

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO CIENCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA (PEQ-UFS)

AFRAM DOMINGOS SILVA DE MENESES

**PROCESSO BIOTECNOLÓGICO PARA APROVEITAMENTO DE SORO OBTIDO NA
PRODUÇÃO DO QUEIJO DE COALHO**

São Cristóvão (SE)

2009

AFRAM DOMINGOS SILVA DE MENESES

**PROCESSO BIOTECNOLÓGICO PARA APROVEITAMENTO DE SORO OBTIDO NA
PRODUÇÃO DO QUEIJO DE COALHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe como parte das exigências do programa de Pós-graduação em Engenharia Química, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Narendra Narain

Co-orientadora: Profa. Dra. Luciana Cristina Lins de Aquino

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

M543p Meneses, Afram Domingos Silva de
Processo biotecnológico para aproveitamento de soro obtido na
produção do queijo de coalho / Afram Domingos Silva de
Meneses. – São Cristóvão, 2010.
87 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa
de Pós-Graduação em Engenharia Química, Pró-Reitoria de Pós-
Graduação e Pesquisa, Universidade Federal de Sergipe, 2010.

Orientador: Prof. Dr. Narendra Narin.

1. Soro de leite – Processo biotecnológico. 2. Fermentação –
Kluyveromices lactis. 3. Cromatografia gasosa. I. Título.

CDU 602.4:637.344

DEDICATÓRIA

Com muito orgulho e com o coração flambado de alegria que dedico esta obra científica, a mulher que não mediu esforços e sacrifícios para plantar e cultivar a sós 4 filhos. Hoje tenho certeza, que feliz, observa com imensa satisfação as flores e os frutos produzidos por ti. É à senhora **MARIA FRANCISCA SILVA** a quem com imensa gratidão ofereço.

AGRADECIMENTOS

Agradecer é um ato singelo, cujo valor tem uma tamanha representação para quem é digno de tal referência.

Agradecemos pelo magnânimo reconhecimento dos serviços e colaboração prestados.

Durante a realização do mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Biotecnológicos, tenho a grata satisfação de agradecer àqueles que contribuíram para esta conquista, os quais passo a citar:

Professores do PEQ que não mediram esforços para o desenvolvimento do programa.

A senhora Bernadete (Secretária do DEQ) e a Técnica de Laboratório (Carla) que pacientemente nos atendiam, colaboraram e contribuíram com seus serviços nesses quase 24 meses.

Professores Gabriel, Jailton e Roberto Rodrigues (meu mestre) pela participação e valorosa contribuição no Exame de Qualificação.

Professores Narendra e Luciana que com coragem e determinação assumiram a orientação desse trabalho, de suma importância para mim, ampliando assim meus singelos conhecimentos.

Professores do LTA (Lúcia e Marcelo) por terem aberto às portas do programa de Engenharia de Alimentos no qual desenvolvi meus experimentos.

Aos técnicos do LAF, Mércia Galvão e Anderson Fontes, que contribuíram para os meus conhecimentos sobre cromatografia com muita disposição e apoio.

Alunos de Iniciação Científica que compartilhando as dependências do LTA e do LAF, com dedicação, deram grande valor à execução dos experimentos.

A todos que fazem parte do Instituto Federal de Ciências e Tecnologia de Sergipe/ Campus São Cristóvão, pelo apoio incondicional.

A amiga Ana Carla Menezes de Oliveira por não medir esforços no apoio pedagógico e científico.

A Técnica de Laboratório, Maria Emília, por produzir o soro de queijo usado nos experimentos.

Aos Diretores, Supervisores e Coordenadores do Colégio Salesiano Nossa Senhora Auxiliadora e Grêmio Escolar Graccho Cardoso.

Ao Governo do Estado de Sergipe, junto a Secretaria de Educação através da Escola de 1º e 2º graus “Monsenhor Carmélio Costa”.

Ao Instituto Tecnológico e de Pesquisa do Estado de Sergipe, através dos Técnicos e Estagiários do Laboratório de Bromatologia, na responsabilidade da Química Ana Virgínia.

Mônica, minha esposa, que tanto no decorrer do curso, como principalmente nesta última fase, me deu suporte e me encorajou para persistência dos meus objetivos.

Aos meus irmãos, mãe, pai, tios (as), sobrinhos (as), primos (as), minha cunhada Geórgia, minha madrinha Almir Aragão e os amigos (Edson, Daniel e Doalcey) que incansavelmente me apóiam e colaboram para o meu sucesso acadêmico e profissional.

As minhas colegas do curso (Andrea, Claudinha e Inaura) com as quais aprendi a valorizar o companheirismo e implantamos a compreensão mútua.

Aos meus irmãos de luz pela orientação e proteção espiritual.

Enfim, agradeço ao SUPREMO SER que com a positividade das ENERGIAS ESPIRITUAIS me deram essa oportunidade de adquirir novos conhecimentos.

Muito obrigado.

PROCESSO BIOTECNOLÓGICO PARA APROVEITAMENTO DE SORO OBTIDO NA PRODUÇÃO DO QUEIJO DE COALHO

RESUMO

O soro de queijo é um subproduto de importante relevância na indústria queijeira. Tendo em vista o elevado volume produzido e sua composição nutricional, o aproveitamento deste produto é de suma importância. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um processo biotecnológico para obtenção de compostos de alto valor agregado através da fermentação do soro de queijo coalho. Foram realizadas fermentações com o soro utilizando a levedura *kluveromices lactis* nas concentrações iniciais de 9,0 g/L e 19,0g/L e com o soro *in natura* (não esterilizado). Em relação às características físico-químicas observou-se que houve acentuado consumo de proteínas e lactose e aumento no teor de acidez total em todas as fermentações realizadas, sendo obtido valores maiores durante a fermentação do soro com a levedura na concentração inicial de 9,0 g/L. Determinou-se a curva de crescimento microbiano para todas as fermentações, onde coletou-se uma amostra de fermentado de cada fase (14, 30 e 62 horas de fermentação) para serem analisadas por cromatografia gasosa acoplada com diversos detectores para identificação de compostos voláteis. Os resultados demonstraram que de 200 a 252 constituintes voláteis foram capturados pelo método de extração *headspace dinâmico*, entre 141 a 235 pelo método líquido-líquido e entre 149 a 301 pelo método de destilação e extração simultânea. Nos voláteis extraídos dos produtos fermentados identificou-se a presença de compostos tais como 2-hexadecenal, ácido octadecanóico, hexadecanamida, 3-hexenol e outros, os quais apresentam custo extremamente elevado no mercado mundial variando de 70,06 a 194,50 US\$/100 mL. Contudo, verificou-se através deste trabalho que a fermentação do soro de queijo coalho usando a *kluveromices lactis* consiste em um processo biotecnológico promissor para a obtenção de compostos voláteis de grande valor comercial.

Palavras chaves: soro de leite, fermentação, *kluveromices lactis*, cromatografia gasosa, compostos voláteis.

BIOTECHNOLOGICAL PROCESS FOR UTILIZATION OF WHEY OBTAINED DURING CHEESE CURD PRODUCTION

ABSTRACT

The whey generated during cheese curd manufacture is a byproduct of great importance for cheese industry. Since a large volume of whey is produced and it is rich in several nutrients, the utilization of this product gains importance. The objective of this work was to develop a biotechnological process for obtaining compounds of higher aggregated values by promoting fermentation of whey from cheese curd manufacture. Several fermentations utilizing whey as a substrate were undertaken by using the yeast *kluveromices lactis* in the initial concentrations of 9.0 g/L and 19.0g/L, and with the non-sterilized whey in its natural form as obtained in the process of manufacture of cheese curd. In relation to physico-chemical characteristics, increase in protein and lactose consumption was observed in all the fermentations undertaken and these values were relatively more when yeast concentration used for fermentation was of 9.0 g/L. The microbial growth curves were constructed for all the fermentations and fermented samples withdrawn characterizing each phase (14, 30 and 62 hours of fermentation) were analyzed in a gas chromatographic system coupled with several detectors for the presence of volatile compounds. The results demonstrated that between 200 to 252 volatile constituents were captured by dynamic headspace method, between 141 to 235 by liquid-liquid extraction and between 149 to 301 by simultaneous distillation and extraction method. In the volatiles extracted from different fermented products, the presence of compounds such as 2-hexadecenal, octadecanoico acid, hexadecanamide, 3-hexenol was revealed and these are relatively costly compounds as their market price varies from 70.06 to 194.50 US\$/100 mL. It could be concluded from the results obtained in this study that the whey fermentation by usage of *kluveromices lactis* is a promising biotechnological process for obtaining volatile compounds of higher commercial values.

Keywords: Whey, fermentation, *kluveromices lactis*, volatile compounds, gas chromatography, mass spectrometry,.

Índice de Tabelas

Tabela 1: Teores de vitaminas do soro	6
Tabela 2: Composição do soro doce e soro ácido	7
Tabela 3: Características físico-químicas do soro de queijo <i>in natura</i>	41
Tabela 4: Características físico-químicas de diversos soros fermentados obtido em horas de fermentação e do soro <i>in natura</i>	70 44
Tabela 5: Parâmetros do crescimento microbiano para as diversas fermentações	45
Tabela 6: Dados quantitativos de número de picos obtidos nos diversos extratos voláteis (HD, LL e DES) analisados de soro <i>in natura</i> e produtos fermentados	47
Tabela 7: Compostos voláteis em soro <i>in natura</i> e produtos fermentados	49
Tabela 8: Comparação das áreas de picos dos fermentados obtidos pelo uso do soro como substrato, tendo o preço estimado como referência	57
Tabela 9: Preços estimados de compostos voláteis relacionados com a presença em fermentados obtidos pelo uso de soro como substrato	60

Índice de Figuras

Figura 1: Produção anual de soro no Brasil	5
Figura 2: Esquema da valorização integral do soro de queijo	14
Figura 3: Esquema de destilação por Likens & Nickerson	36
Figura 4: Esquema de extração por <i>Headspace</i> dinâmico	37
Figura 5: Esquema de extração líquido-líquido	38
Figura 6: Cinética de consumo de proteína	42
Figura 7: Cinética de consumo de lactose	43
Figura 8: Teor de acidez total durante o processo	43
Figura 9: Cinética do crescimento microbiano	44

Nomenclatura

ABIQ – Associação Brasileira das Indústrias de Queijo

CG – Cromatografia Gasosa

DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio

DES – Destilação e Extração Simultânea

DIC – Detector de Ionização de Chamas

DQO- Demanda Química de Oxigênio

EM – Espectrômetro de Massa

FAO – *Food and Agriculture Organization*

FDA- Food and Drug Administration

GRAS – *Generally Recognized as Safe*

IAL – Instituto Adolfo Lutz

ppb – partes por bilhão

ppm – partes por milhão

rpm – rotações por minuto

SUMÁRIO

<u>1.INTRODUÇÃO E OBJETIVOS</u>	1
<u>1.1 INTRODUÇÃO</u>	1
<u>1.2 OBJETIVO GERAL</u>	3
<u>1.2.1 Objetivos Específicos</u>	3
<u>2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u>	4
<u>2.1 O SORO DE QUEIJO</u>	4
<u>2.2 MICROBIOLOGIA DO SORO DE QUEIJO</u>	7
<u>2.2.1 Levedura <i>Kluyveromyces lactis</i></u>	8
<u>2.3. APROVEITAMENTO DO SORO DE QUEIJO</u>	10
<u>2.3.1 Aproveitamento do Soro por Processos Não-Fermentativos</u>	12
<u>2.3.2 Aproveitamento do Soro por Processos Fermentativos</u>	15
<u>2.4 OBTENÇÃO DE PRODUTOS DE ALTO VALOR AGREGADO</u>	20
<u>2.4.1 Microrganismos Produtores de Aromas</u>	23
<u>2.5. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS</u>	25
<u>2.5.1 – Métodos de Extração de Compostos Voláteis</u>	25
<u>2.5.2- Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada com Detectores</u>	28
<u>2.5.3 Identificação dos Compostos Voláteis</u>	30
<u>3.MATERIAIS E MÉTODOS</u>	31
<u>3.1 MATERIAIS</u>	31
<u>3.2 PROCESSAMENTO DO SORO</u>	31
<u>3.2.1 Tratamento do Soro</u>	31
<u>3.2.2 Processos Fermentativos</u>	31
<u>3.2.3 Determinação do Crescimento Microbiano</u>	32
<u>3.2.4 Rendimento e Produtividade em Células</u>	32
<u>3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E QUÍMICA DE PRODUTOS FERMENTADOS</u>	33

<u>3.3.1 - Determinação de Proteínas</u>	33
<u>3.3.2 - Determinação de Gordura</u>	34
<u>3.3.3- Determinação de Sólidos Totais e Resíduo Mineral Fixo</u>	34
<u>3.3.4 - Determinação de Umidade</u>	34
<u>3.3.5 - Determinação de Acidez Titulável</u>	34
<u>3.3.6 – Determinação da Densidade Relativa</u>	35
<u>3.3.7 – Determinação de pH</u>	35
<u>3.3.8 - Determinação de Lactose</u>	35
<u>3.3.9 – Métodos de Extração dos Compostos Voláteis Presentes nos Fermentados</u> ..	35
<u>3.3.9.1 Método de Destilação e Extração Simultânea (DES)</u>	35
<u>3.3.9.2 Método de <i>Headspace</i> Dinâmico</u>	37
<u>3.3.9.3 Método de Extração Líquido-Líquido</u>	38
<u>3.3.10. Análises Cromatográficas</u>	38
<u>3.3.10.1 Identificação e Quantificação de constituintes voláteis</u>	39
<u>4.RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	41
<u>4.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO SORO <i>IN NATURA</i></u>	41
<u>4.2 COMPARAÇÃO ENTRE OS DIVERSOS PROCESSOS FERMENTATIVOS</u>	42
<u>4.2.1 Características físico-químicas dos fermentados</u>	42
<u>4.2.2 Crescimento Microbiano</u>	44
<u>4.3 COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS</u>	46
<u>5.CONCLUSÕES</u>	61
<u>6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	62

CAPITULO 1

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

Um dos presentes desafios da biotecnologia é o desenvolvimento de novos processos para a utilização de resíduos agroindustriais. Os resíduos agroindustriais são gerados no processamento de alimentos, fibras, couro, madeira, produção de açúcar e álcool etc., sendo sua produção, geralmente, sazonal, condicionada pela maturidade da cultura ou oferta da matéria-prima. Como estes resíduos apresentam, em geral, grande concentração de material orgânico, o seu lançamento em águas subterrâneas, superficiais e no solo pode proporcionar grande decréscimo na concentração de oxigênio dissolvido nesse meio, cuja magnitude depende da concentração de carga orgânica e da quantidade lançada, além da vazão do curso d'água receptor (MATOS, 2005).

Há poucas décadas, o processo de transformação do leite em produtos lácteos não levava em consideração os impactos ambientais e sociais associados, permitindo constantemente o surgimento de problemas que, cada vez mais, tornam-se críticos para o bem estar da sociedade, como a miséria e a pobreza, o desemprego, a devastação de solos produtivos, a poluição das águas e do ar, entre outros (SANCHES, 1997).

Durante o desenvolvimento de tecnologias para a melhoria dos processos de industrialização do leite, observou-se a possibilidade do aproveitamento industrial do soro de queijo, o qual tem despertado grande atenção de centros de pesquisas, indústrias e governo. Sendo assim, fica evidente que a busca de soluções para a utilização do soro proveniente da fabricação de queijos é uma tarefa constante, o que desafia os setores da indústria, governo, pesquisa e extensão a contribuir na resolução ou redução do problema, que pode ser não apenas nutricional como também econômico.

Países como Estados Unidos, Austrália, Canadá, Nova Zelândia e nações da União Européia processam este subproduto lácteo e sua utilização em produtos derivados agrega valor à linha de produção da indústria latinicista (SILVA & BOLINI,

2006), representando uma vantagem econômica significativa para as indústrias de laticínios, em razão das propriedades nutricionais e funcionais do soro e de seus componentes (HOMEM, 2003).

No Brasil, os dados sobre a disponibilidade do soro de leite são altamente imprecisos, mas boa parte do queijo é produzida por pequenas empresas que, evitando o custo do tratamento deste efluente e sem fiscalização efetiva das autoridades, opta pela utilização parcial deste subproduto como alimentação animal, descartando o excedente diretamente nos rios (MATOS, 2005).

O soro de queijo é um subproduto de importância relevante na indústria queijeira, tendo em vista o elevado volume produzido e sua composição nutricional. De acordo com Juliano *et al.* (1987), a não utilização racional do soro resultante da fabricação de queijo na indústria de laticínios constitui prática anti-econômica e até mesmo anti-social, devido à carência mundial de alimentos e pela poluição que este produto causa ao meio ambiente.

As aplicações do soro são inúmeras: 50% em alimentação animal, 12% em pastelaria industrial e laticínios, 10% em gelados, biscoitos e aditivos para panificação e 8% em margarinas. Ainda assim, em função dos elevados teores de lactose e sais, apenas cerca de 50% do soro produzido mundialmente é utilizado na formulação de produtos e o restante é tratado como despejo (FRAZÃO, 2001).

Entre os vários constituintes do soro a lactose (em concentrações de 5-6% peso/volume) é o principal responsável pela alta demanda bioquímica, apesar disto apresenta potencial como substrato para uma variedade de microrganismos tais como *Candida pseudotropicalis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis* e outros. Vários pesquisadores têm utilizado esse potencial para a obtenção de extratos de leveduras (“Single cell protein”) como suplemento alimentar para animais e humanos e obtenção da enzima β -galactosidase (lactase) de grande interesse para as indústrias de alimentos, para a obtenção de etanol (SISO, 1996; BAROLI *et al.*, 2001; REVILLION *et al.*, 2003; GHALY & KAMAL, 2004; e LONGUI *et al.*, 2004) e para a obtenção de compostos orgânicos de alto valor agregado tais como álcool isoamílico, álcool 2-fenil etílico, ácido isobutírico, 2-3-butanodiol, 3-hidroxi-2-butanona (acetoína), 2-feniletil acetato, isobutanol e 2-feniletil isobutirato (FABRE, 1995 e JIANG, 1995).

Diante do apresentado, a proposta deste trabalho foi avaliar o potencial do soro de queijo para a obtenção de compostos de alto valor agregado através de processos fermentativos.

1.2 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver um processo biotecnológico para obtenção de compostos de alto valor agregado pela utilização do soro de queijo como substrato.

1.2.1 Objetivos Específicos

- Aproveitar o soro de queijo coalho produzido no setor agroindustrial do Instituto Federal de Ciências e Tecnologias de Sergipe/Campus São Cristóvão para desenvolvimento de processo biotecnológico;
- Realizar experimentos fermentativos com o soro *in natura* e com o soro esterilizado variando-se a concentração inicial de levedura visando à obtenção de compostos de alto valor agregado;
- Identificar os compostos voláteis formados nos processos fermentativos através de técnica de cromatografia gasosa acoplada com diversos detectores;
- Avaliar a aplicação dos compostos de interesse obtidos nos processos fermentativos;

CAPITULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O SORO DE QUEIJO

O soro é um subproduto da indústria de queijos, também denominado por soro de leite. É um líquido opaco amarelo-esverdeado obtido após a precipitação da caseína do leite durante a fabricação de queijos. Seu sabor é ligeiramente ácido ou doce e sua composição depende do tipo e do processo de fabricação do queijo. Este produto representa 85-95% do volume de leite e contém cerca de 55% dos nutrientes do mesmo, representados por proteínas hidrossolúveis, principalmente albuminas e globulinas, sais, gordura e lactose (MORR *et al.*, 1976, SISO, 1996, ZUÑICA *et al.*, 2002).

Um ponto relevante é o fato de que, no Brasil, os dados sobre a disponibilidade do soro de queijo são imprecisos. Entretanto, sabe-se, com certeza, que em torno de 35% da produção de leite no país é destinada à fabricação de queijos (CARVALHO *et al.*, 2005). Tal imprecisão deve-se a produção por pequenas empresas que, evitando o custo do tratamento e sem fiscalização efetiva das autoridades, opta pela utilização parcial deste subproduto na alimentação animal, sendo o excedente descartado (ORCHARD, 1972; VOORBERGEN & ZWANENBERG, 2002).

No Estado de Sergipe estima-se uma produção de soro de aproximadamente 5 toneladas semanais, entretanto não existe nenhum tipo de tratamento para o soro oriundo das diversas linhas de produção de laticínios. Todavia, é imprescindível a apresentação de estudos de viabilidade econômica e ambiental, versando sobre o aproveitamento dos constituintes do soro, na perspectiva de agregar valores a produtos diversos, devido ao elevado valor econômico das proteínas, bem como reduzir o impacto ambiental provocado pela elevada carga orgânica presente neste resíduo (MENEZES, 2007).

De acordo com os dados da Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ), a produção brasileira de soro de queijo tem sido crescente ao longo dos anos como demonstrado na Figura 1. Em 2007, o Brasil produziu aproximadamente 600 mil toneladas de queijo. Levando-se em consideração que o soro representa cerca de 90% de

volume de leite gasto para produzir 1 kg de queijo, pode-se deduzir que são gerados em média, aproximadamente 4,8 milhões de toneladas de soro por ano.

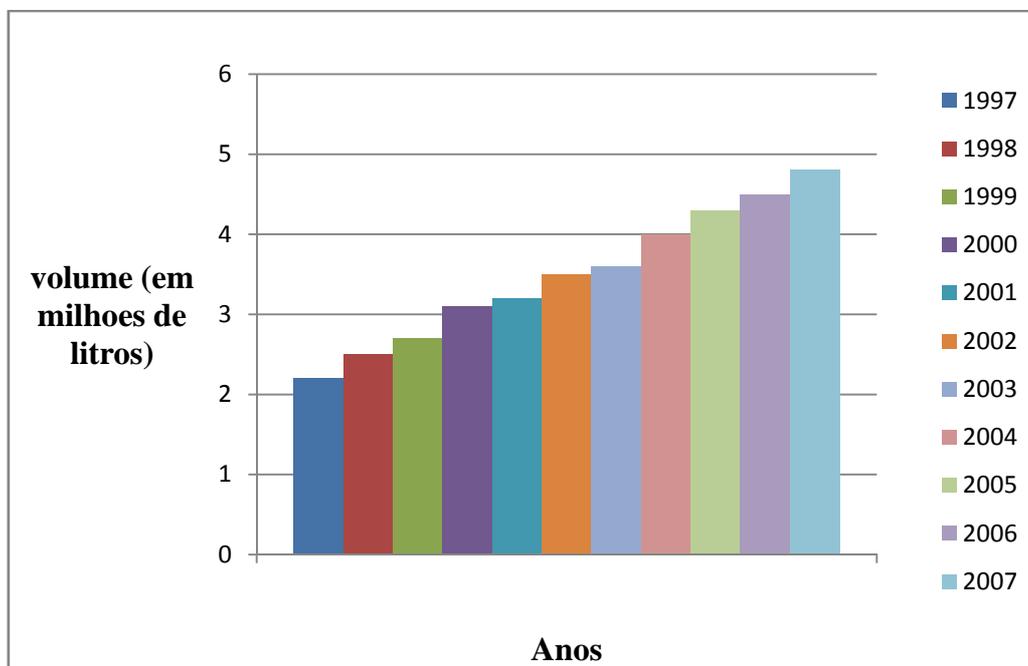


Figura 1: Produção de soro no Brasil, período de 1997 a 2007, considerando o mercado formal (Fonte: Associação Brasileira de Produtores de Queijo (ABIQ, 2007).

Há décadas que o soro doce tem sido conhecido como um produto de alto valor nutritivo, o qual contém 1,0% de proteína de alto valor nutricional, 0,5% de lactose, 0,7% de sais minerais, 0,3% de gordura e vários tipos de vitaminas como mostra a Tabela 1. Com o descarte de soro como resíduo, estima-se que por ano perde-se aproximadamente 48 mil toneladas de proteínas, 24 mil toneladas de lactose, 33,6 mil toneladas de sais minerais, 14,4 mil toneladas de gordura e 5,76 toneladas de riboflavina (FAO, 2007).

Tabela 1: Teores de vitaminas no soro

Vitaminas	Quantidade (mg/Kg)
Tiamina	0,31
Acido fólico	0,07
Niacina	1,18
Riboflavina	0,16
Colina	108,00
Ácido pantotênico	3,94
Biotina	1,50
Cobalamina	0,15
Piridoxina	20,00

Fonte: ABREU (2000).

Hoje o desenvolvimento de mercados utilizando o soro de queijo e frações de soro como ingredientes nos gêneros alimentícios para consumo humano e animal, transformou o então subproduto em um produto valioso para a indústria de laticínios e queijos.

A composição e o tipo de soro produzido na indústria leiteira variam em função dos processos tecnológicos empregados, do leite utilizado e do tipo de queijo fabricado (FURTADO & POMBO, 1988 e MARWAHA & KENNEDY, 1988). De acordo com o método de produção, o soro pode ser classificado em soro doce ou soro ácido. No Brasil a produção de soro é constituída quase que exclusivamente de soro doce, o qual é produzido durante a fabricação do queijo coalho, mussarela, prato, minas frescal, meia cura e outros através da coagulação enzimática das proteínas do leite. O pH do soro doce pode variar entre 5,2 e 6,7. O soro ácido é obtido pela precipitação da caseína do leite, através de ácido láctico e ácido clorídrico, durante a produção de ricota e requeijão (ABREU, 2000). A composição dos soros ácido e doce está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2: Composição do soro doce e soro ácido

Componentes	Soro doce (%)	Soro ácido (%)
Água	93 – 94	94 – 95
Sólidos Totais	6 – 7	5 – 6
Lactose	4,5 – 5	3,8 - 4,2
Proteína (N x 6,38)	0,8 – 1	0,6 – 1
Nitrogênio não protéico (N Total)	22	27
Ácido Láctico	0,1 - 0,2	0,7 - 0,8
Cinzas	0,5 - 0,7	0,7 - 0,8

Fonte: HARPER (1998).

O soro pode ser utilizado na obtenção de produtos como soro em pó, bebida láctea, ricota, concentrado protéico, formulação de alimentos infantis, iogurte, doce de leite e outros; na alimentação animal na forma líquida, condensada ou seca; e em despejo no esgoto após tratamento adequado (CARMINATTI, 2001). O permeado composto de lactose é geralmente descartado. O retentado é formado principalmente por 85% de proteínas e 15% de lactose. As proteínas do soro representam 20% das proteínas do leite, sendo as mais abundantes: β -lactoglobulina (50%), α -lactoalbumina (12%), imunoglobulinas (10%), albumina do soro (5%) e peptonas (0,23%) (SISO, 1996).

O elevado conteúdo de lactose de soro garante sua condição de ser utilizado como fonte de carbono por certos microrganismos, tais como: *Saccharomyces thermophilus*, *Lactobacillus bulgarius*, *Kluyveromyces lactis* e outros (SILVA & CASTRO-GOMEZ, 1995).

2.2 MICROBIOLOGIA DO SORO DE QUEIJO

Um estudo da história do uso de microrganismos para consumo mostra que estes são fontes de enzimas na indústria alimentícia; produtores de substâncias nutritivas; e são utilizados diretamente, na biomassa microbiana, como matéria alimentícia (BRANDÃO, 1987). Em relação aos produtos lácteos a importância dos microrganismos se deve ao fato destes serem os agentes responsáveis pelos sabores,

aromas, defeitos físicos e características desejáveis que aparecessem durante a elaboração destes produtos (TRAVASSOS, 1999).

O soro é um excelente substrato para o crescimento microbiano em virtude da sua composição nutricional. O soro *in natura* contém geralmente microrganismos dos gêneros *Staphylococcus ssp*, *Streptococcus ssp*, *Pseudomonas ssp*, *Acinetobacter ssp*, *Flavobacterium ssp*, *Enterobacter ssp*, *Klebsiella ssp*, *Aerobacter ssp*, *Escherichia ssp*, *Serratia ssp*, *Alcaligenes ssp*, *Lactobacillus ssp*, *Clostridium ssp*, *Bacillus ssp*, *Penicillium ssp* (TRAVASSOS, 1999). Por outro lado pode servir como meio nutriente para o crescimento de microrganismos tais como: *Lactobacillus bulgaris*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Kluyveromyces lactis*. (SCIENKIEWICH & RIEDEL, 1990; SEVERO, 1995 e ABREU, 2000).

Apesar da levedura *Saccharomyces cerevisiae* ser o microrganismo tradicionalmente utilizado em fermentação alcoólica, não é capaz de metabolizar a lactose presente no soro, devido à ausência das enzimas β -galactosidase, a qual hidrolisa este açúcar em glicose e galactose, e permease que permite a entrada da lactose no interior das células (SISO, 1996).

Muitas espécies de leveduras do gênero *Kluyveromyces* tais como *K. lactis*, *K. marxianus*, *K. fragilis* têm demonstrado capacidade de fermentação da lactose presente no soro do queijo, sendo este o microrganismo mais utilizado para a obtenção de etanol a partir deste resíduo (SISO, 1996; BELEM & LEE, 1999; ARAÚJO, 2001; SANTIAGO *et al.*, 2004; SILVEIRA *et al.*, 2005 e KARGI & OZMIHEI, 2006).

2.2.1 Levedura *Kluyveromyces lactis*

Inicialmente, a levedura *Kluyveromyces lactis* foi denominada *Saccharomyces lactis*, mas em 1965 foi agrupada no gênero *Kluyveromyces*, sendo então renomeada *K. lactis*. Em 1984, a classificação da espécie tornou-se *Kluyveromyces marxianus var. lactis*, membro da família Saccharomycetaceae e subfamília Saccharomycetoideae. Verifica-se, no entanto, que o nome *Kluyveromyces lactis* é geralmente utilizado (BONEKAMP & OOSTEROM, 1994). Trata-se de uma levedura ascomiceta muito próxima evolutivamente da *Saccharomyces cerevisiae*.

A *Kluyveromyces lactis* é um microrganismo unicelular, nucleado, que não possui motilidade, pode se reproduzir sexualmente (conjugação) ou assexualmente (fissão), apresenta uma forma ovóide e, tem aplicação industrial por sua capacidade de utilizar a lactose como fonte de carbono e energia, além de crescer em uma ampla faixa de temperatura (30 a 45°C) (BELÉM *et al.*, 1998). O gênero *Kluyveromyces*, assim como a *Saccharomyces* é classificado como termotolerante, que de acordo com o critério de Watson (1987) tem uma temperatura máxima de crescimento de 48°C, contudo estudos de Hughes (1984) relataram que a levedura é capaz de produzir etanol à 40°C e crescer até a 49°C ou mesmo a 52°C dependendo da espécie (BANAT *et al.*, 1992), categorizando-a assim como um microrganismo termofílico.

A levedura *Kluyveromyces lactis* apresenta grande potencial industrial e tem sido utilizada na produção da enzima β -galactosidase para a hidrólise da lactose no leite e seus derivados (LOUVEL *et al.*, 1996). Além dessa aplicação, *K. lactis* possui a capacidade de crescer em soro de queijo, um substrato de baixo custo que é gerado em grandes volumes pela indústria de queijo (NUNES *et al.*, 1993). Tal fato estimula a sua utilização para fins biotecnológicos. Outra vantagem da utilização da *Kluyveromyces lactis* é apresentar um efeito Kluyver negativo para a lactose, isto é, a levedura é capaz de crescer em lactose mesmo na ausência de respiração (SILVEIRA, 2005).

O gênero *Kluyveromyces lactis* tem sido amplamente usado em propostas industriais devido as suas características fisiológicas e a síntese de bioprodutos como, por exemplo: enzimas hidrolíticas, biomassa para indústria alimentícia, ribonucleotídeos, oligossacarídeos, oligopeptídeos e sua alta eficiência na produção de proteínas heterólogas (SOUZA, 2001). Em adição, oferece inúmeras vantagens quanto à operação dos processos industriais, entre as quais pode se destacar: (1) alta velocidade de crescimento, fato que tem grande importância para a indústria alimentícia; (2) aceitabilidade como microrganismo seguro (*GRAS-Generally Recognized as Safe*); (3) alta atividade da enzima β -galactosidase (BELÉM *et al.*, 1998); (4) faixa de temperatura ótima de crescimento em torno de 40 °C, fato que diminui os custos com resfriamento e riscos de contaminação (FURLAN *et al.*, 1995). A levedura pode crescer em substratos como inulina, xilana e pectina que são degradados por enzimas extracelulares. Entretanto, quando a lactose é usada como substrato a sua utilização pela célula é intracelular (ESPINOZA *et al.*, 1992).

A diversidade de processos industriais, relatados na literatura, que empregam a utilização da levedura *K. lactis* demonstram a versatilidade de utilização deste microrganismo. Entre eles está a produção de lactase (MAHONEY *et al.*, 1974 e BALES & CASTILLO, 1979), algumas vezes simultaneamente com inulinase (HEWITT & GROOTWASSINK, 1984) e com pectinases (ESPINOZA *et al.*, 1992). Em todos estes processos o soro de queijo ou sua fração glicídica foram usados como meio de cultura, uma vez que as leveduras do gênero *Kluyveromyces lactis* são capazes de metabolizar lactose, o açúcar presente no soro e assim diminuir sua carga poluente.

Por ser reconhecida como microrganismo GRAS (*Generally Recognized As Safe*), pela FDA (*Food and Drug Administration*), o que aumenta o interesse de seu uso em aplicações na alimentação humana e animal, a *Kluyveromyces lactis* tem sido estudada como um modelo alternativo de células eucarióticas em estudos fisiológicos e genéticos, da mesma forma que vem se estabelecendo como hospedeira de um sistema de expressão para a produção de proteínas heterólogas (SCHAFFRATH & BREUNING, 2000). Enquanto a *Saccharomyces cerevisiae* apresenta metabolismo oxirredutivo predominante sobre o metabolismo oxidativo, a *Kluyveromyces lactis* possui metabolismo oxidativo mais eficiente.

2.3. APROVEITAMENTO DO SORO DE QUEIJO

Nos últimos anos a indústria laticinista tem mostrado um crescente interesse no aproveitamento do soro residual da fabricação de queijos, principalmente por ser um resíduo de alto valor nutricional e altamente poluente. Dos componentes presentes no soro, a lactose e as proteínas solúveis são os mais importantes, os quais conferem ao resíduo uma elevada demanda bioquímica de oxigênio. O soro quando lançado em cursos d'água provoca enorme efeito poluidor (aproximadamente 100 vezes maior que o do esgoto doméstico) pelo consumo de oxigênio que reduz a vida aquática (MIRANDA *et al.*, 2005). Devido à alta quantidade de substâncias orgânicas, representadas principalmente pela lactose (aproximadamente 70% dos sólidos totais) e pelas proteínas (aproximadamente 20% dos sólidos totais) o soro impõe uma Demanda Bioquímica de Oxigênio – DBO entre 30.000 a 60.000 mg de O₂/L e uma Demanda Química de Oxigênio – DQO em torno de 50.000 mg de O₂/L, dependendo do processamento específico utilizado na elaboração do queijo e do conteúdo de lactose.

Comparativamente, cada 5.000 litros de soro de queijo em uma estação de tratamento de esgotos equivalem ao tratamento de despejos de 2.000 pessoas (PONSANO, 1995; REVILLION, 2000; REVILLION, 2002 e ANDRADE & MARTINS, 2002).

A utilização do soro na indústria alimentícia vem sendo estudada por diversos autores, desde o uso como matéria-prima na elaboração de bebidas lácteas, até a utilização de modernas tecnologias para obtenção de produtos específicos e/ou novos a serem utilizados principalmente pelas indústrias alimentícias (COTTON, 1985; CHIAPPINI *et al.*, 1995; FERREIRA, 1997 e FONSECA, 2008). Cada vez mais esse resíduo tem sido usado na elaboração de novos produtos, seja como simples substituto da água ou como ingrediente de funcionalidade reológica ou nutricional (MENEZES *et al.*, 2007). O aumento da produção de soro, a implementação das leis de proteção ao meio ambiente, e o reconhecimento de que o uso do soro líquido para a alimentação animal só é viável, são fatores que tem incentivado a indústria a comercialização deste produto.

Uma vez otimizada a industrialização do soro de queijo, as vantagens serão as seguintes:

- Proteção ao meio ambiente;
- Desenvolvimento de produtos de maior valor fisiológico e nutritivo, inclusive produtos de aplicação farmacêutica;
- Aumento das vendas, através do aumento da produção e da inserção de novos produtos;
- Otimização do aproveitamento dos sólidos lácteos, agregando-se um melhor aproveitamento à matéria-prima e ao valor dos componentes básicos disponíveis;
- Melhora no rendimento;
- Redução das importações de produtos lácteos.

Contudo, para o aproveitamento racional do soro, faz-se necessária a determinação do seu perfil de qualidade microbiológica e físico-química, que indicará quais processamentos serão mais adequados e quais produtos poderão ser obtidos a partir dessa matéria-prima (FERREIRA, 1997 e FONSECA, 2008). Uma solução seria a implantação de cooperativas, mas para tal necessita-se de maiores esclarecimentos e de estímulo para o maior aproveitamento desse subproduto. No Brasil, a principal vantagem em utilizar o soro na sua forma líquida é por ser um ingrediente de baixo custo, contendo 95% de água. Em países como os EUA a valorização ocorre devido aos

5% de nutrientes que podem ser explorados com valor agregado muito maior, como ingrediente saudável para atletas, saciador de apetite e possuidor de propriedades farmacêuticas, entre outros benefícios (CARVALHO, 2005).

Em suma, infere-se que o soro, antes de ser considerado apenas como um componente dos efluentes das indústrias laticinistas, pode e deve ser aproveitado (MATOS, 2005). Sabe-se que os produtos obtidos do soro normalmente alcançam elevado preço no mercado e tem funções, principalmente, de elevar o valor nutritivo, além de conferir características reológicas desejáveis nos produtos em que servem eficientemente como ingredientes (FRAZÃO, 2001). As formas de aproveitamento do soro de queijo podem ser divididas de acordo com o tipo de processamento utilizado como não fermentativas e fermentativas.

2.3.1 Aproveitamento do Soro por Processos Não-Fermentativos

No que concerne ao aproveitamento do soro e seus componentes para fins mais nobres, pode-se citar uma série de utilizações do soro e seus produtos, tais como: soro em pó e concentrado, os quais têm diversas empregabilidades como concentrado protéico e isolados de proteínas, lactose e riboflavina (ABREU, 2000).

Na Idade Média, o soro era utilizado em drogas farmacêuticas como componente de unguentos para queimaduras, como bálsamo para pele ou como porção neutralizante para cabelos, mas raramente era usado na alimentação humana (KOSIKOWSKI, 1979).

A utilização do soro de queijo teve grande evidência em meados do século XIX, na Europa Ocidental, com a criação de mais de 400 “casas de soro”. Por volta de 1940, na Europa Central, foi usado no tratamento de dispepsia, uremia, gota, anemia, artrite, doenças hepáticas e até tuberculose, quando se recomendava a ingestão de cerca de 1.500g/dia de soro (HOLSINGER *et al.*, 1974).

Segundo Homem (2003), o produto acabado resultante do processamento do soro de queijo pode ser usado em vários setores industriais. A indústria farmacêutica utiliza proteínas fracionadas de alto valor biológico, dietético e fisiológico extraído a partir do soro processado. A indústria cosmética aproveita os componentes fósforo-lípídeos do soro, os quais são altamente hidratantes e de alta absorção pela pele, com excelente propriedade saponificante. A indústria química faz uso do soro na produção

de plásticos biodegradáveis, os quais são fabricados a partir de substância de componente lácteos extraídos também do soro de queijo (HOMEM, 2003).

A aplicação de produtos do soro de queijo destinados à alimentação divide-se conforme o destino, se animal ou humana. No setor de alimentação animal, soro e derivados são usados na substituição do leite em pó como suplemento mineral em rações e melaço, com uso de fosfato de cálcio, no lactato de amônio para ração e na produção de leveduras, com biomassa, através de utilização da lactose ou do permeado de soro. Na alimentação humana o aproveitamento do soro começou em 2002, com o lançamento de bebidas lácteas (SENA, 2007). Os produtos do soro são destinados à fabricação de queijos finos, cremes e soro em pó, cujo mercado e aplicação são favoráveis para produtos cristalizados e com, no máximo, 1,25% gordura. O pH do soro em pó também é muito importante, devendo este ser em média 6,1 - 6,3, para uma boa comercialização (HOMEM, 2003). O soro pode ainda ser utilizado como aditivo ou complemento alimentar em leite reconstituído, dietas infantis, gelados, bebidas, carnes processadas e, devido às suas propriedades de geleificação, pode ser utilizado, com vantagem, na substituição da clara de ovo (BATISTA, 2008).

Os métodos como a ultrafiltração têm sido utilizados para separar as proteínas, os componentes mais "nobres" do soro, dos outros constituintes (lactose e minerais). Durante o processo de ultrafiltração, originam-se dois produtos (Figura 2): o concentrado ou retentado, representado pelo material que é retido pela membrana, e o permeado, denominação dada ao material que passa através da membrana (DOMINGUES *et al.*, 2000). Atualmente, a maior parte do soro a nível mundial é processado por ultrafiltração, obtendo-se cerca de 5×10^8 kg/ano de concentrado protéico (PINTADO *et al.*, 2007).

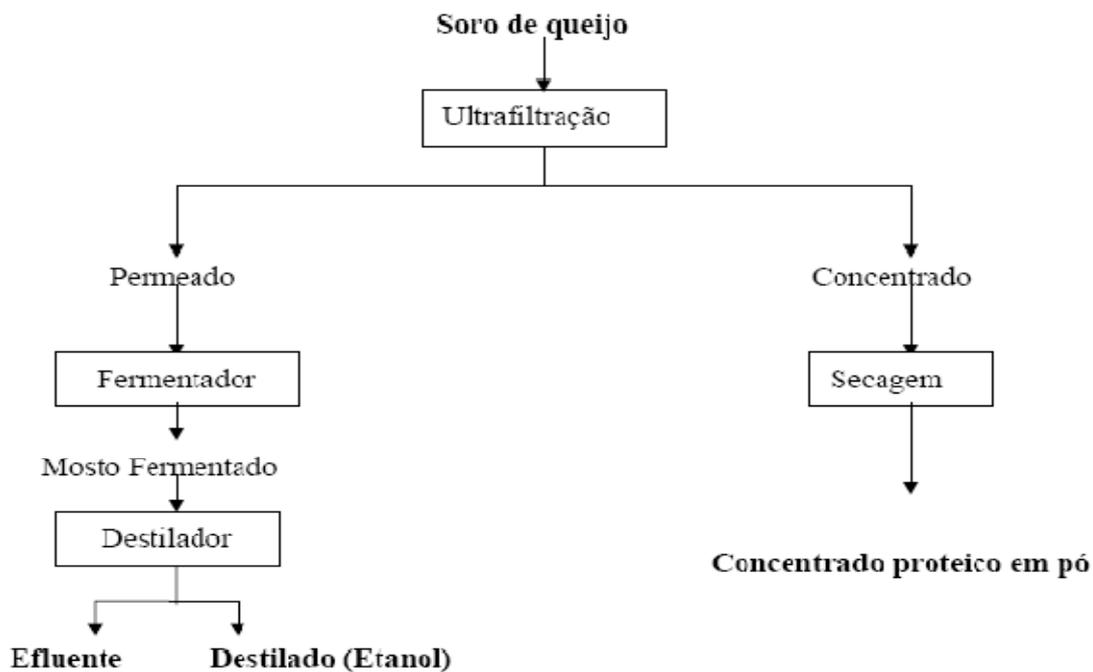


Figura 2: Esquema da valorização integral do soro de queijo (Fonte: DOMINGUES *et al.*, 2000).

O permeado de soro obtido após ultrafiltração pode ser utilizado para diversos fins, como alimentação de animais, produção de lactose, galactose, glucose, álcool, ácido lático ou como constituinte em diversos produtos farmacêuticos e mesmo cosméticos. Para tanto, a pasteurização, a concentração e a fermentação são processos primários empregados na preparação do soro visando seu melhor aproveitamento (ABREU, 2000).

Os concentrados protéicos do soro apresentam característica funcional desejáveis para a indústria de alimentos – boa solubilidade, viscosidade, capacidade estabilizante, emulsificante, espumante, geleificante e boa absorção de água (MATHUR & SHAHANI, 1979). Assim, estas proteínas têm encontrado uma série de aplicações na indústria de alimentos, incluindo sopas desidratadas, molho para saladas, alimentos infantis, dietéticos e geriátricos, sorvetes, queijos, produtos de panificação, confeitarias, iogurtes, carnes, bebidas lácteas e como suplemento alimentar (HIDALGO & CAMPER, 1977). Andrade e Martins (2002) estudaram a influência da adição de féculas de batata-doce sobre a viscosidade do permeado de soro de queijo e observaram o bom potencial destas para o uso como espessante em bebidas lácteas.

O soro concentrado ou seco pode ser usado como aditivo em vários gêneros alimentícios destinados ao consumo humano. A adição do soro em pó em níveis de 0,7 a 1,5% proporcionou ao iogurte melhor viscosidade, menor tempo de coagulação, melhor firmeza e não apresentou sinerese. O produto acrescido de soro é mais nutritivo possuindo maior teor protéico e vitamínico (CRISTIANINI & ROIG, 1987). A adição de concentrado proteico de soro ultrafiltrado em níveis de 5 e 10% na produção de requeijão cremoso resulta em um aumento de rendimento em torno de 10 e 20%, respectivamente, não ocorrendo do ponto de vista sensorial diferença na aceitação do produto (CONDACK *et al.*, 1994).

Segundo Singleton (1972), o sorvete é o produto lácteo que mais usa o soro. A utilização do soro de queijo como substituto do leite em pó na formulação de sorvetes é uma forma de agregar valor a esse resíduo e resulta na diminuição do seu conteúdo de gordura com aceitação sensorial de 88,4% (PADILHA *et al.*, 2006). Tal aceitação foi confirmada por Silva e Bolini (2006) ao avaliarem sorvete formulado com produto de soro lácteo ácido. Bezerra *et al* (2005) substituíram parcialmente água da fabricação de pães por soro de queijo obtido por coagulação enzimática, tendo o produto uma melhoria no desenvolvimento da massa e miolo, textura mais macia e uma acentuada melhoria na coloração da casca. Vargas *et al* (1983) conduziram um experimento substituindo a água de cocção do arroz por soro de queijo integral fresco, reduzindo o grau de desnutrição de um grupo de crianças.

O soro tem também sido usado na fabricação de balas e bombons com o objetivo de fornecer aroma e cor caramelo, que se dá pela reação das proteínas com a lactose e dextrose na presença de altas temperaturas. De acordo com Neurath (1996), a proteína β -lactoglobulina, presente em abundância no soro, pode intervir ativamente na prevenção da transmissão do vírus HIV (BATISTA, 2008).

Além destas aplicações, o soro tem sido utilizado para a obtenção de vários compostos através de processos fermentativos como será relatado a seguir.

2.3.2 Aproveitamento do Soro por Processos Fermentativos

Os produtos fermentados são conhecidos, há milênios. Existem registros de produção de vinho na Síria em 3500 a.c., e de cerveja e pão na quinta dinastia Egípcia, em 2400 a.c., mas a primeira referência data ainda de 7000 a.c. com a produção de

cerveja na Suméria (BROCK *et al.*, 1994). Somente no século XIX, foi reconhecida a natureza biológica dos agentes responsáveis pelos processos fermentativos, os quais foram identificados como leveduras (WALKER, 1998).

Várias pesquisas têm sido realizadas a fim de verificar o uso do soro e do permeado de soro como substrato de microrganismos para fermentação da lactose e obtenção de diversos produtos, como levedura de pão, galactose, etanol e principalmente ácido lático por *Lactobacillus helveticus*. Bosnea *et al.*, (2008) utilizaram uma mistura de cultura de *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* e *Lactobacillus helveticus* para produção de ácido lático a partir do soro de queijo. A bioutilização do soro de queijo para produção de ácido lático foi estudada por Panesar (2007).

Uma destas maiores áreas de pesquisa é a fermentação de lactose por leveduras (Abreu, 2000), sendo a indústria de alimentos infantis um mercado potencial (Kennedy, 1985), bem como a alimentação animal cujo crescimento de leveduras pode ser usado como suplemento protéico de alta qualidade. Embora a produção de lactose a partir do soro tem aumentado constantemente, desde a década de 40, as quantidades de lactose purificadas produzidas mundialmente utilizaram apenas 5% do soro disponível (SISO, 1996).

Usos alternativos da lactose têm sido propostos baseados na fermentação direta deste açúcar ou fermentação dos açúcares obtidos da sua hidrólise, glicose e galactose. Os processos baseados em fermentação através de células microbianas têm sido considerados a alternativa mais proveitosa para a transformação do soro do queijo (SISO, 1996).

A utilização do soro de queijo para a obtenção de produtos por processos fermentativos depende, em geral, da disponibilidade de um microrganismo seguro capaz de converter a lactose na substância desejada e da viabilidade do custo da fonte de carboidratos a ser fermentado (TORRES, 1988). O soro lácteo pode ser fermentado diretamente ou após fracionamento. Soro *in natura*, permeado resultante da ultrafiltração e melaço resultante da cristalização de lactose são os possíveis substratos para fermentações.

Vananuvat & Kinsella (1975), Gilliland & Stewart (1980), Beausejour *et al.*, (1981), Shay & Wegner (1986) e Silva & Castro-Gomez (1995) fermentaram o soro de queijo utilizando a levedura *Kluyveromyces fragilis* e obtiveram produtos com

concentração de proteínas em valores iguais a 58%, 57%, 57,4%, 43,8% e 39,6%, respectivamente (HERNAN-GOMEZ *et al.*, 2000). Abreu *et al.*, (1976), Mahmoud (1980) e Silva & Henan-Gomez (2000) melhoraram a qualidade proteica do soro de queijo através da fermentação utilizando *Kluyveromyces fragilis*.

A fermentação do soro de queijo pode ser empregada para a produção da enzima β -galactosidase, cuja versatilidade, como microrganismo de interesse industrial, tem sido amplamente ilustrada pela diversidade de processos industriais reportados na literatura. Bales & Castilho (1979); Grubb & Mawson (1993); Mahoney *et al.*, (1997); Rech (1998); Martins *et al.*, (1998); Belém & Lee (1999); Ayub *et al.*, (2000); Furlan *et al.*, (2001); Abad *et al.*, (2001); Ribeiro *et al.*, (2004); Marquez *et al.*, (2004) e Barbosa & Araújo (2007), utilizaram soro de queijo para a produção da enzima β -galactosidase através da levedura *K. marxianus*.

A produção de álcool através da fermentação do soro de queijo tem sido estimulada pela crescente necessidade mundial de energia, além de representar uma forma simples de tratamento e disposição de grandes quantidades de soro de queijo produzido pela indústria (KOSIKOWSKI, 1979). Contudo, o aproveitamento do soro do queijo através da fermentação de lactose para a obtenção de etanol tem recebido especial atenção nas últimas décadas e vários processos em larga escala têm sido desenvolvidos. Várias destilarias têm produzido comercialmente etanol a partir do soro lácteo (SISO, 1996). Ozmihci *et al.*, (2006) estudaram os efeitos operacionais nos parâmetros de produção de álcool utilizando o soro de queijo. Ponsanno (1992) e Araújo *et al.*, (2005) produziram 14 g/L, Ferreira (2003), produziu 20 g/L, Zafar *et al* (2006) obtiveram 2,1g/L e Ozmihci *et al.*, (2007) obtiveram um teor de 3% de etanol a partir do soro de queijo utilizando a levedura *K. marxianus*.

Apesar da levedura *Saccharomyces cerevisiae* não metabolizar a lactose, têm surgido nos últimos anos, várias abordagens para a fermentação da lactose por esta levedura. Domingues *et al.*, (1999) obtiveram etanol a partir do permeado de soro de queijo (contendo 50 g/L de lactose) utilizando a *S. cerevisiae*. Andrade *et al.*, (2005) reportaram uma fermentação de 90g de soro de queijo com a levedura *S. cerevisiae* e obtiveram uma produção alcoólica de 3,66 g/L. Suzart *et al.* (2007) produziram 335 mL de aguardente a partir de 20L de soro de queijo inoculado com *S. cerevisiae*.

A fermentação do soro de queijo, utilizando *Escherichia coli* B. ATCC 11303, recombinante KO11, tem permitido produzir etanol em condições de laboratório com

resultados promissores, possibilitando um melhor aproveitamento deste subproduto, apesar da conversão total depender de suplementações apropriadas (LEITE, 1996). Com o emprego de cepas de *E. coli* utilizando o soro de queijo, Guimarães *et al.*, (2000) produziram etanol com rendimento de 96% .

O soro lácteo pode ainda ser aproveitado a partir de sua desproteínização para a produção de bactérias lácticas e por fermentação contínua deste soro utilizando *Penicillium cyclopium*, produzem-se cogumelos (SILVA & CASTRO-GOMEZ, 1995).

Vários processos tecnológicos são desenvolvidos para a conversão fermentativa do soro em diferentes bebidas como vinho, fermentados contendo concentrados de frutas, champanha, cerveja (SEVERO 1995). A fabricação de bebidas e refrescos a partir do soro integral tem sido desenvolvida em diversos países, como Estados Unidos, Japão e Alemanha, adicionando-se ao soro aroma, suco de frutas, grãos de kefir, iogurte, leite desnatado e estabilizante (HOLSINGER *et al.*, 1974; GODINA, 1974 e MANN, 1976). Shirai *et al* (1992) produziram uma bebida fermentada usando duas culturas diferentes a partir de soja, farinha de aveia e soro de queijo em pó, tendo como aditivo açúcar, cálcio e flavorizantes (ABREU, 2000).

No Brasil, a produção de bebidas lácteas é uma das principais opções de aproveitamento do soro do leite, e as mais comercializadas são as bebidas fermentadas, com características sensoriais semelhantes ao iogurte, e bebidas lácteas não-fermentadas. Contudo, o aproveitamento desse subproduto atinge apenas 15% do total de soro produzido (NEVES, 2001 e NAKAMAE, 2004). Lacerda *et al* (2007) prepararam bebidas lácteas empregando fermentação contínua e descontínua, utilizando como substrato, diferentes concentrações de soro de queijo inoculado com culturas comerciais liofilizadas de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*. Shene *et al.*, (2008) extraiu exopolissacarídeos de soro de queijo utilizando *Streptococcus thermophilus*. Teixeira *et al.*, (2006) extraíram dextrose e frutose de soro de queijo utilizando *Leuconostoc mesenteroides*. Papavasiliou *et al.*, (2008) produziram bebida láctea com concentração de 2,5g/L utilizando *K. fragilis*. Soave *et al.*, (2007) estudaram a influência do soro de queijo na vida útil de bebidas lácteas, observando que o soro proporcionou aumento da acidez titulável, portanto menor tempo de fermentação e maior vida de prateleira. Bonassi *et al* (2001) avaliaram as características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas por *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* e preparadas com soro lácteo. Tortelli *et al.*, (2002) desenvolveram uma bebida láctea por

processo fermentativo, utilizando *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, cuja vida útil definida com base nas análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais foi de 10 dias.

Torres *et al.*, (1989) desenvolveram uma bebida, tecnológica e economicamente viável, usando soro de queijo mussarela pasteurizado com adição de açúcar, estabilizante e aromatizante (sabores maçã, morango, abacaxi, limão e pêra), obtendo um valor nutricional acima do esperado.

Segundo Ostlie *et al.*, (2004) a tendência mundial observada nos últimos vinte anos, é a utilização de culturas lácticas na área alimentícia e produtos farmacêuticos. Em virtude disso, vários benefícios à saúde têm sido associados ao consumo de produtos fermentados à base de leite (LACERDA, 2007 e DAVE & SHAH, 1997). É necessário o isolamento e seleção de bactérias lácticas especificadas às condições ecológicas do Brasil, bem como o desenvolvimento de tecnologia de produção dessas culturas. Vários autores têm sugerido o emprego do soro de queijo como constituinte básico de meios de cultura para a produção, em larga escala de bactérias lácticas. (PAOLUCCI, 1991).

O permeado resultante do processo de ultrafiltração do soro pode ser utilizado em processos fermentativos para a produção de ácidos orgânicos: láctico, acético, propiônico e cítrico (YANG, 1995). Na indústria de alimentos o ácido propiônico e seus sais são usados como conservadores em alimentos com alto teor de umidade sendo incorporados para impedir o crescimento de bolores em pães e bolos, na superfície de queijos e carnes (COLOMBAM, ROGER & BOYAVAL, 1993). Neves *et al.*, (1999) produziram ácido propiônico através de processos fermentativos, utilizando *Propionibacterium freudenreichii* cultivada em permeado de soro de queijo. Plessas *et al.*, (2008) produziram ácido láctico utilizando uma cultura mista de *kluveromyces* e *Lactobacillus*.

Recentemente, vários resíduos agroindustriais têm sido usados como substratos para a produção de enzimas. Nascimento & Martins (2006) e Carvalho *et al.*, (2007) utilizaram soro lácteo para a produção de proteases por *Bacillus sp.* Outros produtos como goma xantana, extrato hidrossolúvel de soja tem sido produzido a partir de meios de cultura à base de soro de leite, utilizando o microrganismo *Xanthomonas campestris* (SCHINATTO *et al.*,2001; BENEDET *et al.*, 1999).

Após o processo fermentativo, o soro de queijo que a princípio apresenta a característica de ser um produto energético (pelo alto teor de lactose), passaria a ter um

elevado teor de proteína, decorrente da utilização de sua lactose por microrganismos. Belem *et al.*, (1999) utilizaram *K. marxianus* e obtiveram uma biomassa de baixo teor de açúcares. Tal fato que o caracteriza como de ordem proteico-calórica e possivelmente, com menor potencial poluidor pela redução da DBO (SILVA & CASTRO-GOMEZ, 1995). Ghaly *et al.*, (2004) desenvolveram uma fermentação aeróbica com *K. fragilis* reduzindo assim o potencial de poluição das proteínas contidas no soro de leite.

Pastore *et al.*, (2006) selecionaram a *kluveromyces* entre outros microrganismos pectinolíticos para a produção de aromas frutais a partir de resíduos provenientes de agroindústrias. Teixeira *et al.*, (2008) caracterizaram compostos voláteis produzidos na fermentação alcoólica do soro de queijo.

2.4 OBTENÇÃO DE PRODUTOS DE ALTO VALOR AGREGADO

A utilização de microrganismos em alimentos, com o propósito de produzir aromas, já existe há centenas de anos. Primeiramente, seu uso objetivava o aumento de vida de prateleira, ocasionado pelos processos fermentativos (a conversão do leite em iogurte, por exemplo). Entretanto, em alimentos e bebidas fermentadas, a ação microbiana não apenas aumenta a vida de prateleira, mas também auxilia a produção de aromas característicos (GATFIELD, 1995).

Os compostos químicos responsáveis pelos aromas característicos são: álcoois, ácidos, ésteres, cetonas, lactonas, aldeídos (GATFIELD, 1995), e outras moléculas complexas que resultam do metabolismo secundário de plantas (HAMILTON-EMP *et al.*, 1996) ou que podem ser obtidas de fontes animais. Certos fungos, leveduras e bactérias também possuem potencial para o metabolismo secundário e podem produzir aromas e fragrâncias (ARMSTRONG & BROWN, 1994; WELSH, 1995; KOGAN & FREEMAN, 1994 e MANLEY, 1995).

As bactérias, fungos e leveduras podem servir como biocatalisadores na produção de produtos naturais. Tais microrganismos, através de seus sistemas enzimáticos, alteram metabolicamente as estruturas de uma ampla faixa de compostos orgânicos. As enzimas microbianas são capazes de realizar reações de biossíntese ou de degradação; podem também fazer biotransformações, que podem conferir benefícios aos microrganismos (SARIASLANI & ROSAZZA, 1984).

A Organização Internacional da Indústria de Aromas separa em quatro classes as substâncias aromatizantes: a primeira classe é a de materiais naturais obtidos de plantas ou de animais; a segunda refere-se aos concentrados de aromas naturais ou de substâncias puras obtidas por métodos físicos; a terceira são substâncias aromatizantes “idênticas às naturais”, porém obtidas por síntese química ou através de reações químicas desde a matéria-prima; e a última são substâncias aromatizantes artificiais que são compostos químicos sintéticos, as quais não foram identificadas como componente natural de um alimento (HEATH & REINECCIUS, 1986 e HERRÁIZ, 1990).

O uso de microrganismos pode oferecer um método alternativo para a produção de aromas e fragrâncias naturais (SCHARPF *et al.*, 1986), pois apresentam possibilidades para produção rápida e controlada dos compostos, além de apresentarem um sistema simples de estudo das vias biossintéticas, que estão envolvidas na formação de compostos voláteis (KEMPLER, 1983). Utilizam matéria-prima de baixo custo e de fácil aquisição para produção de substâncias que podem ser aplicadas em diversas indústrias, principalmente na indústria alimentícia.

Os compostos voláteis podem ser formados a partir de diferentes vias metabólicas de lipídios. Estas vias incluem a β -oxidação, clivagem de hidróxiácidos (lactonas) e oxidação por enzimas lipoxigenases. Enquanto os produtos primários são aldeídos e cetonas, várias oxidações, reduções e esterificações também fornecem quantidades substanciais de ácidos, álcoois, lactonas e ésteres (HEATH & REINECCIUS, 1986 e TRESSL & ALBRECHT, 1986).

Em geral, compostos voláteis são metabólitos secundários, isto é, são substâncias produzidas pelo microrganismo, mas que não são essenciais para o seu metabolismo (ABRAHAM *et al.*, 1993; JIANG, 1995). Os ésteres formados por fungos e leveduras são exemplos de metabólitos secundários. A produção de ésteres seria o mecanismo responsável pela remoção de ácidos e álcoois da célula e do meio, pois, se houvesse um acúmulo destes compostos, poderia ser tóxico para a célula (SCHARPF *et al.*, 1986 e LATRASSE & DAMERON, 1988).

Entre os compostos mais importantes na indústria de aromas de alimentos destacam-se os ésteres, que conferem diversos aromas de flores e frutas como também conferem aroma a alimentos fermentados. Várias leveduras do gênero *kluuveromices* produzem acetato de etila a partir de glicose ou de etanol. A *kluuveromices* sp. produz

baixas concentrações de acetato de etila, entretanto em quantidades significativas de éster (ARMSTRONG, 1986).

Os ésteres são compostos importantes de aromas de frutas e os mesmos estão presentes em baixas concentrações, em torno de 1 a 100 ppm. Alguns microrganismos são capazes de converter 3-metilbutil a 3-metilbutirato, que resulta em um aroma de maçã. Já a formação de “off-flavors” em leites pasteurizados e queijos, é devido à produção de butirato de etila e hexanoato de etila por certas bactérias ácido-lácticas (JANSSENS *et al*, 1992). As leveduras convertem álcoois em seus acetatos correspondentes, com um alto rendimento (mais de 90 % para 3-metil-butilacetato) (GATFIELD, 1988 e WELSH, 1995).

A produção de ácidos via microrganismos é importante para o aroma de muitos alimentos fermentados. Um ácido produzido por microrganismos que merece destaque é o ácido láctico. O ácido láctico é opticamente ativo e pode existir na forma L, D ou em uma mistura racêmica (opticamente inativa), dependendo apenas do microrganismo envolvido na sua síntese (HEATH & REINECCIUS, 1986 e ALBERTAZZI *et al.*, 1994).

Outros ácidos também podem ser formados durante a fermentação. A maioria dos microrganismos possui lipases que atacam os triglicerídeos, formando glicerol, monoglicerídeos, diglicerídeos e ácidos graxos livres. Os ácidos podem também ser derivados da desaminação de aminoácidos. Os produtos são ácidos de cadeia alifática e ácidos aromáticos (HEATH & REINECCIUS, 1986).

Os álcoois têm a menor contribuição no aroma, a menos que estejam presentes em concentrações relativamente altas (ppm) ou sejam principalmente os insaturados, como é o caso do 1-octen-3-ol. Os álcoois podem surgir da via metabólica primária de um microrganismo ou pela redução de um composto carbonila em seu álcool correspondente (HEATH & REINECCIUS, 1986).

As cetonas são compostos importantes no aroma de “*blue-cheese*”, nos quais as cetonas do tipo 2-alcanonas são responsáveis pelo aroma e sabor típicos do queijo Roquefort. Os concentrados resultantes podem ser usados, por exemplo, em produtos de queijos, nos quais o aroma foi perdido durante o processamento térmico. Outras aplicações são em biscoitos, sopas e caldos.

A produção destes voláteis varia em função de fatores químicos, físicos e biológicos. As condições de cultivo, tais como composição do meio (fonte de carbono,

nitrogênio e outros elementos), pH, tempo de fermentação, temperatura de incubação, agitação e aeração, foram identificados como fatores determinantes do tipo e quantidade dos compostos de aromas produzidos, além da linhagem do microrganismo (SARIASLANI & ROSAZZA, 1984; ARMSTRONG & BROWN, 1994; GATFIELD, 1988; SCHARPF *et al.*, 1992; JANSSENS *et al.*, 1992 e WELSH, 1995). Estas variáveis podem estar envolvidas nos mecanismos fisiológicos que influenciam nos tipos e quantidades dos produtos formados pelos microrganismos (SARIASLANI & ROSAZZA, 1984).

Atualmente, os compostos voláteis aromáticos utilizados industrialmente são obtidos por via química ou extração de fontes naturais como plantas ou algas. Porém, devido à preocupação com o uso de aditivos químicos nos alimentos, houve um crescente interesse nos compostos obtidos naturalmente por processos biotecnológicos e algumas patentes têm sido registradas nos últimos anos. Comercialmente, são usados como corantes alimentícios e em suplementos nutricionais, com um mercado global estimado em US\$ 935 milhões para 2007 (FRASER & BRAMLEY, 2006) e são considerados precursores de fragrâncias de algumas flores (SÁNCHEZ-CONTRERAS *et al.*, 2000), coloração específica e fotoproteção (MARASCO & SCHMIDT-DANNERT, 2003).

O método de extração de compostos de aroma produzidos por fermentação vem sendo amplamente utilizado na análise de compostos fenólicos (BUCHHOLZ & PAWLISZYN, 1994), componentes responsáveis pelo aroma de frutas e suco, e voláteis de folhas e/ou flores de plantas (KATAOKA *et al.*, 2000; ZINI, 2002).

2.4.1 Microrganismos Produtores de Aromas

Os primeiros relatos de microrganismos produtores de aromas datam de 1970, quando Tahara *et al.* (1975) avaliaram a produção de aromas por *Sporobolomyces odorus*. Os compostos identificados foram: metanol, etanol, isobutílico, n-butílico, isoamílico, namílico, benzílico, feniletílico, formaldeído, acetaldeído, benzaldeído, fenil-acetaldeído, acetona, metil-etil-cetona, formiato de etila, acetato de etila, di-n-butil ftalato, g- decalactona, ácido 4-hidroxi-cis-6-dodecanóico e lactona (LANZA *et al.*, 1976).

Fabre *et al.* (1995) cultivaram *Kluyveromyces marxianus* em um meio definido e verificaram a formação de um forte aroma de banana, que provavelmente seja devido à produção de acetato de isoamila. Os resultados revelaram que a biossíntese de ésteres ocorrem após 70 horas de fermentação. Em outras culturas de *K. lactis*, os compostos predominantes foram: álcool isoamílico, álcool 2-fenil etílico e ácido isobutírico, com 180 mg/L, 400 mg/L e 290 mg/L, respectivamente.

Drawert & Barton (1978) relataram o processo de biossíntese de monoterpenos (citronelol, linalol e geraniol) a partir de glicose, pela levedura *Kluyveromyces lactis*. Jiang (1995), nos estudos dos voláteis produzidos por *K. lactis* em meio líquido sob agitação, identificou os compostos predominantes: álcool isoamílico, álcool 2-fenil etílico, 2-3-butanodiol, 3-hidroxi-2-butanona (acetoina), 2-feniletil acetato, isobutanol e 2-feniletil isobutirato. Verificou também que os voláteis aumentam com o aumento da biomassa, indicando que o metabolismo secundário pode ter começado no estágio inicial do crescimento.

Neto & Pastore (2001) selecionaram microrganismos produtores de gama-decalactona, utilizando o óleo de mamona (composto por 80 % de ácido ricinoléico), hidrolisado pela lipase de *Alcaligenes* sp, como precursor na produção de gama-decalactona em meio de cultivo submerso. Duas linhagens identificadas como *Geotrichum* sp e *Geotrichum fragrans* foram selecionadas como produtoras de gama-decalactona, apresentando produção máxima de 370 mg/L e 650 mg/L, respectivamente, em meio de cultura composto de óleo hidrolisado de mamona, na concentração de 5 %, 1 % de glicose e 1 % de autolisado de levedura, em 96 horas de cultivo à 200 rpm e temperatura de 30 °C em pH de 6,0.

Wendhausen *et al.* (2001) selecionaram microrganismos do gênero *Candida* (*Candida oleophila* e *Candida guilliermondii*) para a produção de gama-decalactona. O meio de biotransformação era composto de ácido ricinoléico (5 g/L) e extrato de carne (20 g/L). Apenas a levedura *Cândida guilliermondii* mostrou consumo de ácido ricinoléico com a formação de um fermentado com aroma de frutas.

Medeiros (2008) estudou a produção de compostos voláteis aromáticos por *Kluyveromyces marxianus* em fermentação no estado sólido, utilizando bagaço de mandioca e farelo de palma forrageira como substrato. Foram identificados nove compostos entre os quais etanol, acetaldeído, acetato de etila e acetato isoamila. A

maior concentração foi de 800 $\mu\text{mol/L}$, em experimentos com bagaço de mandioca sem aeração.

2.5. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS

2.5.1 – Métodos de Extração de Compostos Voláteis

O isolamento dos compostos voláteis consiste numa etapa crítica devido a sua sensibilidade. Sabe-se que qualquer modificação causada na amostra inicial, não poderá representar o perfil autêntico de seus componentes de aroma. É necessário utilizar técnicas de preparação da amostra, antes da sua introdução em um instrumento analítico. Devem-se incluir etapas de isolamento e enriquecimento dos analitos em estudos, objetivando a eliminação dos interferentes e o ajuste da concentração para um limite mínimo detectável.

Existem várias técnicas de isolamento, nas quais os procedimentos têm suas limitações, como tempo e temperatura, favorecendo a degradação e a perda dos compostos de interesse, além da introdução de artefatos, sendo considerados como pontos críticos da análise. Para minimizar esses pontos críticos, duas abordagens na pesquisa do *flavor* podem ser empregadas. A primeira seria a abordagem por análise total, utilizando o sistema de destilação e extração simultâneas (DES), de acordo com o método desenvolvido por LIKENS & NICKERSON (1964). O sistema proposto visa minimizar a degradação dos compostos voláteis de interesse e evitar a introdução de artefatos através de precauções simples, tais como a redução do tempo de análise e a utilização de pouca quantidade de solvente orgânico. No entanto, devido ao emprego de calor, perda ou modificações significativas na composição de voláteis podem ocorrer, assim como os contaminantes presentes no solvente podem afetar a composição do isolado.

A segunda abordagem seria a análise por *headspace*, onde uma amostra (líquida ou gasosa) é substituída pela análise da fase gasosa em equilíbrio com a fase líquida ou sólida da amostra. Quando a concentração da amostra em interesse é muito baixa, inferior ao limite de detecção do detector, o enriquecimento da amostra torna-se necessário (GOBATO & LANÇAS, 2001). Assim sendo, o *headspace* é uma técnica

excelente e sensível, utilizada principalmente para analisar compostos altamente voláteis presente nos analitos.

Dois tipos de análise do *headspace* são empregados: *headspace* estático e *headspace* dinâmico. No *headspace* estático, a amostra é mantida num recipiente fechado até que a matriz atinja um equilíbrio termodinâmico com os compostos voláteis entre a fase líquida e a fase gasosa, a uma determinada temperatura, geralmente ambiente. Uma alíquota da fase gasosa é recolhida e injetada no cromatógrafo gasoso. Devidas às pressões parciais significativamente menores do que a pressão parcial do vapor de água, os analitos de interesse estão em concentrações geralmente baixas, obtendo-se cromatogramas pobres, limitados a uns poucos compostos voláteis. Como a injeção de um volume maior é um procedimento contrário à prática cromatográfica, os compostos voláteis do *headspace* devem ser concentrados. Este método requer um controle rígido da temperatura de equilíbrio, tempo e pressão (GOBATO & LANÇAS, 2001).

No *headspace* dinâmico, a amostra é obtida pela captura de voláteis do efluente gasoso, realizado em um sistema a vácuo ou pela passagem de um gás inerte. Uma armadilha, recheada com materiais adsorventes, coleta e concentra os compostos voláteis. Nesses sistemas, as condições ótimas de coletas dos compostos voláteis são dependentes do tempo de captura e da dimensão da armadilha. Além disso, o fluxo do gás inerte ou a pressão reduzida do sistema devem ser cuidadosamente estabelecidos, para não ocorrer *breakthrough*, ou seja, a passagem dos compostos voláteis pelo polímero. Posteriormente, os voláteis capturados são eluidos da armadilha por um solvente orgânico adequado, ou então são dessorvidos termicamente na coluna do cromatógrafo gasoso (THOMANIZI & FRANCO, 2000). Esta técnica apresenta a vantagem sobre a amostragem do *headspace* estático em virtude da obtenção de uma amostra mais enriquecida, sendo proporcional ao volume da fase gasosa amostrada.

A técnica de *Purge e Trap* é uma técnica cromatográfica de *headspace* dinâmico relativamente recente para o alcance comercial, embora a sua primeira descrição acontecesse em 1967 (ADLARD & DEVENPORT, 1983). Esta técnica é aplicada principalmente para determinação de compostos orgânicos de baixa concentração. O princípio deste método é simples. Compostos orgânicos voláteis numa matriz são removidos pela purga da amostra através de um gás inerte, onde os compostos orgânicos são “presos” na “armadilha” ou *trap*. Os compostos orgânicos são então

desorvidos termicamente no gás “carregador” para o cromatógrafo, onde são separados e detectados pela forma usual.

Enquanto na análise total praticamente não houve avanços após a introdução do aparelho de Likens & Nickerson (1964), na análise do *headspace* verificou-se um grande desenvolvimento com relação aos polímeros porosos, utilizados na captura de voláteis nas armadilhas.

O *trap* (armadilha) é o local onde os compostos voláteis são retidos e concentrados e o mesmo pode ser constituído por uma substância adsorvente (polímero poroso) ou um condensador (com ou sem solvente). A maioria dos sistemas prefere usar o *trap* de polímero poroso para concentração de compostos voláteis. Os principais polímeros utilizados são Porapaq Q (copolímero de etilvinilbenzeno divinilbenzeno) e o Tenax (polímero baseado no óxido de 2,6-difenil-fenileno). Williams *et al.*, (1978), concluíram que o Tenax apresenta melhores resultados do que o Porapaq Q, para os compostos orgânicos na forma geral. Outras vantagens do Tenax é a facilidade do emprego de temperaturas altas (260°C) de acondicionamento e manter os compostos voláteis do *headspace* sem que ocorram alterações.

A análise do *headspace* não depende apenas da concentração e da pressão de vapor dos compostos voláteis presentes, mas de todos os componentes da matriz, principalmente lipídios, carboidratos e proteínas, os quais exercem influência na estabilidade e liberação dos compostos responsáveis pelo aroma (YANG & PEPPARD, 1994).

Weurman (1969) relatou que as duas abordagens tinham méritos específicos, bem como as suas falhas e limitações. Nenhuma delas, isoladamente, ou mesmo quando consideradas juntas, poderiam resolver todos os problemas da pesquisa do sabor, pois há três aspectos básicos do aroma em alimentos. O primeiro aspecto seria a composição qualitativa e quantitativa dos componentes voláteis do próprio alimento, o que requer a análise total, formando a base da compreensão do aroma. O segundo, seria a composição do vapor sobre e em equilíbrio com o alimento, como é percebido pelo olfato, favorecendo a análise por *headspace*. E, por último, o terceiro aspecto compreende o estado físico e a distribuição dos componentes voláteis no alimento, sendo considerado como aroma final, pois relaciona a composição dos voláteis sobre o produto e a composição total dos seus voláteis. A diferença, nesse caso, seria causada

pelos vários graus nos quais os voláteis estariam dissolvidos na fase lipídica ou aquosa do alimento.

De acordo com Larráyo *et al* (2001), a técnica de headspace dinâmico extrai compostos mais voláteis que a técnica de extração e destilação simultânea. Por outro lado, a DES é mais eficiente para extração de fenóis, ácidos, lactonas e aldeídos pesados, cetonas, alcoóis e ésteres. Estes dois métodos de extração são complementares, sendo desejável combinar as duas técnicas a fim de detectar o maior número de compostos voláteis.

Silva & Neves (1997), afirmam que o uso das duas técnicas é uma maneira complementar e vantajosa. O *Purge e Trap* tem a desvantagem de não permitir a repetição da injeção da amostra, enquanto a amostra concentrada é pendente da capacidade de absorção do *trap*. A DES permite o uso do extrato obtido para um número maior de análises, o qual facilita calibrar dois parâmetros, volume de injeção e nível de concentração do extrato, a fim de obter a captura de um maior número de compostos voláteis, enquadrando dentro da faixa de detecção e sensibilidade do detector. Gobato & Lanças (2001) ressaltam que *Purge e Trap* possui a vantagem de um maior volume de amostra, onde o *trap* age como um concentrador das amostras.

Há a necessidade de se investigar os constituintes voláteis por técnicas diferenciadas, pois fatores como a temperatura, a velocidade de liberação dos voláteis pela matriz e seus coeficientes de partição entre a fase aquosa majoritária (amostra) e a fase gasosa (ambiente) provocam profundas modificações no perfil qualitativo e quantitativo destes extratos (LOPES *et al.*, 1999).

2.5.2- Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada com Detectores

As substâncias voláteis ou semivoláteis (termo estáveis) são preferencialmente analisadas por cromatografia gasosa, devido ao grande poder de separação desta técnica, sendo capaz de separar compostos orgânicos com isomeria plana similar, isomeria óptica e homólogos com grande pureza (VILEGAS, 1997). A cromatografia gasosa é um procedimento físico utilizado para se separar uma amostra em seus componentes individuais. A base para esta separação é a distribuição da amostra entre duas fases:

uma estacionária e uma fase gasosa móvel. A amostra é vaporizada e carregada pela fase móvel (ou gás de arraste, uma vez que se trata de um gás inerte cuja finalidade é transportar as moléculas separadas) através da coluna onde se encontra a fase estacionária (MC NAIR, 1997). Um sistema muito utilizado para análise de amostras é o uso de um espectrômetro de massas, que funciona como detector, acoplado a um cromatógrafo a gás.

Durante a queima de um composto orgânico, são formados diversos íons e como conseqüência, a chama resultante torna-se condutora de eletricidade. O funcionamento do DIC, provavelmente o detector mais usado em CG, baseia-se neste fenômeno. O gás de arraste saindo da coluna cromatográfica é misturado com H₂ e queimado com ar ou O₂. A chama resultante fica contida entre dois eletrodos, polarizados por uma voltagem constante. Como a chama de H₂ forma pouco íons, ela é um mau condutor elétrico e quase nenhuma corrente passa entre os eletrodos. Ao eluir um composto orgânico, ele é queimado e são formados íons na chama, que passa a conduzir corrente elétrica. A corrente elétrica resultante, da ordem de PA, é amplificada e constitui o sinal cromatográfico (COLINS *et al.*, 1997).

Neste sistema conhecido como cromatografia gasosa acoplada com o detector de espectrômetro de massa (CG/EM), o gás de arraste emergente do cromatógrafo é transferido através de uma válvula dentro de um tubo, onde ele passa por uma fenda molecular. Uma parte do fluxo de gás é então transferida para dentro da câmara de ionização do espectrômetro de massas. Cada substância eluída da coluna cromatográfica é bombardeada com uma fonte ionizante, conseguindo fragmentar o composto em uma grande diversidade de íons, que são separados e registrados de acordo com suas razões de m/z (COLINS *et al.*, 1997).

No sistema CG/EM é necessário o uso de uma rápida varredura pelo espectrômetro de massas. O instrumento deve determinar o espectro de massa de cada componente na mistura, separado pela coluna cromatográfica, antes mesmo do próximo componente entrar na câmara de ionização, de maneira que uma substância não seja contaminada pela próxima fração antes que seu espectro tenha sido obtido e os dados gravados. Com um sistema CG/EM é possível também analisar uma mistura e conduzir uma busca em uma biblioteca de dados existente no sistema, podendo desta maneira procurar cada componente da mistura por tentativas e comparações (INNOCENTINI, 2000 e PEDROSO *et al.*, 2008).

2.5.3 Identificação dos Compostos Voláteis

A combinação do aperfeiçoamento nas separações dos componentes de misturas complexas e substituição da difícil interface entre o cromatógrafo e o espectrômetro de massa, através da simples introdução no final das colunas de sílica fundida diretamente na fonte de íons, proporcionou a identificação dos compostos voláteis, principalmente dos compostos presentes em quantidades diminutas (ppm, ppb, etc).

Os espectrômetros de massa fornecem estabilidade e sensibilidade adequadas para a análise de compostos voláteis. As moléculas no estado são bombardeadas, sob vácuo (10^{-8} atm), por um fluxo de elétrons produzidos por filamentos de Tungstênio ou Rênio. O impacto de elétrons (70 eV ou 1600kcal/mol) produz íons, que são fragmentos da molécula, os quais são analisados em um analisador de massas. Os três analisadores de massas mais frequentemente citados compreendem o filtro de massa quadrupolar, *time of light* (TOF) e *ion trap* (STEVEN, 1957; IBÁÑEZ *et al.*, 1998; SARAIVA, 2003 e SANTOS, 2008).

Os parâmetros cromatográficos utilizados para a identificação dos compostos são baseados nos tempos e índices de retenção, em conjunto com as informações do espectro de massa (BERGER, 1995).

Um índice de retenção sistemático, proposto por Kovats, permite expressar tempo de retenção dos compostos de interesse através de uma escala uniforme, a partir de padrões de alcanos em uma determinada fase estacionária. Os índices de retenção têm sido utilizados na identificação dos compostos, através da comparação da ordem de eluição experimental com a ordem de eluição presente na literatura (ETTRE, 1973).

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

A matéria prima utilizada no presente trabalho foi o soro resultante da produção de queijo “Tipo coalho” fabricado e gentilmente cedido pelo setor de Agroindústria do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Sergipe/Campus São Cristovão.

A amostra foi coletada diretamente do tanque de produção, logo após o corte da massa. O soro coletado foi colocado em recipientes plásticos, previamente sanitizados, refrigerado e transportado para o Laboratório de Tecnologia dos Alimentos do Departamento de Engenharia dos Alimentos da Universidade Federal de Sergipe.

A levedura *Kluyveromyces lactis* foi adquirida da Divisão de Recursos Microbiano da UNICAMP (Campinas-SP) e conservada em meio ágar batata dextrose (PDA), mantendo-se sob refrigeração até sua utilização.

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.2 PROCESSAMENTO DO SORO

3.2.1 Tratamento do Soro

O soro doce de queijo (10L) foi inicialmente filtrado em papel de filtro, e em seguida, esterilizado em autoclave a 121⁰C e 1atm por um período de 15 minutos. O soro estéril foi congelado até o momento da utilização.

3.2.2 Processos Fermentativos

As fermentações em sistema de batelada foram realizadas em Erlenmeyers fechados de 1000 mL, misturando-se soro (pH inicial de 5,5) e a levedura, mantendo

sob agitação moderada à temperatura de 35⁰C. As quantidades de soro e células utilizadas nos experimentos foram as seguintes:

- ✓ Fermentação 1: 500 mL de soro estéril e levedura (concentração de 9,0 g/L);
- ✓ Fermentação 2: 500 mL de soro estéril e levedura (concentração de 19,0 g/L) e
- ✓ Fermentação 3: 500 mL de soro *in natura* (contendo microbiota natural: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, coliformes e outros, segundo Travassos, 1999).

A cada 8 horas de fermentação, uma alíquota de 30 mL de fermentado foi retirada e centrifugada a 1200 rpm por 15 minutos. As células separadas foram utilizadas para determinação de biomassa seca e o sobrenadante foi submetido às análises físico-químicas e cromatográficas. As fermentações foram conduzidas até obter a diminuição do crescimento celular (região de declínio na curva de crescimento microbiano).

3.2.3 Determinação do Crescimento Microbiano

O acompanhamento do crescimento celular da levedura *Kluyveromyces lactis* ao longo da fermentação foi realizado pela determinação da biomassa seca.

As células separadas por centrifugação foram secadas em estufa à 105⁰C até obtenção de peso constante. Os valores em termos de biomassa seca foram utilizados para a obtenção da curva de crescimento microbiano (AQUINO & RAMALHO, 2008).

3.2.4 Rendimento e Produtividade em Células

O rendimento em células ($Y_{x/s}$) foi calculado através da equação a seguir :

$$Y_{x/s} = \frac{X_m - X_0}{S_0 - S} \quad \text{Eq. 1}$$

Onde: X_m = Concentração máxima de células;

X_0 = Concentração inicial de células;

S = Concentração final de substrato;

S_0 = Concentração inicial de substrato.

A produtividade em células (P_x) foi calculada utilizando-se a seguinte equação:

$$P_x = \frac{X_m - X_0}{T_{fp}} \quad \text{Eq. 2}$$

Onde: X_m = Concentração máxima de células;

X_0 = Concentração inicial de células;

T_{fp} = Tempo total da fermentação.

3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E QUÍMICA DE PRODUTOS FERMENTADOS

As análises físico-químicas efetuadas no soro *in natura* e nos fermentados foram realizadas no Laboratório de Bromatologia do Instituto Tecnológico e de Pesquisas do Estado de Sergipe enquanto que as análises cromatográficas dos fermentados foram realizadas no Laboratório de Análises Cromatográficas e de Flavor (LAF) da Universidade Federal de Sergipe.

3.3.1 - Determinação de Proteínas

O soro de queijo e os fermentados foram analisados quanto ao teor de proteínas através do método de Kjeldahl, o qual consiste inicialmente na oxidação da amostra pelo ácido sulfúrico, a quente, na presença de catalisadores que rompem a estrutura protéica para a liberação do nitrogênio sob a forma de sais de amônio. Ao resíduo obtido foi adicionado hidróxido de sódio, liberando amônia a qual é destilada e captada por uma solução de ácido bórico. O metaborato de amônio formado foi titulado com ácido clorídrico, representando a fração nitrogenada que se deseja determinar. O fator de conversão nitrogênio/proteína utilizado foi de 6,38 de acordo com a metodologia do IAL – Instituto Adolfo Lutz (2005).

3.3.2 - Determinação de Gordura

O soro de queijo e os fermentados foram analisados quanto ao teor de gordura através do método Gerber, o qual se baseia na separação e quantificação da gordura por meio do tratamento da amostra com ácido sulfúrico e álcool amílico. O ácido dissolve as proteínas que se encontram ligadas à gordura, diminuindo a viscosidade do meio, aumentando a densidade da fase aquosa e fundindo a gordura, devido à liberação de calor proveniente da reação, o que favorece a separação da gordura pelo extrator (IAL, 2005).

3.3.3- Determinação de Sólidos Totais e Resíduo Mineral Fixo

Os fermentados e o soro de queijo foram analisados quanto ao teor de sólidos totais e cinzas pelo método gravimétrico que consiste na dessecação da amostra seguida de incineração a 550⁰C. Dessa forma, a fração orgânica volatilizar-se-á sob a forma de dióxido de carbono e água, permanecendo as cinzas ou resíduo mineral fixo no recipiente (IAL, 2005).

3.3.4 - Determinação de Umidade

Os fermentados e o soro de queijo foram analisados quanto ao teor da umidade através de secagem em estufa a 105⁰C até peso constante (IAL, 2005).

3.3.5 - Determinação de Acidez Titulável

O soro de queijo e os fermentados foram analisados quanto ao teor de acidez titulável através da titulação de determinado volume de soro de queijo por uma solução de hidróxido de sódio, utilizando como indicador a fenolftaleína (IAL, 2005).

3.3.6 – Determinação da Densidade Relativa

A densidade do soro de queijo e dos fermentados foi analisada baseada no princípio de Arquimedes. A imersão do termolactodensímetro de massa constante no líquido provocou o deslocamento de uma quantidade deste, que será, em massa, igual ao densímetro utilizado, e, em volume, será proporcional à densidade da amostra. Esse deslocamento fez o líquido alcançar um valor na escala, graduada em graus densitométricos. A densidade foi expressa a 15°C, segundo a tabela de correção de Mueller (IAL, 2005).

3.3.7 – Determinação de pH

O pH das amostras dos fermentados e do soro de queijo foi determinado em pHmetro digital (Marca Hanna Instruments HI 221) (IAL, 2005).

3.3.8 - Determinação de Lactose

O soro de queijo e os fermentados foram analisados quanto o teor de lactose pelo método Munson & Walker, que se baseia na redução dos íons cúpricos a íons cuprosos pela lactose em meio alcalino, a quente. A alcalinização do meio é conseguida por uma solução de hidróxido de sódio, adicionada de agente complexante que impede o consumo de Cu^{2+} para a formação de hidróxido cúprico segundo as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005).

3.3.9 – Métodos de Extração dos Compostos Voláteis Presentes nos Fermentados

3.3.9.1 Método de Destilação e Extração Simultânea (DES)

O aparelho de Likens e Nickerson (1964) utilizado nesse trabalho foi montado conforme demonstrado na Figura 3. O balão contendo 100 mL da amostra e igual volume de água destilada, conectado ao braço A, foi aquecido por uma manta

aquecedora. O balão contendo 20 mL do solvente (hexano), em banho de água, foi conectado ao braço B, cuja temperatura (80°C) dependia do ponto de ebulição do solvente utilizado.

Ao ser aquecido, o soro de leite fermentado libera voláteis que percolam através do braço A, em direção ao condensador. Por outro lado, o solvente à temperatura de ebulição evapora e percola através do braço B, também em direção ao condensador. Uma vez condensado, os voláteis da amostra e o solvente são coletados na parte inferior em forma de U do extrator.

A extração iniciou quando a amostra contida no braço A atingiu a temperatura de 55°C, permanecendo o processo de extração por 60 minutos. Em seguida, resfriou-se o balão com o solvente, conectado ao braço B, por 10 minutos, em água gelada ($\pm 2^\circ\text{C}$). Os extratos foram transferidos para um frasco contendo sulfato de sódio anidro (1,0g), e foram concentrados até 0,5 mL, sob arraste de gás nitrogênio. Os recipientes de vidro âmbar foram lacrados com *parafilm*, rotulados e estocados em *freezer* até as análises cromatográficas em CG-DIC.

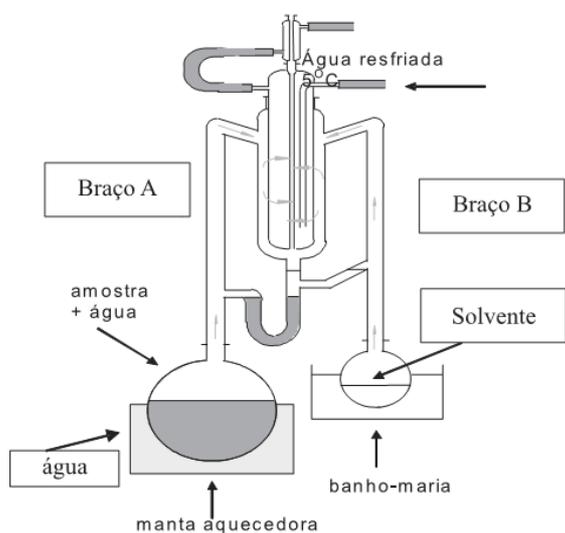


Figura 3: Esquema de destilação por Likens & Nickerson

3.3.9.2 Método de *Headspace* Dinâmico

A técnica do *headspace* dinâmico ou *purge and trap* envolve a purga dos voláteis da camada de *headspace* com um gás inerte conforme demonstrado na Figura 4. A análise por *headspace* dinâmico foi realizada com a amostra mantida em recipiente fechado até atingir equilíbrio termodinâmico dos compostos voláteis entre as fases líquidas e gasosas a uma determinada temperatura.

O aparato experimental (Figura 4) consistiu de um balão fechado mantido a 20°C contendo 40 mL de amostra (Tubo A) e um *vial* coletor contendo 10 mL do solvente hexano (Tubo B), mantido na temperatura de 10°C, que receberá os compostos volatilizados da amostra carregados por fluxo de nitrogênio. Os voláteis contidos nos fermentados de soro foram extraídos do tubo A, através de purga utilizando gás nitrogênio, em direção ao tubo B. Após 30 minutos de fluxo constante do gás, os voláteis da amostra e o solvente foram transferidos para um frasco contendo sulfato de sódio anidro (1,0g) e foram concentrados até 0,5 mL, sob arraste de gás nitrogênio. Os recipientes de vidro âmbar foram lacrados com *parafilm*, rotulados e estocados em *freezer* até as análises cromatográficas em CG-DIC.

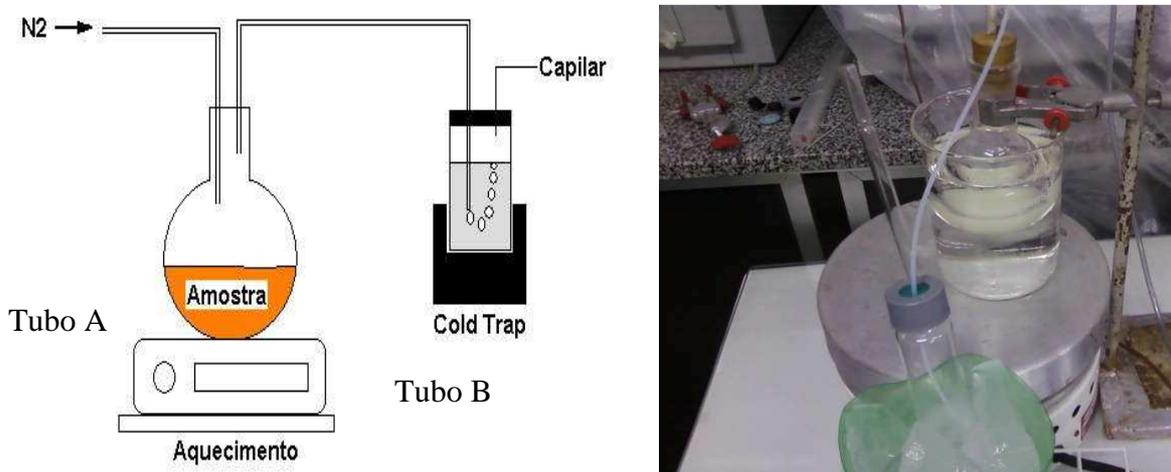


Figura 4: Esquema de extração por *headspace* dinâmico

3.3.9.3 Método de Extração Líquido-Líquido

O método de Extração Líquido-Líquido consistiu em misturar 10g de cloreto de sódio e 20mL de solvente (hexano/éter) na proporção 1:1 em um funil de separação contendo 100mL da amostra (Figura 5). Após 5 min o decantado foi recolhido e a operação repetida por mais duas vezes. O sobrenadante de cada operação foi recolhido em um frasco contendo sulfato de sódio anidro (1,0 g), e foi concentrado até 0,5 mL, sob arraste de gás nitrogênio. Os recipientes de vidro âmbar foram lacrados com *parafilm*, rotulados e estocados em *freezer* até as análises cromatográficas em CG-DIC.

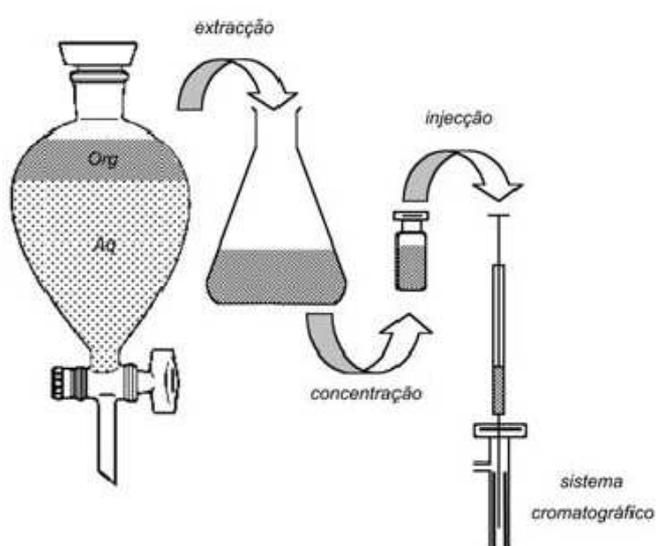


Figura 5: Esquema de extração líquido-líquido

3.3.10. Análises Cromatográficas

Inicialmente, as condições analíticas das análises cromatográficas foram padronizadas para obter a melhor separação de picos como também o maior número de picos. Desta forma, as análises no sistema de CG acoplada com Espectrômetro de massa foram realizadas mantendo as condições padronizadas de separação, obtidas pela análise no sistema de CG/DIC.

Após a escolha da melhor condição analítica, os extratos do soro de leite e do soro de leite fermentado foram submetidos à separação dos constituintes voláteis por cromatografia gasosa a partir de injeção de 1µL do extrato obtido.

Os extratos de compostos foram analisados em cromatógrafo gasoso marca VARIAN, modelo CP 3380 acoplado a um detector de ionização de chama (DIC) injetor tipo *split/splitless*. Os compostos foram separados em coluna capilar: VF-5, apolar, 30m comprimento x 0,25mm diâmetro interno x 0,25µm espessura do filme. O gás de arraste utilizado foi o hélio (pureza 99,995%) com pressão constante de 11,5 psi na coluna e vazão de 1,0 mL min⁻¹. A vazão da purga foi ajustada para fluxo de 1,7 mL.min⁻¹. As injeções foram realizadas manualmente com o uso de injetor *split/splitless*, com taxa nominal de split de 1:20. Para os estudos de quantificação e confirmação dos voláteis nas amostras de soro de leite e soro de leite fermentado, a temperatura inicial da coluna foi de 30°C. Após 7 min da injeção da amostra a temperatura da coluna foi aumentada para 120°C a uma razão de 2°C/min. Programou-se um novo aumento na temperatura da coluna utilizando-se uma razão de 8°C/min, até a temperatura final de 195°C, mantendo-se a coluna nesta temperatura por 10 min. Um novo aumento na temperatura foi programado utilizando-se uma razão de 20°C/min, até a temperatura final de 250°C com tempo total de corrida de 124,13 min. As temperaturas do injetor e detector utilizadas foram 220 e 260°C, respectivamente.

3.3.10.1 Identificação e Quantificação de constituintes voláteis

A identificação dos compostos voláteis foi realizada em uma combinação em ambos os sistemas acoplados: (1) GC-FID (marca Hewlett Packard, modelo HP 5890 serie II) e GC-MS (marca Varian, modelo GC 3800 e MS Saturn 2000R) junto com o sistema de Dados de Computação. O sistema é equipado com uma biblioteca do "NIST" (*National Institute of Standards & Technology*, E.U.A.) contendo aproximadamente um total de 150.000 espectros de referência. Uma comparação do espectro de um pico constando na amostra pela equiparação automática pelo computador com os espectros de referência existente fornece designação estrutural do composto. Experimentos adicionais com padrões voláteis autênticos inclusive alcanos (C₆ – C₂₈) sob condições analíticas idênticas foram realizados para certificar os índices de retenção de compostos voláteis e verificar a identidade positiva de componentes voláteis de interesse. O Índice Linear de Retenção (ILR) foi obtido do tempo de retenção dos padrões de alcanos (C₆-C₂₈)

autênticos, versus o número de átomos de carbonos dos respectivos padrões de alcanos, multiplicado por 100, segundo a equação 1:

$$\text{ILR} = 100 \left[\frac{t_X - t_Z}{t_{Z+1} - t_Z} + Z \right] \quad \text{Eq. 3}$$

Onde:

t'_x = Tempo de retenção para o composto X;

t_z & t_{z+1} = Tempo de retenção para hidrocarbonetos normais

z & $z+1$ = Número de carbonos

A identificação dos compostos voláteis foi considerada positiva ou tentativa de acordo com os critérios apresentados no Quadro 12, onde ressaltamos os códigos de cada tipo de identificação. A identificação dos compostos voláteis foi considerada positiva, código A, quando o ILR do composto foi dentro da faixa de ± 2 unidades do padrão do composto, como também o espectro de massa composto em questão e do padrão foram semelhantes. O código B foi utilizado quando os ILR foram obtidos pelos dois sistemas (GC-FID e GC-MS), além da comparação do espectro do composto pelo database do NIST/SATURN. Entretanto, os códigos B1 e B2 representam a verificação apenas de um dos dados obtidos nos sistemas (GC-FID e GC-MS). A identificação foi considerada tentativa quando não foram considerados os espectros de massas do composto com a substância padrão, sendo representados pelas letras C, D e E.

A quantificação dos compostos voláteis foi relacionada à percentagem de área do pico de cada composto em relação à área total de todos os picos normalizados no cromatograma.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO SORO *IN NATURA*

Os resultados das análises físico-químicas efetuadas no soro *in natura* resultante da fabricação do queijo “Tipo Coalho” estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Características físico-químicas do soro de queijo *in natura*.

Características	Soro doce	
	<i>in natura</i>	<i>in natura</i> (Dados da literatura)
Proteína (g/100g)	0,69±0,098	0,8 – 1*
Lactose (g/100g)	5,75±0,398	4,5 -5,0*
Cinzas (g/100g)	0,63±0,012	0,5- 0,7*
Lipídio Total (g/100g)	0,20±0,073	0,1-0,5**
Extrato seco (g/100g)	6,73±1,396	5,0-7,0***
pH	5,52±1,043	5,2 – 6,7*
Acidez Total (g/100mL)	0,08±0,031	0,1- 0,2*
Umidade (g/100g)	94,27±1,185	93 – 94*
Densidade (g/mL)	1,02±0,879	-

* HARPER (1998), ** BEHMER (1991), *** ORDÓÑEZ (2005).

Analisando os resultados da análise do soro *in natura* verificou-se que as características físico-químicas apresentaram valores próximos aos obtidos por outros pesquisadores para soro doce. As pequenas diferenças observadas foram em virtude do tipo e qualidade da alimentação oferecida ao gado bem como em função dos processos

tecnológicos empregados, do leite utilizado e do tipo de queijo fabricado (FURTADO e POMBO, 1979; MARWAHA e KENNEDY, 1988).

4.2 COMPARAÇÃO ENTRE OS PROCESSOS FERMENTATIVOS

4.2.1 – Características físico-químicas dos fermentados

Os sobrenadantes resultantes da centrifugação das amostras de fermentado foram analisados e nas figuras 1, 2, e 3 estão descritos os perfis de consumo de proteínas, lactose e teor de acidez obtidos nas fermentações 1, 2 e 3. Na Tabela 4 estão apresentados os teores de proteínas, lactose e acidez em ácido láctico do fermentado final das fermentações 1, 2 e 3 obtido em 70h e no soro *in natura* (não fermentado).

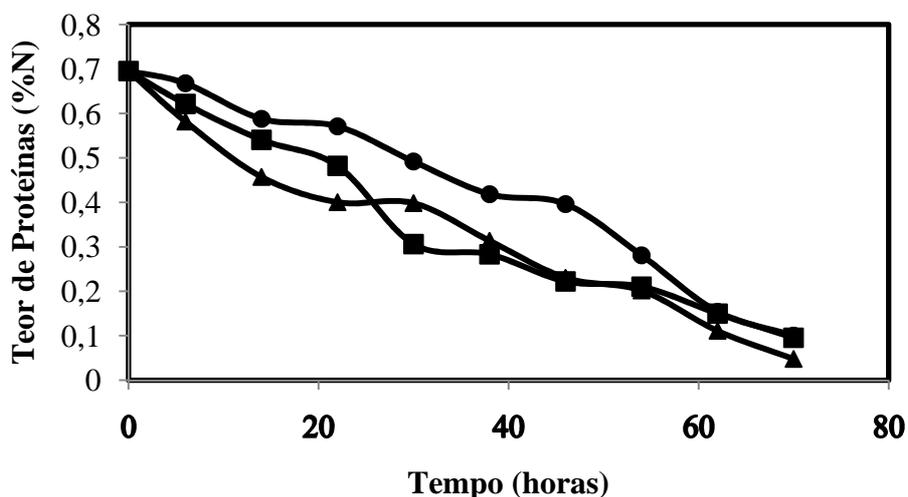


Figura 6: Cinética de consumo de proteínas - Fermentação 1(●), Fermentação 2(■) , Fermentação 3(▲)

Em todas as fermentações observou-se um decréscimo contínuo no teor de proteínas. O consumo total de proteínas nas fermentações 1, 2 e 3 foi de 86%, 97% e 94% em relação à quantidade presente no soro não fermentado, respectivamente. Vananuvat e Kinsella (1975), Gilliland e Stewart (1980), Beausejour *et al.* (1981), Shay e Wegner (1986) e Silva e Castro-Gomez (1995) também obtiveram decréscimo no teor de proteínas durante a fermentação de soro de queijo.

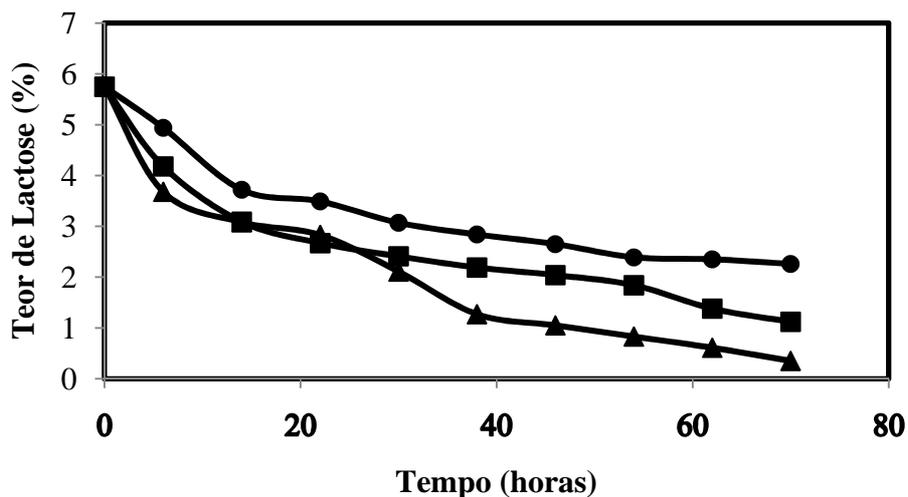


Figura 7: Cinética de consumo de lactose - Fermentação 1(●), Fermentação 2(■) , Fermentação 3(▲)

De forma similar observou-se decréscimo contínuo do teor de lactose com o tempo em todas as fermentações. O consumo de lactose nas fermentações 1, 2 e 3 foi de 60,7%, 80,5% e 94% em relação a quantidade de lactose inicial, respectivamente.

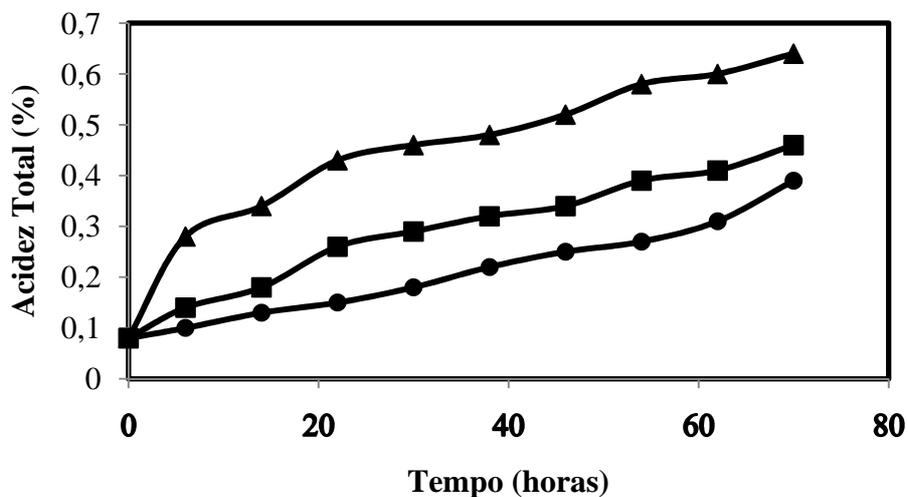


Figura 8: Teor de acidez total- Fermentação 1(●), Fermentação 2(■) , Fermentação 3(▲)

Em relação à acidez total dos fermentados obteve-se aumento considerável ao longo das fermentações, obtendo-se valor máximo de 0,4%, 0,46% e 0,64% para as fermentações 1, 2 e 3, respectivamente.

Tabela 4: Características físico-químicas de diversos soros fermentados obtidos em 70 horas de fermentação e do soro *in natura*

Características	Soro <i>in natura</i>	Soro Fermentado 1	Soro Fermentado 2	Soro Fermentado 3
Proteína (%)	0,690	0,100	0,095	0,050
Lactose (%)	5,75	2,26	1,12	0,35
Acidez Total (%)	0,08	0,40	0,46	0,64

Comparando-se os fermentados 1, 2 e 3 coletados no tempo total de 70 h (final das fermentações) com o soro *in natura*, observou-se que houve maior consumo de lactose (restou 0,35%) e proteínas (restou 0,050%) e maior produção de ácidos (0,64%) na fermentação 3. Este resultado pode ser atribuído à presença de uma maior diversidade de microrganismos, sobretudo bactérias lácticas homofermentativas, as quais utilizaram os nutrientes para produção de ácido lático.

4.2.2 – Crescimento microbiano

A cinética de crescimento microbiano obtida nas fermentações 1, 2 e 3 está representada no gráfico da Figura 4.

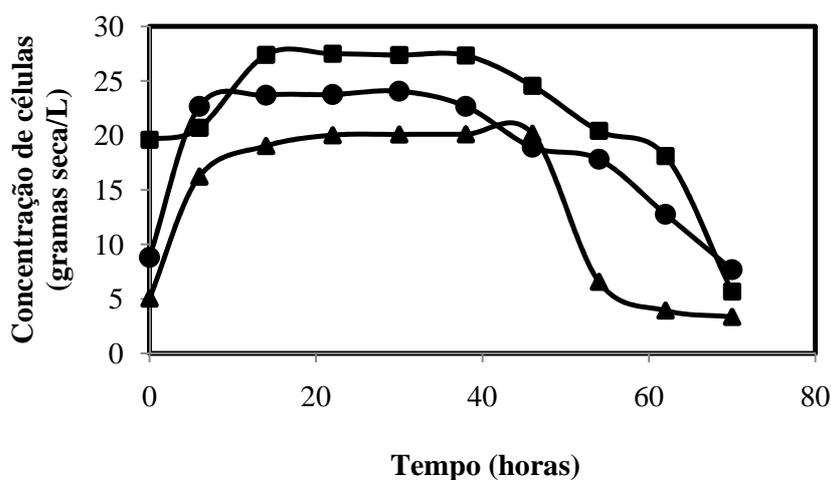


Figura 9: Cinética do crescimento microbiano - Fermentação 1(●), Fermentação 2(■), Fermentação 3(▲)

Nas fermentações 1, 2 e 3 a concentração inicial de células era de aproximadamente 9,0 g/L, 19,0 g/L e 5,0 g/L, respectivamente. O máximo crescimento de microrganismos nas fermentações 1 e 2 ocorreu em 14 horas de fermentação, obtendo-se aproximadamente 23 g de biomassa seca/L e 27 g de biomassa seca/L, respectivamente. Na fermentação 2 o aumento de células (de 19 para 27 g biomassa seca/L) em relação ao valor inicial foi menor do que o obtido na fermentação 1 (9,0 para 23 g biomassa seca/L). Além disto, na fermentação 2 houve maior consumo de lactose (80,5%) do que na fermentação 1 (60,7%). Através destes resultados pode-se constatar que o substrato consumido foi mais direcionado para a obtenção de compostos do que para o crescimento microbiano. Na fermentação 3 o máximo crescimento microbiano foi de 20 g de biomassa seca/L em 22 h de fermentação, menor do que os obtidos nas fermentações 1 e 2.

Nas fermentações 1, 2 e 3 a fase estacionária foi mantida até 30h, 38h e 46h de fermentação, respectivamente. Após a fase estacionária a quantidade de células diminuiu atingindo 7,7, 5,7 e 3,3 g de biomassa seca/L para as fermentações 1, 2 e 3, respectivamente, em 70 horas de fermentação. Em comparação com dados da literatura, Ghaly *et al.* (1997) e Ribeiro *et al.* (2004), obtiveram concentração celular máxima de 27,5g/L e 26,5g/L, respectivamente, na fermentação do soro de uéijo utilizando a *Kluyveromices marxianus*.

Na Tabela 5 estão apresentados os parâmetros de crescimento microbiano para as fermentações 1, 2 e 3.

Tabela 5: Parâmetros do crescimento microbiano para as diversas fermentações.

Fermentação	Concentração de células produzidas ($X_m - X_0$)	Lactose consumida (g/L)	Rendimento em células ($Y_{x/s}$, %)	Produtividade Máxima em células (g/L.h)
1	14	34,9	40	0,20
2	8,0	46,3	17	0,11
3	15	54,0	28	0,21

Analisando a Tabela 4 verificou-se que na fermentação 1, obteve-se maior rendimento em células (40%) do que nas fermentações 2 (17%) e 3 (28%). Provavelmente na fermentação 2, onde a concentração inicial de células foi praticamente o dobro da utilizada na fermentação 1, a lactose consumida foi utilizada para a obtenção de compostos de interesse. Em relação à produção de células por tempo total de fermentação (70 horas) obteve-se similaridade entre as fermentações 1 e 3, cujas produtividades foram de 0,2 g/L.h. Na fermentação 2 obteve-se menor produtividade em células (0,11 g/L.h) comparado às demais.

A fermentação foi conduzida até a fase de declínio do microrganismo (tempo total de 70 horas), com o intuito de avaliar a produção de compostos voláteis em todas as fases do processo. Após a obtenção das curvas de crescimento microbiano selecionou-se fermentados de cada fase: exponencial, estacionária e de declínio de todas as fermentações para a realização das análises de extração e identificação dos compostos voláteis produzidos. Portanto das fermentações 1, 2 e 3 foram utilizados para análise de compostos voláteis os fermentados obtidos em 14h (na fase exponencial), 30h (na fase estacionária) e 62h (fase de declínio) de fermentação.

4.3 COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS

A Tabela 5 apresenta o número de constituintes voláteis detectados nos extratos/captura de voláteis por diversos sistemas, tais como: Extração Líquido-Líquido (LL), Destilação e Extração Simultânea (DES) e *Headspace* Dinâmico (HD) a partir do uso de soro *in natura*, e de fermentados coletados durante as diferentes fases do crescimento microbiano nas fermentações 1, 2 e 3. Nos fermentados 1 e 2 o maior número de picos de compostos voláteis foi obtido nas fases exponencial e de declínio do crescimento microbiano quanto utilizado os 3 métodos de extração HD, LL e DES. Através destes resultados concluiu-se que maior número de constituintes foi obtido na fase de crescimento exponencial, diminuindo na fase estacionária e aumentando novamente na fase de declínio. No fermentado 3 este comportamento só foi observado quando utilizado o método de extração HD. A formação de maior número de compostos foi obtida no fermentado 1 durante a fase exponencial (14h de fermentação), onde obteve-se total de 362 picos quando utilizado o método de extração *headspace*

dinâmico. No fermentado 2 o maior número de compostos (299) foi obtido na fase exponencial (em 14 h de fermentação) quando utilizado o método de extração LL e no fermentado 3 o maior número de picos (353) foi obtido na fase estacionária (30h de fermentação) de crescimento microbiano.

Neste trabalho procurou-se aprofundar a identificação e quantificação de compostos formados nos fermentados obtidos pelo uso do soro de queijo de coalho como substrato. Nos produtos obtidos em 62h de fermentação foi possível separar entre 200 a 252 constituintes voláteis na captura de voláteis pelo HD, entre 141 a 235 constituintes nos extratos LL enquanto no extrato obtido pelo DES houve uma presença de constituintes voláteis variando de 149 a 301 compostos.

Tabela 6: Dados quantitativos de número de picos obtidos nos diversos extratos voláteis (HD, LL e DES) analisados de soro *in natura*, e os produtos fermentados.

Processos fermentativos	Tempo de Fermentação (horas)											
	<i>Headspace dinâmico</i>				Extração Líquido-líquido				Destilação e Extração Simultânea			
	0	14	30	62	0	14	30	62	0	14	30	62
Soro <i>in natura</i>	171	-	-	-	176	-	-	-	175	-	-	-
Fermentado 1	-	362	41	202	-	292	102	143	-	295	203	233
Fermentado 2	-	276	55	214	-	299	227	240	-	238	64	242
Fermentado 3	-	101	65	265	-	296	353	219	-	288	237	149

Estes resultados demonstram que há uma formação de um número grande de compostos orgânicos voláteis na fermentação realizada por 62h do soro obtido na produção do queijo de coalho.

A próxima etapa deste trabalho foi aprofundar o conhecimento dos principais compostos orgânicos voláteis presentes em diversos fermentados. Os resultados deste trabalho estão apresentados na Tabela 7 a qual apresenta os compostos orgânicos identificados como também a área representativa nos diversos picos de cromatogramas obtidos pela análise de extratos voláteis no sistema de cromatografia gasosa de alta resolução e espectrometria de massa. Verificando os dados de picos encontrados em diferentes extratos obtidos a partir de uso de diferentes matérias (soro *in natura* e

produtos fermentados 1, 2 e 3), observou-se a presença dos compostos tolueno, ácido octadecanóico, docosanol, tricosano, dodecanol, p-xileno, m-xileno, fenol, etil benzeno, nonanal, octanol, octanal, hexadecanamida, 2-hexadecenal, 3-hexenol, ácido heptadecanóico, tetradecanoato de butil em maioria dos extratos obtidos pelo uso de fermentados (fermentação 1, 2 e 3). Entre estes compostos, os compostos 2-hexadecenal, ácido octadecanóico, hexadecanamida, docosanol, tricosano, 3-hexenol, ácido heptadecanóico e tetradecanoato de butil são de valor extremamente alto, sendo o valor variando de 70,06 a 194,50 US\$/100 mL, conforme apresentados os dados na Tabela 9.

Tabela 7: compostos voláteis identificados em soro *in natura* e produtos fermentados

Composto	IR	Tempo de Fermentação (Horas)																										
		Fermentado 1									Fermentado 2									Fermentado 3								
		HD			DES			LL			HD			DES			LL			HD			DES			LL		
		14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h
Tolueno	778	1,02		0,83	0,36		0,21	1,20		0,53	0,90		0,78	0,91	7,19	0,19	1,14	0,07	0,81			0,35	0,80		0,90	0,88	0,43	0,83
3-hexanona	780	1,52		0,77	0,66	0,65	0,95	0,89		0,99	1,40		0,37	0,54		0,61	1,05	0,22	0,90			0,20	1,00		1,10	0,79	0,21	1,17
Butanoato de etila	785	0,48		0,02	0,03		0,06	0,10		0,04			0,08	0,02		0,06	0,08		0,03							0,05	0,02	
2-metil 2-pentanol	788	0,38		0,01	0,06	0,05					0,01																	0,01
2,3-hexanediona	794	0,43		0,06	0,32	0,42					0,05			0,06		0,02							0,02	0,39	0,01		0,18	
Hexanal	797	0,04								0,07	0,04		0,06			0,06			0,05			0,08			0,04			
Octano	799	0,03					0,05	0,07		0,03						0,02	0,04							0,01				0,02
3-metil 2-pentanol	801	0,01								0,01								0,02		0,01							0,11	0,07
2-hexanol	804																										0,07	
Etil ciclohexano	813															0,02							0,03			0,01	0,10	
Acetato de butila	815																							0,03				
Tetracloro etano	817			0,01	0,34	0,07								0,01		0,00							0,04					
2,4-dimetil 3-pentanol	820			0,02	1,57	0,14	0,02	0,02		0,02	0,01			0,06		0,01	0,08		0,01				0,15				0,07	
Acetato de isobutila	823			0,04	4,80	0,32	0,02	0,12	0,02	0,12	0,05		0,01	0,15		0,08	0,12		0,05	0,27		0,05	0,01	0,12	0,03	0,02	0,10	0,01
Butanoato de isopropila	826	0,13		0,14	0,29		0,04				0,07		0,20	0,04		0,05	0,06		0,10			0,24			0,16	0,09	0,20	0,04
1-metil 4-etil hexano	828				0,87		0,14										0,17											
2-metil 1-pentanol	830	0,01			0,10													0,03									0,11	0,13
4-metil 1-pentanol	835	0,03			0,11									0,01		0,02	0,05						0,01			0,01	0,28	
3-hexenol	842	0,05						0,16			0,11		0,05			0,03	0,05		0,04			0,01	3,62		0,05	0,01	0,14	
2,3-dimetil-2-pentano	844	0,31		4,19	0,07	0,06	0,04				0,07					0,10	0,06						8,59	0,06			0,23	0,05
Etil benzeno	848	0,01		8,54			2,95				11,25	6,80		3,88	12,12		2,20	6,63		10,97			0,60		0,58	8,79	0,05	
Hexanol	857	0,54		14,07				0,47			10,14		6,36				5,64	0,12		0,17						0,09	6,58	
(E)-2-hexenal	858	0,28		6,62	1,50	0,52	12,70	0,22			10,06				13,15			4,25		9,81				6,61	0,10	17,70	7,77	0,07
Isobutirato de isopropila	865			0,25	0,08		1,06				0,08		0,89	1,21		1,67						14,90	0,34		1,10			
p-xileno	866	0,05		0,26							1,02		0,20				0,20						7,23					9,30

Composto	IR	Tempo de Fermentação (Horas)																											
		Fermentado 1									Fermentado 2									Fermentado 3									
		HD			DES			LL			HD			DES			LL			HD			DES			LL			
		14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	
3-heptanona	870	0,08		0,29	0,06					0,01	0,02		0,45	0,19						0,21				0,29			0,13		0,08
<i>m</i> -xileno	878			6,80				0,43		0,07	3,02		1,48	5,79		1,34	3,43	0,09	5,43								4,29	0,06	0,07
2-heptanona	881							0,06			4,78																		
2-metil hexanol	886	0,06		0,23	0,14			0,03			0,16		0,32	0,43			0,16		0,02	1,38			3,26	0,87			0,02	0,10	6,43
Heptanal	889	0,60		0,89	0,50	0,99	0,04	0,44		0,48	0,45		0,23	0,77		0,04	0,65	0,73	0,66			0,29	0,10	0,63	0,70	0,54	0,98	0,06	
Ácido pentanóico	896	0,08		0,09			0,22						0,22	0,02		0,28	0,11	0,06	0,09			0,35				0,05	0,19	0,21	
2-metil 1-pentanol	906	0,03		0,02	0,61	0,09	0,08	0,04		0,05	0,04		0,09	0,10		0,12	0,07		0,05			0,54	0,02	0,04	0,19	0,04	0,05	0,60	
Hexanoato de metila	911	0,08		0,10	0,28	0,07	0,10	0,06		0,11	0,06		0,20	0,06		0,25	0,13	0,09	0,01			0,25	0,09		0,14	0,09	0,16	0,02	
Disulfeto de etila	914	0,32		0,37	0,57	0,35	0,04	0,08		0,06	0,20		0,12	0,24		0,15	0,13	0,25	0,18	0,41		0,16	0,33		0,07	0,06	0,38	0,24	
2-metil hexanol	919	0,24		0,32	0,25	0,34	0,05	0,21		0,19	0,15		0,43	0,20		0,08	0,66	0,06	0,22	0,43		0,53	0,25	0,20		0,22	0,04	0,45	
Cumeno (isopropil benzeno)	921	0,46		0,48	0,25		0,26				0,25		0,38	0,41		0,33						0,44	0,33	0,19					
2,2,5,5-tetrametil hexano	930	0,09		0,08	1,56								0,09									0,72	0,02		0,06				
α -pineno	933	0,02		0,02	0,03			0,06			0,05		0,08	0,01			0,10	0,05	0,04			0,23	0,02			0,04		0,01	
4,5-dimetiltiazole	935	0,05		0,05			0,02	0,02		0,01			0,02	0,04		0,05	0,04	0,16								0,01	0,34	0,02	
Isobutanoato de butila	939	0,07		0,15	1,41	0,5	0,15	0,09		0,12	0,11		0,19	0,52		0,22	0,15		0,11	0,56			0,50	0,37	0,17	0,10	0,09	0,22	
Butanoato de isobutila	945	0,56		0,80	0,17		0,04	0,41		0,64	0,06		0,60			0,61	0,10	0,59	0,92		1,08				0,51	0,14	0,97		
2,3,3-trimetil octano	948	0,43		0,58	0,05	0,55	0,70	0,30		0,44	0,42		0,91	0,74		0,86	0,42	0,12	0,42	0,78		0,91	0,53	0,42	0,81	0,37			
Heptanol	951	0,23		0,28	0,20	0,24	0,13	0,14		0,11	0,08		0,17	0,15		0,60	0,20		0,10			0,26	0,17	0,14	0,08			0,66	
<i>m</i> -etil tolueno	957	0,27		0,29	0,72	0,18	0,59	0,23		0,19	0,14		0,30	0,25		0,73	0,35	0,15	0,18			0,28	0,11	0,26	0,14	0,18	0,79		
1,1-dimetoxihexano	958			0,25	0,25	0,13								0,30		0,29						0,07							
1-methyl 4-etilbenzeno	959	0,07		0,10	0,54		0,28			0,24	0,29		0,30	0,06		0,32				0,58		1,96	0,57		0,27	0,21		0,32	
<i>p</i> -etil tolueno	962	0,47		0,58	0,15	0,59	0,09				0,37		0,68	0,56		0,13						0,08	0,29	0,66	0,05			0,33	
2-heptanol	972	0,31		0,38	0,05	0,22	0,34	0,18		0,30	0,22	0,42	0,43	0,35		0,44	0,29	0,06	0,21	0,10		1,49	0,14	0,17	0,37	0,19	0,06	0,33	
1,2,4-trimetil benzeno	977	1,55		1,70		1,72	0,14	1,08		1,36	1,45					0,18	1,43	0,25	0,11	0,35			1,56	1,12	0,15	0,10	0,24	0,64	
1-octen-3-ol	979			0,39	0,08		1,54	0,10		0,29			1,88	2,11		0,10		1,27				0,38	0,30	1,70	1,10			2,07	
Fenol	982	0,11		0,12	0,15								0,42			0,45						2,78	0,13		0,13				
1,2,3-trimetil benzeno	985	1,14		1,49			0,05			0,04	0,95		0,07			0,09	1,05			1,92		0,19		0,05				0,09	

Composto	IR	Tempo de Fermentação (Horas)																										
		Fermentado 1									Fermentado 2									Fermentado 3								
		HD			DES			LL			HD			DES			LL			HD			DES			LL		
		14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h
Octanal	988	0,10		0,10	0,41	1,38	1,34	0,74		1,17	0,06		1,72	1,42		0,07	0,09		1,09				1,50	1,02	1,47	0,95		0,08
Benzaldeído	990				0,37			0,07		0,09				0,11		1,48		0,04	0,09				0,17			0,08	0,03	1,78
1,2-diclorobenzeno	997	0,17		0,17	0,40	0,15	0,10			0,11	0,21	0,31	0,15	0,12		0,19	0,13		0,11			0,55	0,20	0,11	0,05	0,04	0,10	0,18
Hexanoato de etila	999						0,15	0,18		0,15			0,24			0,24	0,21	0,15	0,12			0,28			0,18	0,13	0,03	0,24
Butanoato de butila	1003	0,99		1,31	0,21	1,19	1,18	0,74		1,02	1,03		1,45	1,27		0,05	1,07	0,10	0,01	1,93		0,25	1,24	0,85	1,30	0,82	0,24	1,40
Acetato de hexila	1008	0,62		0,75	0,11	0,64	0,68	0,47		0,59	0,51	0,31	0,82	0,74	0,18	1,42	0,58		0,54	1,03	0,15	1,79	0,72	0,47	0,74	0,47	0,05	0,21
2,4-dimetil heptan-3-ol	1013	0,25	0,42	0,22	0,28	0,36	0,14	0,25		0,12	0,12		0,29	0,17		0,13	0,15		0,11	0,59		0,97	0,25		0,23	0,10		0,33
α-terpineno	1015	0,41		0,53	0,42		0,47	0,27		0,42	0,34		0,54	0,55		0,50	0,40		0,38			0,23			0,52	0,28	0,07	0,58
(E,E) 2,4-heptadienal	1018															0,13						0,15	0,08					
2-acetiltiazole	1020	0,11		0,11	1,00		0,10	0,14		0,10	0,17		0,16	0,26		0,15	0,22		0,10			0,11		0,12	0,08		0,25	
Heptanoato de metila	1022	0,35		0,36		0,33	0,11	0,21		0,10			0,15			0,17	0,26	0,01	0,08	0,47		0,35	0,24	0,11	0,07		0,13	
2,6,7-trimetil decano	1029	0,11		0,10	0,09		0,09	0,07		0,10	0,04		0,17	0,13		0,10	0,13	0,02	0,06			0,64	0,08	0,06	0,09	0,06	0,05	0,53
2-etil-1-hexanol	1031				0,06	0,09	0,10	0,09		0,11	0,10		0,18	0,14		0,11	0,13	0,07	0,07	0,61		0,28	0,15	0,07	0,10	0,07	0,12	0,20
Limoneno	1040	0,29		0,35			0,31	0,31		0,44	0,30		0,40	0,38		0,40	0,45	0,13	0,37	0,86		0,93	0,57	0,36	0,51	0,32	0,17	0,41
α-benzil álcool	1081	0,07		0,09	0,11		0,07			0,10			0,16	0,08		0,11	0,07		0,06			0,17	0,12		0,02	0,06		0,20
Octanol	1083	1,38		1,44	0,03		0,11	0,06		1,18	1,05		1,59	0,15		1,19	0,27	1,11	1,99		0,17			0,09	1,00	0,48	1,82	
Ácido heptanóico	1088	0,01		0,01	0,06		0,01	0,01		0,01	0,03		0,05	0,01		0,07	0,05		0,01			0,56			0,01	0,08		
Nonanal	1099	0,25		0,28	0,03	0,25	0,25	0,62	4,06	0,49	0,36		0,30	0,28		0,32	0,36	0,63	0,49	0,40		0,39	0,26	0,15	0,23	0,19	0,19	0,34
2-metil 1-octanol	1114	0,28		0,22	0,02	0,24	0,19	0,19		0,15	0,17		0,24	0,22		0,32	0,23		0,15			0,03	0,21		0,22	0,14	0,12	0,11
Octanoato de metila	1125	0,21		0,21	0,04	0,36	0,19	0,16		0,22	0,25		0,24	0,23		0,28	0,26	0,09	0,15	0,35		0,30	0,21	0,23	0,22	0,15	0,21	0,29
1-metil 4(metiletil) benzeno	1129	0,75		0,59	0,07	0,63	0,53	0,51		0,53	0,48		0,61	0,59		0,64	0,49	0,03	0,42	0,80		0,36	0,55	0,40	0,59	0,40	0,05	0,72
Isobutanoato de hexila	1133	0,14		0,12	0,03	0,19	0,10	0,09		0,08	0,08		0,13	0,12		0,15	0,11		0,08			0,65	0,11	0,08	0,12	0,07	0,03	0,19
2-metil tiofeno	1135	0,07		0,03	0,02		0,03	0,06		0,04			0,04	0,04		0,06	0,05		0,02			0,21	0,03			0,03	0,07	0,08
1,3-dimetoxibenzeno	1138	0,45		0,38	0,19	0,6	0,33	0,33		0,30	0,32		0,39	0,35		0,35	0,35	0,24	0,27	0,51		0,12	0,33	0,35	0,40	0,25	0,30	0,39
Cânfora	1141	0,09		0,08	0,01		0,06	0,05		0,06	0,05		0,07	0,07		0,09	0,05		0,05			0,43	0,06		0,07	0,04	0,04	0,09
2-etil tiofeno	1181	0,72		0,20	0,01	0,35	0,18	0,51		0,14	0,35		0,20	0,21		0,23	0,37		0,30	0,55		0,02	0,19	0,25	0,19	0,31	0,19	0,24
Nonoato de etila	1183			0,02								0,18										0,04						

Composto	IR	Tempo de Fermentação (Horas)																											
		Fermentado 1									Fermentado 2									Fermentado 3									
		HD			DES			LL			HD			DES			LL			HD			DES			LL			
		14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	
α -copaeno	1184	0,04			0,09		0,02	0,12					0,01	0,01		0,04	0,24	0,73	0,15			0,29	0,01			0,16	0,09	0,03	
β -farneseno	1186	0,08			0,01						0,13					0,03	0,14		0,12			0,03				0,17	0,47		
Dodecanol	1189	0,06			0,04			0,23			0,18					0,02	0,18	0,82	0,28			0,04				0,22	0,53	0,01	
Tridecanol	1192	0,42		0,10	0,02	0,3	0,10				0,45		0,11	0,10		0,12			0,11	0,47		0,04	0,09	0,21	0,10	0,41	0,45	0,13	
Dibenzil éter	1194	0,11		0,01	0,01		0,01	0,74		0,07	0,18		0,01	0,02		0,02	0,49	0,30	0,05			0,16	0,01	0,01	0,01	0,04	0,18		
δ -dodecalactona	1196	0,04									0,24							0,70				0,05				0,12	0,62		
Pentadecanol	1198	0,10			0,03	0,04	0,04				0,17			0,02		0,04		0,21									0,51	0,01	
Hexadecanol/decanal	1199	0,08			0,02			0,62			0,53			0,02		0,03	0,92	0,60	0,07			0,08				0,61	1,26	0,05	
Decanal	1202	0,07			0,02		0,01	0,27	0,02		0,36			0,02		0,02	0,42					0,03				0,23	0,76	0,05	
9-hexadecanoato de metila	1204																0,06									0,18	0,24		
3-octadeceno	1206	0,03			0,03						0,35							0,24				0,01				0,21	0,76		
Nonadecano	1208	0,15		0,03	0,02	0,13	0,03				0,81					0,04			0,11			0,08	0,03			0,32	0,46	0,15	
δ -pentadecalactona	1213	0,08							0,85		0,13						0,44		0,09			0,05				0,11	0,36	0,10	
Octadecanol	1214	0,06			0,04		0,02	0,54	0,84	0,04	0,10					0,01	0,21	0,50	0,05							0,08	0,79	0,07	
δ -heptadecalactona	1216	0,17			0,01			0,37			0,14					0,02	0,18		0,10							0,07		0,17	
Docosano	1218	0,22			0,01						0,15	0,07				0,03	0,04					0,05	0,01			0,01			
Tricosano	1221				0,01		0,03	0,56			0,18	0,01				0,04	0,28	0,27	0,14			0,07				0,08	0,44	0,16	
Octadecanoato de etila	1222										0,29								0,04							0,20		0,06	
Heptadecanoato de butila	1224							0,16			0,34						0,22		0,08									0,07	
1-docosanol	1225	0,08			0,01						0,44					0,01			0,07			0,02				0,01	0,09	0,07	
Nonoato de metila	1265	0,05			0,01			0,05			0,01						0,03		0,09									0,05	
Nonoato de etila	1286	0,64		0,10	0,01	0,3	0,07				0,03		0,09	0,08		0,07			0,11	0,48		0,13	0,07	0,20	0,07				
α -copaeno	1339	0,10						0,19			0,16					0,19	0,51					0,02				0,68			
Tetradecano	1397	0,11			0,01		0,02	0,07	0,06		0,15			0,02		0,08	0,17	0,17	0,05			0,03	0,02		0,03	0,01	0,24		
β -ionona	1451	0,12		0,02		0,13	0,02	0,12			0,87	0,13	0,03			0,02	0,08	0,13	0,61	0,23		0,06	0,02	0,08	0,02	0,04	0,21	0,04	
β -farneseno	1463	0,09		0,02	0,01	0,01	0,01	0,05			0,02		0,01			0,01	0,03	0,23				0,07	0,01	0,06		0,01	0,08	0,02	
Dodecanol	1489	0,11	0,99	0,03	0,02	0,15	0,02	0,15	1,48	0,77	0,09	0,58	0,03	0,03		0,02	0,11	0,22	0,68			0,07	0,02	0,10		0,55	0,31	0,96	

Composto	IR	Tempo de Fermentação (Horas)																											
		Fermentado 1									Fermentado 2									Fermentado 3									
		HD			DES			LL			HD			DES			LL			HD			DES			LL			
		14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	
Pentadecano	1498	0,06			0,02	0,04	0,01	0,07		0,02			0,01				0,04	0,13				0,05		0,02			0,14		
Ácido dodecanóico	1524	0,06				0,07	0,01	0,07			0,03		0,01	0,02		0,01	0,05	0,08				0,04	0,01	0,04		0,01	0,22		
γ-cadineno	1546	0,08		0,01		0,13	0,01				0,35		0,02	0,02		0,01	0,03	1,04	0,01	0,13		0,06	0,01	0,06		0,04	1,34	0,02	
δ-cadineno	1552	0,06				0,12	0,01	0,09			0,03		0,01	0,02		0,02	0,06	0,02				0,08	0,02	0,06		0,01	0,19	0,02	
δ-undelactona	1571	0,06				0,08		0,05			0,06		0,01				0,07	0,02				0,05					0,12		
Tridecanol	1581	0,17	0,34	0,07		0,44	0,08	0,12	0,03	0,07	0,11	0,09	0,08	0,09	0,06	0,08		0,03	0,05	0,76	0,23	0,19	0,06	0,26	0,07	0,06	0,23	0,09	
Benzophenone	1590	0,02				0,05		0,23			0,26			0,01			0,27	0,88				0,07		0,02		0,04	1,01		
Octanoato de dietila	1594	0,04				0,14	0,02	0,05	0,08	0,04	0,02		0,02	0,01		0,02	0,06	0,03	0,47			0,05		0,04		0,02	0,23	0,01	
Tridecanol	1601	0,07		0,03		0,11	0,03	0,04			0,60		0,02				0,04	0,02									0,12		
Heptanoato de benzila	1621	0,02			0,03			0,16		0,01	0,02						0,20	0,07	0,01			0,03				0,04	0,18		
Dibenzil éter	1635	0,01			0,02			0,09			0,08						0,09	0,24									0,38		
2-(fenilmetil) heptanal	1640	0,04		0,02	0,01			0,04			0,02		0,03				0,03		0,01	0,25		0,07				0,01	0,06	0,03	
Cubenol	1646	0,03		0,01	0,05	0,1	0,01	0,06			0,02		0,01	0,02		0,01	0,03	0,02	0,01	0,18		0,07	0,01	0,04		0,01	0,10	0,02	
Ácido isopentanóico	1653	0,04			0,03	0,09	0,01	0,03			0,05		0,01	0,01			0,06	0,07				0,08	0,01	0,03			0,25		
γ-dodelactona	1664	0,05	0,28			0,19		0,16			0,12		0,01				0,06	0,30				0,07		0,01		0,01	0,43		
10-undecenoato de butila	1667	0,01						0,06			0,09		0,01				0,05	0,15	0,03			0,04					0,26		
α-cadinol	1673	0,03		0,01				0,02			0,08						0,03	0,12	0,01								0,37		
δ-dodecalactona	1684	0,15	1,19	0,12	0,06	0,61	0,11	0,15	0,07	0,08	0,14	0,11	0,10	0,13	0,15	0,10	0,14		0,09	1,49	0,85	0,23	0,11	0,35	0,13	0,07	0,27	0,15	
Heptadecano	1690	0,02			0,06	0,06					0,01			0,01								0,05		0,01					
Tridecanoato de etila	1697	0,01			0,06	0,08	0,01	0,11			0,08			0,01		0,01	0,07	0,06	0,02				0,01	0,03		0,00	0,21		
Pentadecanal	1703	0,03		0,01		0,17		0,07	0,06		0,12		0,01				0,08	0,14	0,04	0,12		0,10	0,01			0,02	0,38	0,02	
2-pentadecanona	1710	0,02			0,14	0,22	0,01	0,03	0,04		0,05			0,01	1,48	0,01	0,04	0,06	0,01	0,07				0,01	0,04	0,01	0,01	0,13	0,01
Farnesol	1715	0,02	1,04	0,01	0,09	0,05		0,08			0,05		0,01				0,05	0,10	0,01	0,15	0,25	0,10		0,01		0,01	0,26	0,01	
Tetradecanoato de metila	1722	0,04			0,05	0,14	0,01	0,04			0,05	0,31				0,01	0,04	0,08	0,01	0,09		0,09	0,02	0,02		0,01			
Cinnamato de isoamila	1735	0,01			0,05	0,08					0,02						0,03	0,06				0,05		0,01			0,16		
Benzoato de benzila	1740	0,02	0,24	0,01	0,04	0,14		0,06			0,02		0,01			0,01	0,02	0,05	0,01	0,11	0,15	0,09		0,02			0,13		
Ácido tetradecanóico	1745	0,06		0,02	0,23						0,22					0,01						0,05		0,01					

Composto	IR	Tempo de Fermentação (Horas)																													
		Fermentado 1									Fermentado 2									Fermentado 3											
		HD			DES			LL			HD			DES			LL			HD			DES			LL					
		14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h			
1,2-dodecanediol	1749				0,03				0,05		0,01							0,05	0,11	0,18				0,05				0,01	0,22	0,02	
2-pentadecenal	1758		0,82		0,04	0,17			0,02			0,01						0,01	0,01					0,07					0,06		
9-pentadecanoato de etila	1761				0,04				0,03	0,27								0,01	0,03	0,01								0,15	0,01		
Pentadecanol	1770	0,03	1,55	0,05					0,04	0,05			0,03					0,03	0,08				0,38	0,05					0,22		
Dodecanoato de butila	1776				0,05	0,23	0,04	0,03	0,03	0,03	0,05		0,04	0,05	0,08	0,04	0,05	0,06	0,03	0,64	1,23	0,11	0,04	0,19	0,05	0,03	0,15	0,06			
Tetradecanoato de isopropila	1799	0,01	0,66		0,02							0,02											0,06	0,01							
Tetradecanoato de etila	1815		0,31		0,01																		0,07						0,07		
2-hexadecanona	1817								0,06	0,07								0,01	0,04										0,09		
Hexadecanal	1823																													0,03	
Ácido pentadecanóico	1829		0,31																			0,24	0,04								
Ácido 9-pentadecenóico	1834																												0,06		
Hexadecanol	1843	0,06		0,02		0,22	0,02			1,57		0,08	0,55	0,02	0,02	0,29	0,01	0,05	0,96	0,04	0,19		0,09	0,02	0,03		0,02	0,04	0,02		
6,10,14-trimetil 2-pentadecanona	1852																												0,07		
Tridecanoato de butila	1862																												0,11	0,09	
5-octadeceno	1868																												0,03	0,03	
2-hexadecenal	1876	0,01	1,82	0,04		0,16	0,04					0,03		0,03	0,04	0,12	0,03					0,53	1,56	0,08	0,04	0,13	0,04	0,02	0,08	0,05	
3-octadeceno	1887	0,01			0,02								0,11									0,12							0,06		
9-hexadecanoato de metila	1894																	0,07											0,02		
Nonadecano	1897	0,03			0,03					1,11		0,07	0,98											0,05					0,04		
Heptadecanal	1906				0,02	0,56		0,82	3,84						0,02			0,06	3,23					0,08			0,02	0,06			
Farnesol acetona	1918																												0,03	0,03	
2-heptadecanona	1923																												0,02	0,02	
Hexadecanoato de metila	1925																												0,02		
Ácido 9-hexadecenóico	1933																												0,03		
Benzoato de geranyl	1948					0,3		4,42	4,24										2,63						0,03				0,02		
9-hexadecanoato de etila	1953		0,29																										0,03		
Hexadecanoato de etila	1970																												0,05		

Composto	IR	Tempo de Fermentação (Horas)																										
		Fermentado 1									Fermentado 2									Fermentado 3								
		HD			DES			LL			HD			DES			LL			HD			DES			LL		
		14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h
Tetradecanoato de butila	1975							3,36	0,07																		0,03	0,04
δ-pentadecalactona	1982	0,01	1,63	0,03		0,12	0,03					0,02	0,03	0,15	0,03	0,02			0,03	0,45	1,29	0,10	0,03	0,11				
Heptadecanol	1992																											
9-octadecenal	2001																											
Heptadecanoato de metila	2026																											
Octadecanal	2034										0,12								0,11	0,14		0,48						
γ-hexadecalactona	2052					0,43		3,96	6,96										4,45			0,99						
Ácido heptadecanóico	2056							1,72																				
δ-hexadecalactona	2067							2,00	0,05										0,06									
Pentadecanoato de butila	2079					0,09			1,29									0,03	0,97								0,04	0,10
Octadecanol	2084	0,05		0,03		0,07		0,07	1,40		0,09	0,45		0,03		0,07	0,97	0,03		0,97	0,04	0,06	0,14			0,02		
9,12-octadecadienoato de metila	2094								1,16										1,03									
9-octadecenoato de metila	2097								0,69									0,42										
Heneicosano	2102								0,17									0,15										
Octadecanoato de metila	2124	0,01				0,17					0,02			0,02				1,58			0,15							
9,12,15-octadecatrienoato de etila	2136								0,23									0,18			0,83							
Ácido 9-octadecenóico	2147								0,20									0,17			0,61							
9-octadecenoato de etila	2161								0,20											1,00								
Ácido octadecanóico	2169		0,62						0,05									0,04			1,81							
Hexadecanamida	2173								0,10						0,09			0,03			1,82	0,01						
Hexadecanoato de butila	2180	0,01		0,01					0,06		0,11							0,11	0,13		0,92	0,03					0,04	
δ-heptadecalactona	2186	0,04		0,03					0,27		0,02	1,54	0,02				0,01	0,11	0,02	0,39	0,93					0,11	0,03	
Octadecanoato de etila	2187		1,11		0,01	0,16	0,03							0,06	0,14	0,03				2,18				0,27	0,03			
Octadecanoato de etila	2191	0,17	0,71		0,09	0,03	0,02		0,06		0,21	0,59	0,02	0,04	0,96	0,01	0,21	0,03	0,02	0,14	1,69		0,01	0,03	0,02	0,02	0,05	
Docosano	2205							0,06										0,06	0,01									
Octadecanol acetato	2219		1,02																	2,55								
Ácido 9-nonadecenóico	2238		0,20						0,12		0,02	0,04			0,06			0,06		2,05						0,01	0,05	

Composto	IR	Tempo de Fermentação (Horas)																										
		Fermentado 1									Fermentado 2									Fermentado 3								
		HD			DES			LL			HD			DES			LL			HD			DES			LL		
		14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h	14h	30h	62h
Ciclotetracosano	2277																				0,61							
Heptadecanoato de butila	2283	0,04	1,64	0,02	0,04	0,22	0,03	0,04	0,22		0,02	2,59	0,02	0,11	0,16	0,03	0,02	0,09	0,02	0,35	2,30	0,03	0,10	0,44	0,03	0,24	0,29	0,03
1-docosonol	2298	0,02							0,07		0,12								0,15	0,10	1,89						0,01	
Tricosano	2301																			1,20								

Na Tabela 7 estão listados apenas os compostos que foram possíveis de serem identificados. Assim sendo esta tabela não apresenta os picos de cromatogramas que apesar de serem detectados, não foram identificados. Entre os principais compostos identificados nos diversos fermentados observa-se a presença de fenol, tolueno, xileno, hexanol, tricosano, docosanol, octanol, octanal, benzoato de geranil. Desta tabela pode-se concluir que os compostos orgânicos voláteis promissores de serem obtido pela fermentação do soro são 2-hexadecenal e ácido octadecanóico.

Tabela 8: Comparação das áreas de picos dos fermentados obtidos pelo uso do soro como substrato, tendo o preço estimado como referência.

Compostos	Preços (US\$/100mL)	Área de Picos								
		Fermentado 1			Fermentado 2			Fermentado 3		
		14hs	30hs	62hs	14hs	30hs	62hs	14hs	30hs	62hs
2-hexadecenal	194,5	0,01	1,82	0,04	0,04	0,12	0,03	0,53	1,56	0,08
Ácido octadecanóico	165,0		0,62			0,04			1,81	
Hexadecanamida	100,0		0,30			0,09			1,82	
Docosanol	97,8	0,02	0,07		0,12		0,15	0,10	1,89	0,01
Tricosano	81,5	0,56		0,18	0,28	0,27	0,14	0,08	0,44	0,16
3-hexenol	76,7	0,16			0,11		0,05	3,62	0,14	0,05
Ácido heptadenóico	75,3	0,06		0,01	0,05		0,07	0,01	0,08	0,56
Tetradecanoato de butila	70,1	3,36	0,07			0,16			0,03	0,04
Dodecanol	47,6	0,15	1,48	0,77	0,11	0,58	0,68	0,55	0,31	0,96
<i>p</i> -xileno	42,5	0,05		0,26	1,02		0,20	7,23		9,30
Fenol	42,5	0,15		0,12			0,42	0,13		2,78
2,3 dimetil 3-pentanol	42,4	0,38	0,05	0,01	0,01					0,01
2,3 dimetil 2-pentano	42,4	0,31	0,06	4,19	0,07		0,10	8,59	0,23	0,05
Etil benzeno	40,2	0,01		11,25	12,12		10,97	8,79	0,05	0,58
Benzoato de geranil	39,3	4,42	4,24			2,63			0,02	0,03
Isobutanoato de butila	34,7	1,41	0,5	0,15	0,52		0,22	0,56	0,37	0,22
<i>m</i> -xileno	33,5	0,43		6,80	5,79	0,09	5,43	4,29	0,06	0,07
Nonanal	32,1	0,62	4,06	0,49	0,36	0,63	0,49	0,40	0,19	0,39

Compostos	Preços (US\$/100mL)	Área de Picos								
		Fermentado 1			Fermentado 2			Fermentado 3		
		14hs	30hs	62hs	14hs	30hs	62hs	14hs	30hs	62hs
Nonadecano	32,1	0,15	0,13	0,03	0,81		0,11	0,32	0,46	0,15
Octanol	31,7	1,38		1,44	1,19	0,27	1,59	1,99	0,48	1,82
Octanal	28,5	0,74	1,38	1,34	1,42		1,72	1,50	1,02	1,47
Dodecalactona	28,2	0,15	1,19	0,12	0,14	0,15	0,10	1,49	0,85	0,23
3-hexanona	26,6	1,52	0,65	0,99	1,40	0,22	0,90	1,00	0,21	1,17
Tolueno	23,8	1,20		0,83	1,14	7,19	0,81	0,88	0,43	0,90
2-hexenal	23,0	1,50	0,52	12,70	13,15		9,81	7,77	0,10	17,70
2-metilhexanol	23,0	0,14		0,23	0,43		0,32	1,38	0,10	6,43
2 metil tiofeno	22,3	0,07		0,03	0,05		0,06	0,03	0,07	0,21
Hexadecanol	21,7	0,62			0,92	0,60	0,07	0,61	1,26	0,08
Benzofenona	21,7	0,23	0,05		0,27	0,88		0,04	1,01	0,07
Hexadecalactona	19,6	3,96	6,96			4,45			0,99	
2,4 dimetil 3-pentanol	18,4	1,57	0,14	0,02	0,08		0,01	0,27	0,12	0,05

A Tabela 8 mostra que os 3 primeiros compostos de maior valor comercial apresentam áreas de valores próximos, tendo o 2-hexadecenal um maior pico 30hs após início da fermentação 1. Os compostos tricosano e ácido heptadecanóico possuem a mesma área de pico, contudo o primeiro possui maior valor comercial e foi obtido 14hs após o início da fermentação 1. Com áreas de picos próximas, o 3-hexenol e o Tetradecanoato de butila foram obtidos 14hs após o início da fermentação 1 e 3, respectivamente. Compostos de áreas de próximas, como o 2,3 dimetil 3-pentanol, o hexadecalactona e o benzoato de geranyl foram obtidos promissoriamente durante a fermentação 1, enquanto o etil benzeno, *m*-xileno, octanol, octanal e 2-hexenal foram identificados nos 3 processos fermentativos com áreas de picos destacadas nas fermentações 1 e 2.

Na Tabela 9 estão apresentados os diversos compostos orgânicos voláteis com seus preços dos picos e áreas (na média), que seja maior em todas as 3 fermentações realizadas. Os dados apresentados nessa tabela levam a concluir que a obtenção de 2-hexadecenal, ácido octadecanóico, hexadecanamida, docosanol, tricosano, 3-hexenol, ácido heptadecanóico e tetradecanoato de butila possa ser uma atividade técnico-econômica viável para aproveitamento de soro obtido na produção de queijo de coalho.

Salientamos que o objetivo deste trabalho não foi para desenvolver um processo viável de produção de algum composto orgânico volátil pelo uso de soro, mas verificar o potencial de aproveitamento de soro como um substrato para produção de compostos voláteis viáveis que agregam valor alto para aproveitamento de soro pelo processo biotecnológico.

Finalmente, ressaltamos que há um grande escopo de obtenção de produtos agregados que são extremamente caros e estes possam ser produzidos primeiramente pelo isolamento de extrato de fermentados 1, 2 e 3 conforme discutido acima e possivelmente pelo aperfeiçoamento da síntese de compostos ou isolados pelas técnicas que promovem as reações químicas de separação de compostos de diferentes classes orgânicas . Uma possível via de obtenção de compostos isolados seria um novo estudo que, busque primeiros *scale-up* do processo biotecnológico de fermentação de soro obtido na produção de queijo de coalho, seguida por coleta de produto formado após 62 hs de fermentação e utilização deste como fonte principal para promover reações que facilitam a separação orgânicos por classes sendo monitorado o rendimento de composto alvo (preferencialmente aqueles de alto valor comercial) de isolamento, o qual certamente viabilizará o processo biotecnológico de aproveitamento de soro produzido no processo de queijo coalho.

Tabela 9: Preços estimados de compostos voláteis relacionados com a presença em fermentados obtidos pelo uso de soro como substrato

Composto	Preço (US\$/100mL)	Área do pico no cromatograma
2-hexadecenal	194,5	1,6
Ácido octadecanóico	165,0	1,8
Hexadecanamida	100,0	1,8
Docosanol	97,8	1,9
Tricosano	81,5	1,2
3-hexenol	76,7	3,6
Ácido heptadenóico	75,3	1,7
Tetradecanoato de butila	70,1	3,4
Dodecanol	47,6	1,5
<i>p</i> -xileno	42,5	9,3
Fenol	42,5	2,8
2,3 dimetil 3-pentanol	42,4	8,6
2,3 dimetil 3-pentano	42,4	4,2
Etil benzeno	40,2	12,1
Benzoato de geranil	39,3	4,4
Isobutanoato de butila	34,7	1,4
<i>m</i> -xileno	33,5	6,3
Nonanal	32,1	4,1
Nonadecano	32,1	1,1
Octanol	31,7	2,0
Octanal	28,5	1,7
Dodecalactona	28,2	1,2
3-hexanona	26,6	1,5
Tolueno	23,8	7,2
2-hexenal	23,0	10,1
2-metilhexanol	23,0	6,4
2 metil tiofeno	22,3	1,1
Hexadecanol	21,7	1,3
Benzofenona	21,7	1,0
Hexadecalactona	19,6	2,0
2,4 dimetil 3 pentanol	18,4	1,5
Hexanol	10,9	14,1
2-heptanol	10,4	1,5
Heptadecanal	7,8	3,8
2,2,5,5 tetrametil hexano	7,2	1,5
Butanoato de butila	7,2	1,9
Acetato de isobutila	6,2	4,8

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

A fermentação realizada com o soro *in natura* (não esterilizado) apresentou maior consumo de proteínas, lactose e maior teor de acidez total quando comparado às fermentações realizadas com o soro estéril e a levedura *Kluyveromyces lactis* (fermentações 1 e 2), tendo em vista que o processo foi realizado com a flora microbiana natural do soro, a qual é caracterizada principalmente pela presença de bactérias lácticas homofermentativas.

Compostos de alto valor agregado foram obtidos a partir da extração dos voláteis dos 3 produtos fermentados utilizando as técnicas *headspace dinâmico*, Líquido-líquido e Destilação e Extração Simultânea. O número de picos de compostos voláteis obtidos pela técnica *headspace dinâmico* (362) foi maior na fermentação realizada com *kluyveromices lactis* na concentração de 9,0 g/L (Fermentado 1) do que na fermentação realizada com o dobro da concentração deste microrganismo (Fermentado 2).

Tendo em vista o objetivo deste trabalho, fica evidente que se pode aproveitar o soro de queijo do tipo coalho, reduzindo assim seu potencial poluidor do meio ambiente, extraindo do soro fermentado após 30 horas de fermentação dois compostos do maior valor sendo 2-hexadecenal e o ácido octadecanóico usando a técnica do *headspace dinâmico*.

CAPÍTULO 6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIQ. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO. Controle da poluição em indústria de queijo. In: **Leite e derivados**, n. 99, mar/abr. p. 64-65, 2007.

ABREU, L. R. **Tecnologia de leite e derivados**. 1 ed. Lavras: UFLA/FAEPE, 2000.

ALBERTAZZI, E. CARDILLO, R. SERVI, S. ZUCCHI, G. Biogeneration of 2-henylethanol and 2-phenylethylacetate important aroma components biotechnology letters (1994) **5**, 491-496

ANDRADE, R. L. P.; MARTINS, J.F.P Influencia da adição de féculas de batata doce sobre a viscosidade do permeado de soro de queijo. **Ciência e Tecnologia de alimentos**, Campinas, v.22, n.3, p.249/253, set/dez, 2002.

AQUINO, L.C.L; RAMALHO, S.A. Estudo cinético do processo de fermentação alcoólica a partir do soro do queijo, Anais do XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Recife, PE, 2008.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 3ª ed. Viçosa: UFV, 2004.

ARMSTRONG, D. W.; BROWN, L.A. Aliphatic, aromatic, and lactone compounds. **In: Bioprocess Production of Flavor, Fragrance, and Color Ingredients**, edited by Alan Gabelman, 1994.

BANAT, I. M.; NIGAM, P.; MARCHANT, R. the isolation of thermotolerant fermentative yeast capable of growth at 520C and ethanol production at 480C e 500C. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. V.8, p.259-263, 1992.

BEHMER, M. L. A.; **Tecnologia do Leite** – 15ª Edição, Editora Nobel, São Paulo – SP, 1991.

BEHRENS, J. H. (1999), Fermentação láctica de leite de soja por culturas probióticas comerciais: monitoramento do processo fermentativo e avaliação sensorial de aceitação. **Dissertação de Mestrado**, 109p., Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil.

BELEM, M. A. F.; LEE, B. H. oligossacarídeos extraídos das paredes celulares de *Kluyveromyces marxianus* cultivado em whey. **Biotechnol. Technol.** V. 12 (3), p. 229-233, 1998.

BERGER, R. G. *Aroma Biotechnology* 1st. ed. Berlin: Springer- Verlag, 1995, 239p.

BEZERRA, A.K.N.A.; SOUZA, J.R.M. **Utilização de soro de queijo na elaboração de pães**. Unicentro, Guarapuava, 2005.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 1995.

BONEKAMP, F. J. & OOSTEROM, J. On the safety of *Kluyveromyces lactis* – a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41, p. 1-3, 1994.

BRAGA, L.N. **Questão de Opinião**, 03 de agosto de 2007 às 06:45

BRANCHAT, G. R.; CABISCOL, E.; TAMARIT, J.; ROS, J. Oxidative damage to specific proteins in replicative and chronological-aged *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 30, p. 31983-31989, 2004.

BROCK, T. D.; MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M. *Industrial Microbiology In: Biology of Microorganisms*. New Jersey: Prentice-hall, 7ª ed., p. 361-396, 1994.

BUCHHOLZ, K. D.; PAWLISZYN, J. Optimization of solid-phase microextraction conditions for determination of phenols. **Anal. Chem.**, v. 66, p. 160-167, 1994. 63

CAMPOS, L. L. Obtenção e caracterização de mutantes de *Kluyveromyces lactis* selecionados em cultura contínua utilizando soro de queijo ultrafiltrado. Viçosa, UFV. Imprensa Universitária, 59p., 2001 (Tese de Mestrado).

CAPITANI, C. D. *et al.* Milk whey protein recuperation by coacervation with polysaccharide. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 40, n.11, 2005, p.1123-1128.

CARNEIRO, J. C. S.; MINIM, V. P. R.; SOUZA JR, M. M. de. Sensory profile and acceptability of cultivars of beans (*Phaseolus vulgaris L.*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n.1, 2005, p.18-24.

CARVALHO, M. P. Soro de leite uma oportunidade desperdiçada. In: **A cadeia produtiva do leite em 40 capítulos**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite. 2005.

CEBALLOS, B.S.O ; KONIG, A., LIMA, L.M.M. Comportamento das águas residuais brutas e tratadas de uma industria de laticínios durante um dia de funcionamento. Anais do **XXVII Congresso Internacional de engenharia Sanitária e Ambiental**, 2000.

CASALIS, J. Consideraciones sobre la utilización de acto suero en la industria de alimentación. **Rev. Española de Lecheria**, v.94, n.221, 1974.

CONDACK, L.; FURTADO, M.M.; MOSQUIM, M.C.A.V.; RODRIGUES, L.H. Utilização do concentrado protéico de soro ultrafiltrado (CPSU) na fabricação de requeijão cremoso. **Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes**, v.49, n.289, p.46-54, 1994.

CRISTIANINI, M.; ROIG, S.M. Uso de sólidos de soro de queijo na fabricação de iogurte. **Rev. Instit. Latic. Cândido Tostes**, v.42, n.250, p.41-44, 1987.

CHEETHAM, P. S. J. The use of biotransformations for the production of flavours and fragrances *Trends in Biotechnology* (1993) **11**, 478-488

DALLAS, P. e LAGRANGE, V. **Aplicações de derivados de soro em produtos lácteos. Indústria de Laticínios** v.2 n.13:49-51. 1998.

DENDER, A. G. F. **Revisão atualizada de pesquisa – soro de queijo. Seminário proteínas de soro de leite – uso de queijo como ingrediente.** São Paulo. 1997

DETERMINATION, of the nitrogen content. Inter. Dairy Fed. Standard, N. 20B, 1993. (IDF-20B:1993).

DETERMINATION, of total solids content. Inter. Dairy Fed. Standard, N. 21B, 1993. (IDF-21B:1993).

Diário do Nordeste, caderno 3, 04/04/2008. “Produção e consumo da Iguaria”.

FABRE, C. E.; DUVIAU, V.J.; BLANC, P.J.; GOMA, G. Identification of volatile flavor compounds obtained in culture of *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology Letters**, v. 17, n. 11, p. 1207-1212, 1995.

FAIN-JR.; LOEWENSTEIN, M.; SPECK, S.J.; BARNHART, H.M.; FRANK, J.F. Cottage cheese whey derivatives as ingredients of cottage cheese creaming mixes. **Journal of Dairy Science**, v.63, n.6, p.905-911, 1980.

FERON, G.; BONNARME, P.; DURAND, A. Prospects for the microbial production of food flavours. **Trends in Food Science & Technology**, v.7, p. 285-293, 1996.

FERREIRA, C. L. L. F. **Produtos lácteos fermentados: aspectos bioquímicos e tecnológicos.** Viçosa, MG: Ed. UFV, 2001.

FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in Lipid Research**, v. 43, p. 228-265, 2006.

FRAZÃO, N. **Estudo do mercado de soro lácteo em Portugal.** Anil, 2001.

FURLAN, S.A.; CARVALHO-JONAS, M.F.; MERKLE, R.; BÉRTOLI, G.B.; JONAS, R. Aplicação do sistema *Microtiter Reader* na seleção de microrganismos produtores de beta-galactosidase. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 38, p.1261-1268, 1995.

FURTADO, M.A.M. & WOLFSCHOON-POMBO. Quantificação de soro de queijo adicionado ao leite pasteurizado através da determinação do número de caseína. **Rev. do Inst. de Latic. Candido Tostes**, 42(260):3-11, 1988.

FURTADO, M. M.; **A arte e a ciência do queijo** – 2º Edição, Editora Globo, São Paulo – SP, 1991.

GATFIELD, I.L. Enzymatic generation of flavour and aroma components. In: KING, R.D. (Ed.); CHEETHAM, P.S.J. **Food Biotechnology**. 2v. London: Elsevier, 1988. p.59-82.

GATFIELD, I.L. Enzymatic and microbial generation of flavor. **Perfumer & Flavorist**, v.20, p. 5–14, 1995.

GILLILAND, S.E.; STEWART, C.F. Amount of yeast and whey protein recovered from cottage cheese whey cultured with *Kluyveromyces fragilis*. **Journal of Dairy Science**, v.63, n.6, p.989-990. 1980

GODINA, A.L. **Proteínas de origem láctea em preparados alimentícios**. Via Láctea, v.25, n.21, 1974.

HAMILTON-KEMP, T.R.; ARCHBOLD, D.D.; LOUGHRIN, J.H.; COLLINS, R.W.; BYERS, M.E. Metabolism of Natural Volatile Compounds by Strawberry Fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, n.9, p.2802, 1996.

HERNÁNDEZ-ORTE, P. et al. Effect of the addition of ammonium and amino acids 66
musts of Airén variety on aromatic composition and sensory properties of the obtained

wine. **Food Chemistry**, London, v.89, p.163-174, 2005.

HIDALGO, J.; CAMPER, E. Solubility and heat stability of whey protein concentrates. **Journal of Dairy Science**, v.60, n.1515, 1977.

HOLMES, D.G. Whey products. New Zeland. **Journal of Dairy Science and Technology**, v.14, n.2, p.208-211,1979.

HOLSINGER, V.H.; POSATI, L.P.; DEVILBISS, E.D. Whey beverages: A review. **Journal of Dairy Science**, v.57, p.849-859, 1974.

HOMEM, G.R. **Avaliação técnico-econômica e análise locacional de unidade processadora de soro de queijo em Minas Gerais**. Viçosa: UFV, 2003.

HUGHES, D. B.; TUDROSZEN, N. J.; MOYE, C. J. The effect of temperature on the kinetics of ethanol production by thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology Letters**. V. 6, p. 1-6, 1984.

IAL - INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. Brasília: IAL, 2005.

IZZO H. V., HO C.T. Ammonia affects maillard chemistry of an extruded autolyzed yeast extract: pyrazine aroma generation and brown color formation *Journal of food science* (1992) **3**, 657-674

JANSSENS, L.; DE POOTER, H.L.; SCHAMP, N.M.; VANDAMME, E. J. Production of flavours by microorganisms. **Process Biochemistry**, v.27, p.195-215, 1992.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. Porto Alegre: ARTMED. 6. ed, 2005.

JIANG, J. Volatile metabolites produced by *Kluyveromyces lactis* and their changes during fermentation. **Process Biochemistry**, v. 30, n. 7, p. 635-640, 1995.

JULIANO, A.M.M.; PETRUS, J.C.C e TORRANO, A.D.M. **Recuperação por ultrafiltração das proteínas do soro para produção de queijos.** Ver. Inst. Cândido Tostes v.42 n.251:3-6.1987.

KATAOKA, H.; LORD, H.L.; PAWLISZYN, J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. **Journal of chromatography A**, v, 880, p. 35-62, 2000.

KOGAN, N.; FREEMAN. A. Development of macrocapsules containing bioflavors generated *in situ* by immobilized cells. **Process Biochemistry**, v. 29, n. 8, p. 671–677, 1994.

KOSIKOWSKI, F.U. Greater utilization of whey powder for human consumption and nutrition. **Journal of Dairy Science**, v.50, n.8, p.1343-1345, 1967.

KOSIKOWSKI, F.V. **Whey utilization and whey products.** Journal of Dairy Science. v. 62, n. 7, p. 1149-1159, 1979.

KRINGS, U.; BERGER, R.G. Biotechnological production of flavours and fragrances. **Applied of Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.49, p.1-8, 1998.

KUMAR, V. 1988. **Cloning and expression of the *Aspergillus niger* β -galactosidase gene in *Saccharomyces cerevisiae*.** Ph. D. Thesis, University of London.

LAGRANGE, V. e DALLAS, P. **Produtos de soro dos EUA: disponibilidade, recursos tecnológicos, aplicações.** **Engenharia de Alimentos** v.15:27-29.1997.

LANDRAF, M.G.M.; FRANCO, B.D.G **Microbiologia dos Alimentos.** São Paulo: Ed. Atheneu, 2002.

LOUVEL, M.; BREUNIG, K. D.; FUKUHARA, H. *Kluyveromyces lactis* – areview. **Molecular Microbiology**, v. 25, p. 139-188, 1996.

68

MACEDO, R. E. F. (1997), Desenvolvimento de bebida láctea fermentada a base de Extrato Hidrossolúvel de Soja e Soro de leite de búfala por cultura mista de *Lactobacillus casei* Shirota e *Bifidobacterium adolescentis*. **Dissertação de Mestrado**, 98 p., Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.

MANN, E.J. Whey utilization. Part 1. **Dairy Industries International**, v.7, n.21, 1976.

MANLEY, C.H. **The development and regulation of flavor, fragrance, and color ingredients produced by biotechnology. Process of production of flavor, fragrance and color Ingredients**, edited by Alan Gabelman, p. 19–39, 1995.

MATHUR, B.M., SHAHANI, K.M. Use of total whey constituents for human foods. **Journal of Dairy Science**, 62: 99-105, 1979.

MATOS, A.T. **Tratamento de Resíduos Agroindustriais**. Viçosa: AEAGRI. 2005, 1p. (Curso sobre Tratamento de Resíduos Agroindustriais).

MARASCO, E.; SCHMIDT-DANNERT, C. Towards the biotechnological production of aroma and flavour compounds in engineered microorganisms. **Applied Biotechnology, Food Science and Policy**, v. 1, n.3, p. 145-157, 2003.

MARQUES, D.B. **Produção e caracterização de aroma de frutas por *Pichia membranaefaciens***. Dissertação de Mestrado, FEA/UNICAMP, Campinas, SP, Brasil,1998.

MEDEIROS, A. B. P. **Produção de compostos voláteis aromáticos por *Kluyveromyces marxianus* em fermentação no estado sólido**. Dissertação de Mestrado, UFPR, Curitiba, PR, Brasil,1998.

MIRANDA, T.L.S.; SANTOS, R.C.S.; PORTO, L.M. Determinação das melhores condições operacionais do processo de produção da ricota. **B. CEPPA**, Curitiba, v 69 n.1, p.173-182, jan/jun.2005

MOHLER, M.R., HUGUNIN, P.G., EBER, S.K. Whey-bases nonfat milk replaces in light chocolate-flavoured compounds coolings. **Food Technology**, v.35, n.6, p.79-81, 1981.

MORA, C. V. Effect of heting and elevated temperature storage on cheese whey. **Journal of Food Science**, v. 55, n. 4, p. 1177-1179, 1990.

MORR, C.V. Whey protein concentrates: an update. *Food Tecnology*. v.30, n.3 p.18-22, 42, 1976

NELSON, F.E.; BROWN, W. Corroson whey utilization in fruit juice drinks. **Journal of Dairy Science**, v.52, n.6, p.901, 1969.

NETO, R.S.; PASTORE, G.M. Seleção de Microrganismos Produtores de Gamadecalactona. **In:** 4º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, Campinas, SP, 2001.

NUNES, M.F.A.; MASSAGUER, S.; ALEGRE, R.M. Produção e propriedades de β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis*. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 29, n. 1, p. 25-30, 1993.

OMAR, M.M.; ASHOUR, M.M. **Studies on the whey utilization in cheese making Ras Cheese**. Mahrunj, v.25, n.8, p.741-748, 1981.

ORCHARD, R.L. Waster and effluent requirements of the dairy industry. **American Dairy Review**, v.45, n.5, p. 45-57, 1972.

ORDÓÑEZ, J. A.; **Tecnologia de Alimentos: Alimentos de origem animal** – Volume 2, Editora Artmed, Porto Alegre – RS, 2005.

70

PASTORE G. M., SATO H. H., YANG T. S., PARK Y. K., MIN D. B. Production of fruity aroma by newly isolated yeast *Biotechnology letters* (1994) **4**, 389-392

PONSANO, E. H. G. & CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. Fermentação do soro de queijo por *Kluyveromyces fragilis* como alternativa para redução de sua capacidade poluente. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 15, n. 1, p. 170-173, jul.-dez. 1995.

PRUDENCIO, E. S.; BENEDET, H. D. Aproveitamento do soro de queijo na obtenção do extrato hidrossolúvel de soja. ***Ciência e Tecnologia de Alimentos***, Campinas, v. 19, n. 1, 1999.

RABENHORST, J. Biotechnology production of natural aroma chemicals by fermentation process. In: REHM, H. J.; REED, G. (Eds.). ***Biotechnology***. 2. ed. Weinheim: J.Wiley, 2000. p.331-349. v.8b.

REVILLION, Jean p., BRANDELLI, Adriano e AYUB, Marco A. Z. Produção de extratos de leveduras de uso alimentar a partir do soro de queijo: abordagem de elementos técnicos e mercadológicos relevantes. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 20, n. 2, p. 246-249, maio/ago.2002.

RICHARDS, N. S. P.S. Emprego racional do soro láctico. In: ***Indústria de laticínios***. p. 67-69. mai/jun 1997.

SARIASLANI, F.S.; ROSAZZA, J.P.N. Biocatalysis in Natural Products Chemistry. ***Enzyme Microbiology and Technology***, v.6, p.242–253, 1984.

SÁNCHEZ-CONTRERAS, A.; JIMÉNEZ, M.; SÁNCHEZ, S. Bioconversion of lutein to products with aroma. ***Applied Microbiology and Biotechnology***, v. 54, p. 528-534, 2000.

SEVERO, L.M.B. Desenvolvimento de uma bebida láctea a base de soro de leite fermentado. **Tese mestrado**. 74p. Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 1995.

71

SCHAFFRATH, R. & BREUNING, K. D. Genetics and molecular physiology of yeast *Kluyveromyces lactis* – a review. ***Fungal Genetics and Biology***, v. 30, p. 173-190, 2000.

SCHARPF, L. G.; SEITZ, E. W.; MORRIS, J. A.; FARBOOD, M. I. Generation of flavor and odor compounds through fermentation processes. **In: Biogenesis of aromas.** Washington, DC, ACS Symposium Series. 317, p. 323-346, 1986.

SCHRADER, J. et al. Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavour compounds – current industrial process and future prospects. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v.26, p.463-472, 2004.

SEREBRENNIKOV, V. M. Effects of temperature on the biosynthesis of 2,3-butanediol and acetoin under varying conditions of batch culturing of *Bacillus polymyxa* CCM 1465 Appl. Biochem. Microbiol. (1995) **6**, 537-542

SILVA, M. R. (1999), Elaboração e avaliação de uma bebida láctea fermentada a base de soro de leite fortificada com ferro. **Dissertação de Mestrado**, 121 p., Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil.

SILVA, K.; BOLINI, H. A. Avaliação sensorial de sorvete formulado com produto de soro ácido de leite bovino. In: **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. n.26 p.116-122, jan/mar 2006.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A; SILVEIRA, N. F. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997.

SILVEIRA, W. B. Produção de etanol em permeado de soro de queijo por *Kluyveromyces lactis* UFV-3. Viçosa, UFV. Imprensa Universitária, 56 p., 2004 (Tese de Mestrado).

SILVEIRA W. B.; PASSOS, F. J.; MANTOVANI, H. C.; PASSOS, F. M. Ethanol production from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV- 3: A flux 72 oxido-reductive metabolism as a function of lactose concentration and oxygen level. **Enzyme and Microbial Technology**. V. 46, p. 141-209, 2005.

SINGLETON, A.D. **The use of whey in dairy products**. Illinois, 1972.

SISO, M.I.G. **The Biotechnological utilization of cheese whey: A review**. *Bioresource Technology*, v.57, p.1-11, 1996.

SOUZA, J. R. M.; BEZERRA, J. R. M. V.; BEZERRA, A. K. N. A. Utilização de soro de queijo na elaboração de pães. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 7, n. 1, 2005.

SOAVE, P.B.; LACERDA, T.H.M. Acompanhamento da vida útil de bebidas lácteas: influência do soro do queijo e culturas contendo organismos probióticos. **Anais da V amostra acadêmica da UNIMEP**, 2007.

SUZART, C.A.G.; DIAS, J.C.T. **Desenvolvimento Tecnológico de Aguardente de Soro de Queijo**. Campus Juvino Oliveira: Itabuna, 2007.

TAHARA, S.; MIZUTANI, J. Gama-lactones produced by *Sporobolomyces odorus*. **Agricultural Biological Chemistry**, v. 39, n. 1, p. 281-282, 1975.

TEIXEIRA, J.A.; DOMINGUES, L.; LIMA, N. **Novas tecnologias para a fermentação alcoólica do soro de queijo**. Universidade do Minho, Braga, 2000.

TORRES, C. C. **Bebidas à base de soro de queijo: caracterização físico-química, microbiológica e sensorial**. Tese mestrado. 117p. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. MG. 1988.

TORRES, C.C.; BRANDAO, S.C.C.; PINHEIRO, AJ.R. Desenvolvimento de bebidas de baixo custo com soro de queijo. **Rev. Instit. Latic. Cândido Tostes**, v.44, n.261-266, p.71-84, 1989.

73

TORTELLI, S. (2002), Desenvolvimento de bebida láctea fermentada utilizando como substratos extrato hidrossolúvel de soja e soro de leite. **Trabalho de Conclusão de Curso**, 78 p., Universidade Regional Integrada, Erechim, Brasil.

TORTELLI, S., Di LUCCIO, M., DARIVA, C., VALDUGA, E. e Oliveira, D. (2002), Otimização do crescimento de uma cultura mista de *S.thermophilus* e *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* em função da temperatura, pH e agitação. **Anais do Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Porto Alegre, v.1, CD-ROM.

VANANUVAT, P.; KINSELLA, J.E. Production of yeast protein from crude lactose by *Saccharomyces fragillis*. Batch culture studies. **Journal of Food Science**, v.40, n.2, p.336-341, 1975

VARGAS, M.A.O.; VARGAS, O.L., LIMA, A. Estudo para substituição da água de cocção do arroz por soro de queijo de leite de vaca. **Rev. Instit. Latic. Cândido Tostes**, v.38, n.227, p.41-46, 1983.

VOOBERGEN, M.; ZWANENBERG, A. Whey-ing up the future. **Dairy Industries International**, v.67, n.1, p.25-28, 2002.

WALKER, G. M. **Yeasts physiology and biotechnology**. Ed. Jonh Wiley & Sons Ltd. New York. 1998.

WEBB, A.D. Wine Flavor: Volatile aroma components of wines. In: SCHULTZ ,H.W. (Ed.); DAY, E.A.; LIBBEY, L.M. **Symposium on Foods: The Chemistry and Physiology of Flavors**. Westport, Connecticut: The AVI Publishing Company INC, 1967. p.203-227.

WELSH, F. W. Overview of bioprocess flavor and fragrance production. **In: Bioprocess production of flavor, fragrance and color ingredients**, edited by Alan Gabelman, 1995.

WELDHAUSEN, R. JR.; BLOSFELD, M.A.; SILVA, R. A; ROCCO, E. Seleção de microrganismos do gênero *Cândida* produtores de aroma de pêssego por
74
biotransformação do ácido ricinoléico. **In: 4º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, Campinas, SP, 2001.

ZADOW, J.G. **Utilisation of milk components:whey.** In: ROBINSON, R. K. **Modern Dairy Technology** vol. 2. Advances in Milk Products. 1997.

ZINI, C. **Estudo de compostos voláteis de algumas espécies de eucalipto através de uso de micro extração em fase sólida.** Tese de Doutorado em Química, UFRGS, 2002.

ZUÑIGA, A.D.G.; COMIBRA, J.S. R. **Propriedades funcionais e nutricionais das proteínas do soro de leite.** Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”, v. 57, no 325, p. 35-46. mar/abr. 2002.

ZUÑIGA, A.D. G.; FERREIRA, R.C.; COIMBRA, J.S. R.; MINIM, L. A. **Quantificação de proteínas no soro de queijo através de cromatografia líquida de fase reversa.** Revista Instituto “Cândido Tostes”, Juiz de Fora, p. 17-21, n. 316, v. 54, set./out. 2000