresource Technology**, Kidlington, v. 98, n. 16, p. 2978-2984, 2007c.
- PARRONDO, J.; GARCIA, L. A.; DIAZ, M. Production of an alcoholic beverage by fermentation of whey permeate with *Kluyveromyces fragilis* I: Primary metabolism. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 106, n. 6, p. 367-375, 2000a.
- PARRONDO, J.; GARCIA, L. A.; DIAZ, M. Production of an alcoholic beverage by fermentation of whey permeate with *Kluyveromyces fragilis* II: Aroma composition. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 106, n. 6, p. 377-382, 2000b.
- SILVA, M. L.; MALCATA, F. X. Effects of time of grape pomace fermentation and distillation cuts on the chemical composition of grape marcs. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und- Forschung A**, Berlin, v. 208, n. 2, p. 134-143, 1999.
- YANG, S. T.; SILVA, E. M. Novel products and new technologies for use of a familiar carbohydrate, milk lactose. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 78, n. 11, p. 2541-2562, 1995.