

## 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 (láctico, 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-

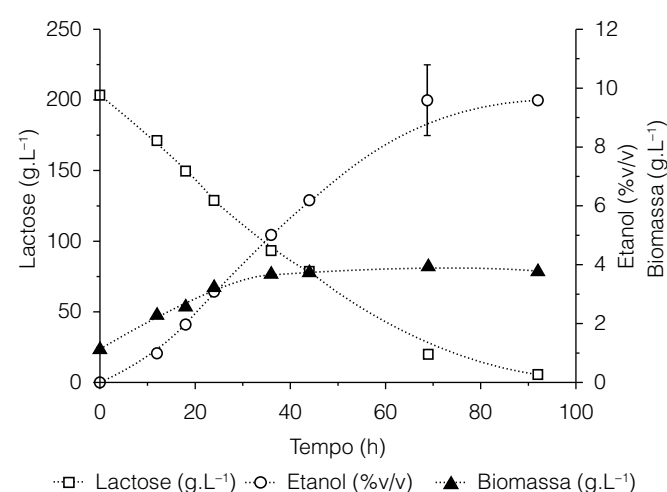
## Obtenção e caracterização de bebida destilada a partir da fermentação do soro de queijo

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 (OZMIHCI 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.



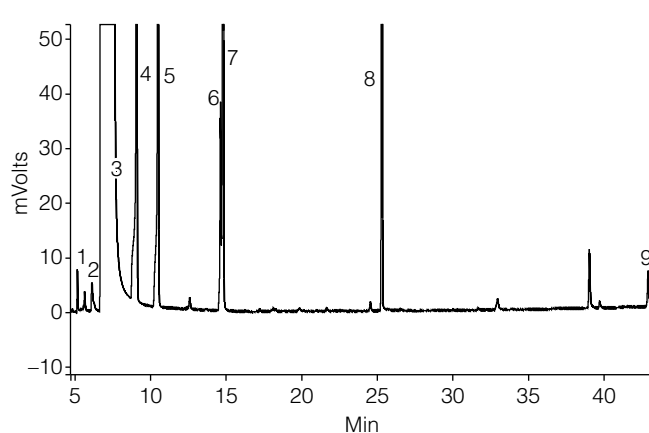
**Figura 1.** Variação das concentrações de lactose, etanol e biomassa durante a fermentação da solução de soro de queijo em pó pela levedura *Kluyveromyces fragilis* a 35 °C e 150 rpm.

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 dietilacetil (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.; KANELLAKI, 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.