



**INSTITUTO POLITÉCNICO DE COIMBRA**  
**ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA**

**Mestrado em Engenharia Alimentar**

Relatório de Estágio Profissionalizante

**Produtos lácteos fermentados à base de soro de leite de  
ovino**

**Luís Ricardo França Gouveia**

Coimbra, 2016



**INSTITUTO POLITÉCNICO DE COIMBRA**  
**ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA**

**Mestrado em Engenharia Alimentar**

Relatório de Estágio Profissionalizante

**Produtos lácteos fermentados à base de soro de leite de  
ovino**

**Luís Ricardo França Gouveia**

Coimbra, 2016



**INSTITUTO POLITÉCNICO DE COIMBRA**  
**ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA**

**Mestrado em Engenharia Alimentar**

Relatório de Estágio Profissionalizante

**Produtos lácteos fermentados à base de soro de leite de  
ovino**

**Luís Ricardo França Gouveia**

Orientador: Dr. Carlos Dias Pereira

Local de estágio: Departamentos de lacticínios (ESAC)

Coimbra, 2016



## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer em primeiro lugar aos meus pais e irmão por me terem ajudado a ultrapassar mais uma etapa da minha vida académica.

Um agradecimento especial ao professor Dr. Dias Pereira, por me deixar pertencer a este projeto, por todo o apoio e disponibilidade prestados durante o estágio e elaboração do relatório.

Um agradecimento especial à professora Marta Henriques por todo o apoio prestado durante do estágio

Agradeço também ao professor David Gomes, por todas as sugestões fornecidas para a elaboração deste projeto, ao Jorge Viegas por toda a disponibilidade e ajuda ao longo do estágio e à Sra. Lurdes, Sra. Adélia e Jorge Arede pelas suas preciosas ajudas na parte de produção.

Um muito obrigado aos meus colegas de Mestrado Jorge Santos e Diana Quaresma por todo o bom ambiente e sobretudo, toda a amizade que foi sendo criada e fortalecida ao longo deste percurso.

## RESUMO

O presente trabalho, foi desenvolvido no âmbito da unidade curricular de estágio profissionalizante do Mestrado em Engenharia Alimentar, na Escola Superior Agrária de Coimbra. A componente prática foi toda ela desenvolvida no departamento de laticínios da instituição, durante sensivelmente 6 meses.

Este trabalho apresenta uma solução alternativa para a recuperação de componentes à base de soro de leite de ovinos em fábricas de queijo. Esta solução foi apresentada devido às fábricas não possuírem capacidade de concentrar o soro de leite, onde este, constitui uma quantidade significativa de subproduto na fabricação de queijos. Normalmente é utilizado diretamente para alimentação animal, ou é simplesmente descartado. Posto isto, por meio da ultrafiltração (UF), foram obtidos os concentrados líquidos de proteínas de soro de leite de ovinos (CLPS). Após a obtenção dos concentrados, foram criados dois tipos de produtos fermentados: um à base de grãos de kefir e outro à base de bactérias probióticas comerciais.

As análises microbiológicas, físico-químicas (composição bruta, pH, acidez titulável) e propriedades reológicas dos produtos mencionados anteriormente, foram avaliadas e comparadas durante a fermentação e ao longo de 7º, 14º e 21º dias, em que foram armazenados numa câmara de refrigeração.

Contudo, os resultados foram muito positivos e motivadores, visto que os produtos fermentados apresentaram quantidades adequadas de *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp. ( $> 7 \text{ Log}_{10} \text{ CFU mL}^{-1}$ ) e leveduras ( $> 6 \text{ Log}_{10} \text{ CFU mL}^{-1}$ ). As propriedades reológicas dos produtos líquidos mantiveram-se estáveis durante os 21 dias de armazenamento em câmara de refrigeração. No entanto, os produtos do tipo gel apresentaram algumas variações na viscosidade após 14 dias, nos casos em que estavam presentes os grãos de kefir. Foi realizada uma análise sensorial após o 14º dia de armazenamento, onde os provadores tiveram preferência pelos fermentados do tipo líquido e preferiram o produto sem a adição de polpa de fruta.

**Palavras-chave:** Ovinos, Soro de leite, Ultrafiltração, Kefir, Probióticos.

## ABSTRACT

The present work was developed within the scope of the professional internship curricular unit from the Master in Food Engineering, at Escola Superior Agrária de Coimbra. The practical component was all developed in the dairy department of the institution, during approximately 6 months.

This work presents an alternative solution for the recovery of whey based components from ovine in cheese factories. This solution was presented because the factories do not have the ability to concentrate whey, where it constitutes a significant amount of by-product in the cheeses manufacture. It is usually used directly for animal feed, or is simply discarded. Therefore, by means of ultrafiltration (UF), the ovine liquid whey proteins concentrates (LWPC) were obtained. After obtaining the concentrates, two types of fermented products were created: one based on kefir grains and another based on commercial probiotic bacteria.

The microbiological, physical-chemical analysis (crude composition, pH, titratable acidity) and rheological properties of the aforementioned products were assessed and compared during the fermentation and throughout the 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> days, where they were stored in a refrigeration chamber.

However, the results were very positive and motivating, since the fermented products had adequate amounts of *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp. ( $> 7 \text{ Log}_{10} \text{ CFU mL}^{-1}$ ) and yeasts ( $> 6 \text{ Log}_{10} \text{ CFU mL}^{-1}$ ). The liquid products rheological properties remained stable during the 21 days of storage in the refrigeration chamber. However, the gel type products showed some variations in viscosity after 14 days in the cases where kefir grains were present. A sensorial analysis was performed after the 14<sup>th</sup> day of storage, where the tasters had preference for liquid type fermented and preferred the product without the addition of fruit pulp.

**Keywords:** Ovines, Whey, Ultrafiltration, Kefir, Probiotics

## ÍNDICE

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>i</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>ii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>vi</b>
<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	<b>vii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>viii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Composição do soro de bovino e ovino</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1.1 Problemas ambientais provocados pelo soro</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1.2 Possíveis aplicações do soro</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1.3 Propriedades nutricionais das proteínas do soro</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1.4 Composição do soro Ácido e do soro Doce</b> .....	<b>3</b>
<b>1.2 Bebidas lácteas fermentadas à base de kefir e probióticos</b> .....	<b>4</b>
<b>1.2.1 Culturas probióticas</b> .....	<b>4</b>
<b>1.2.2 O efeito probiótico do kefir</b> .....	<b>5</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>6</b>
<b>2.1 Produção do CLPS</b> .....	<b>6</b>
<b>2.2 Produção dos produtos fermentados</b> .....	<b>7</b>
<b>2.3 Análises físico-químicas</b> .....	<b>7</b>
<b>2.4 Análises microbiológicas</b> .....	<b>8</b>
<b>2.5 Análise sensorial</b> .....	<b>8</b>
<b>2.6 Análises estatísticas</b> .....	<b>8</b>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>3.1 Análises físico-químicas</b> .....	<b>9</b>
<b>3.2 Análises microbiológicas</b> .....	<b>17</b>
<b>3.3 Análise sensorial</b> .....	<b>20</b>

<b>4. CONCLUSÃO</b> .....	<b>21</b>
<b>5. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>22</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Instalação piloto do UF da ESAC .....	6
Figura 2 – Composição química total.....	9
Figura 3 – pH e acidez titulável durante a fermentação .....	11
Figura 4 – pH e acidez titulável durante o tempo de armazenamento.....	12
Figura 5 – Módulo de elasticidade e de viscosidade dos produtos tipo liquido .....	14
Figura 6 – Módulo de elasticidade e de viscosidade dos produtos tipo gel.....	15
Figura 7 – Viscosidade dinâmica .....	17
Figura 8 – Contagens microbianas .....	19
Figura 9 – Análise sensorial .....	20

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 – Composição do soro láctico de bovino e ovino.....	1
Quadro 2 – Utilização de produtos à base de soro de leite.....	2
Quadro 3 – Composição do soro Ácido e do soro Doce .....	3

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**ABT** – *acidophilus bifidus-thermophilus*

**AT** – Acidez titulável

**CLPS** – Concentrados líquidos de proteínas de soro de leite

**DOP** – Denominação de origem protegida

**FVC** – Fator volumétrico de concentração

**ST** – Sólidos totais

**UF** – Ultrafiltração

**UFC** – Unidades formadoras de colônias

**AOAC** – Official Analytical Methods

**G'** – Módulo de elasticidade

**G''** – Módulo Viscoso

**$\eta^*$**  – Viscosidade Complexa

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Composição do soro de bovino e ovino

O soro de leite é obtido através da separação da caseína do leite após a sua coagulação. Este é um subproduto que representa cerca de 85 a 90% do volume de leite usado para a transformação em queijo e retém cerca de 55% dos nutrientes do leite, sobretudo a lactose. O soro é composto maioritariamente por água, lactose, proteínas, minerais e algumas vitaminas (Mizubuti, 1994).

No presente trabalho foi utilizado o soro de ovino. Na tabela 1 está representada a diferença entre os vários componentes, do soro de ovino e bovino. É de realçar que a quantidade de proteína existente no soro de ovino é superior a do bovino.

**Tabela 1** – Composição do soro de bovino e ovino.

Componentes (%)	Soro de Bovino	Soro de Ovino
<b>Proteína</b>	0,6 – 0,8	0,8 – 1,3
<b>Gordura</b>	0,2 – 0,25	0,35 – 0,4
<b>Minerais</b>	0,5 – 0,8	0,6 – 0,9
<b>Lactose</b>	4,4 – 4,5	4,2 – 5,0
<b>Sólidos totais</b>	5,8 - 6,5	6,1 - 7,6

*Fonte: adaptado (Mizubuti, 1994) (Nataly Leidens, 2013)*

### 1.1.1 Problemas ambientais provocados pelo soro

O soro devido à sua constituição acarreta um grande problema do ponto de vista ambiental. O soro é altamente poluente, com uma carência bioquímica de oxigénio de 32-60 g por litro devida à sua elevada composição em compostos orgânicos, sendo que o seu tratamento como efluente para eliminação no meio ambiente se torna extremamente difícil e dispendioso, sendo mais lógico encará-lo como uma fonte de nutrientes de elevado valor, otimizando a sua recuperação. É estimado que 100 kg de soro líquido têm uma carga poluente equivalente aos detritos produzidos num dia por 45 pessoas (Carla Jorge, 2006).

### 1.1.2 Possíveis aplicações do soro

Existe uma grande variedade de soluções para a utilização do soro. A tabela 2 faz referência a algumas das possíveis utilizações.

**Quadro 2** – Utilização de produtos à base de soro de leite.

<b>Produto</b>	<b>Aplicação</b>
Creme de soro	Manteiga de soro
Soro láctico pasteurizado	Bebidas com soro, sopa, queijos
Proteína de soro láctico	Hidrolisados proteicos, queijos, queijo processado, alimentação para animais, produtos para a panificação
Soro desidratado	Sopa, queijo processado, alimentação para animais, produtos para panificação, caramelos.
Soro em pó	Sobremesas congeladas, produtos de panificação, alimentos para desportistas.
Soro em pó com teor de lactose reduzido	Queijos processados, molhos, carnes industrializadas.
Soro em pó desmineralizado	Sobremesas, produtos de confeitaria, formulação infantil.
Concentrado proteico de soro	Produtos de panificação e confeitaria, queijos, produtos lácteos fermentados, bebidas, alimentos para desportistas.
Isolado proteico de soro	Produtos lácteos, produtos de panificação e confeitaria, alimentos para desportistas.
Soro láctico condensado (doce)	Produtos de panificação, Caramelos.
Lactose	Caramelos, alimentos infantis, xarope de lactose, hidrolisada, preparados em pó para bebidas e sopas, produtos de confeitaria, sobremesas congeladas, produtos de panificação.

Fonte: Adaptado (Chiaradia, 1999)

### 1.1.3 Propriedades nutricionais das proteínas do soro.

As proteínas derivadas do soro possuem um perfil nutricional de qualidade e um teor de aminoácidos equilibrado, particularmente em aminoácidos essenciais. Muitas destas proteínas desempenham funções biológicas específicas no organismo (transportadoras de ferro, proteção imunológica, antioxidantes, transportadores de ácidos gordos, entre outras). O elevado teor em aminoácidos com enxofre e em lisina torna-as também apropriadas para dietas deficientes nestes aminoácidos. Por outro lado, as principais proteínas do soro,  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) e  $\alpha$ -lactalbumina ( $\alpha$ -La) são uma fonte importante de péptidos bioativos (compostos com potencial para promoção da saúde) que podem ser libertados por digestão enzimática (Rocha, Teixeira, & Gonçalves, 2008).

### 1.1.4 Composição do soro Ácido e do soro Doce

A composição do soro ácido e do soro doce (Tabela 3) está diretamente relacionada com a composição original do leite (espécie de raça produtora de leite, tipo de alimentação variações sazonais) mas também está ligada ao processo tecnológico utilizado no fabrico do queijo. De acordo com o processo utilizado na coagulação o soro pode ser classificado em ácido ( $\text{pH} < 5.0$ ) e doce ( $5.8 < \text{pH} < 6.6$ ).

**Quadro 3** – Composição do soro ácido e do soro doce.

Composição (%)	Soro Ácido	Soro Doce
Água	93.5	93
Gordura	0.04	0.2
Proteína	0.7	0.8
Lactose	4.4	4.9
Minerais	0.8	0.5
Ácido Láctico	0.5	0.2

Fonte: adaptado (Trindade & C., 2002)

O soro ácido é obtido a partir da coagulação da caseína do queijo fresco, resultando em uma acidificação do leite por bactérias lácticas ou pela adição direta de ácido láctico. Este tipo de soro contém um teor mais baixo de lactose, e um teor mais alto de cálcio.

O soro doce, por sua vez, é um subproduto obtido a partir da coagulação enzimática da caseína, após tratamento com quimosina que ataca especificamente a *k*-caseína (Mizubuti, 1994).

## **1.2 Bebidas lácteas fermentadas à base de kefir e probióticos**

A bebida láctea fermentada é o produto lácteo resultante da mistura do leite e soro de leite, adicionado ou não de produtos ou substâncias alimentícias, fermentada mediante a ação de culturas de microrganismos específicos. A base láctea deve representar pelo menos 51% (m/m) do total de ingredientes do produto. Em termos de composição geral, as bebidas lácteas têm um valor nutricional correspondente à composição do leite a partir do qual são fabricadas, além das diferenças na concentração de alguns constituintes químicos devido à tecnologia de fabricação envolvida e ao processo de fermentação (Kruger, Kempka, Valduga, Cansian, Treichel, & Oliveira, 2008).

As bebidas lácteas contêm proteínas, gorduras, lactose, minerais e vitaminas, sendo consideradas muito nutritivas. A importância da percentagem de gordura no produto final está relacionada com o fato de que as pessoas cada vez mais estarem à procura de uma alimentação mais saudável, incluindo os alimentos com baixo teor de gordura (*diet e light*). Além dos cuidados com a saúde (alimentos funcionais), existem os cuidados e preocupações com a estética corporal, assunto muito explorado nos últimos anos (Thmer & Penna, 2006).

### **1.2.1 Culturas probióticas**

As culturas probióticas têm sido bastante exploradas pelas indústrias de laticínios como uma ferramenta para o desenvolvimento de novos produtos funcionais. Estes microrganismos probióticos apresentam diversas características, entre elas, de serem seguros, capazes de aderir à mucosa intestinal e tolerantes aos ácidos. Diferentes estirpes de bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Bifidobacterium* têm sido tradicionalmente usadas em produtos lácteos fermentados. A atual tendência é usar culturas lácteas chamadas ABT (*acidophilus bifidus-thermophilus*), que contém *L. acidophilus*, bifidobactérias (*e.g. B. bifidum*) e *S. thermophilus*, cujas culturas devem suportar o processo

de elaboração do bio-produto, bem como, manter a viabilidade celular das estirpes de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum* durante o armazenamento (Silva, et al., 2013).

### **1.2.2 O efeito probiótico do kefir**

O kefir é um produto onde a sua fermentação se realiza com cultivos ácido lácticos elaborados com grãos de Kefir ricos em diversas espécies de microrganismos nomeadamente, *Lactobacillus kefir*, espécies dos géneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* e leveduras com produção de ácido láctico, álcool etílico e dióxido de carbono (Magalhães, 2011).

Os grãos de kefir são massas gelatinosas medindo de 3 a 35 mm de diâmetro, possuem uma aparência semelhante à couve-flor, apresentando forma irregular e coloração amarelada ou esbranquiçada.

Contudo, os grãos de kefir são capazes de fermentar diversos alimentos, como leite de vaca, cabra, ovelha, búfala, açúcar mascavo, sucos de frutas, extrato de soja, entre outros. A produção da bebida ocorre diretamente pela adição dos grãos no substrato de preferência. Mas, de forma geral, o sabor e o aroma do kefir são o resultado da atividade metabólica simbiótica das bactérias e das leveduras que se encontram naturalmente nos grãos (Santos, Silva, Barbosa, & Silva, 2012).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Produção do CLPS

O Soro de leite de ovino foi obtido após a produção de queijo, onde logo de seguida foi transportado para o setor de lacticínios da ESAC. Posto isto, iniciou-se de imediato o processo de UF através da instalação piloto, existente no departamento.



**Figura 1** – Instalação piloto do UF da ESAC.

A produção de CLPS consistiu na concentração do soro de leite entre 45-50 °C no ultrafiltrador, utilizando uma membrana orgânica DSS™ com um *cutoff* de 10kDa. O fator volumétrico de concentração (FVC) foi de 15-20.

Os concentrados do tipo gel foram usados para os produtos fermentados. Relativamente aos concentrados líquidos fermentados, a composição de concentrado foi modificada por uma desnatação efetuada no separador ADB Westfalia™, seguido de diluição com o permeado ultrafiltrado para atingir os níveis desejados de sólidos totais e gordura.

Ambos os concentrados, foram submetidos a um tratamento térmico (90 °C/5 min) para que exista uma desnaturação das proteínas do soro de leite e logo de seguida foi realizada uma homogeneização a 10 MPa utilizando um homogeneizador Rannie modelo BlueTop™

para que os aglomerados de proteína não excedam um diâmetro superior a 10 µm. A homogeneização é essencial para eliminar os grânulos e aumentar a suavidade dos CLPS.

## **2.2 Produção dos produtos fermentados**

Foram utilizados dois tipos de formulações: A primeira em uma forma mais líquida, e com um nível médio de sólidos (app. 20% w/w), e outra de tipo gel com um elevado teor de sólidos (app. 35% w/w). O teor de gordura para produtos que tinham a forma mais líquida, era de 1,5% e para o tipo gel era de 6,5%.

As formulações base continham polpa de fruta (Manga) (10% w/v), sacarose (5% w/v) e um aromatizante (500 ppm) e antes de se adicionar o inóculo foram aquecidas 25 °C. Foram produzidos três tipos de produtos fermentados, com a seguinte formulação:

**1- (a)** Com base em grãos de kefir CIDC (Gomes-Zavaglia, et al., 2011). (2,5% w/v);

**2- (b)** Baseada numa mistura comercial de bactérias probióticas (Sacco™, Lyofast ACR) (0,3% w / v);

**3-** Baseada em uma mistura 1:1 de **(a)** e **(b)**.

Os grãos de kefir utilizados como inóculos foram armazenados a uma temperatura de - 20°C e eram previamente reativados em leite a 25 °C durante 24 h.

Todos os CLPS inoculados foram incubados a 25 °C e ficaram em repouso até atingir o pH ótimo (4,7) que era o desejado. Após a verificação do pH, os grãos de kefir foram removidos. Os produtos obtidos foram armazenados a 5 °C durante 21 dias.

## **2.3 Análises físico-químicas**

A composição físico-química dos produtos (pH, acidez titulável (AT), sólidos totais (TS), cinzas, gordura e proteína) foi determinada através dos métodos padrões portugueses (IPQ, 1990) e também através dos Métodos Analíticos Oficiais (AOAC, 1997). Cada amostra de produto foi registada seguindo o procedimento padrão Português para produtos lácteos (NP4146, 1991).

As Propriedades reológicas foram avaliadas em um reómetro (Rheostress 1, Thermo Haake™) no modo oscilatório. O sistema de medição é efetuado em um cone e prato geométrico, C60 / Ti - 0,052 milímetros (35 mm de diâmetro e 1 ° de ângulo). Os testes foram

realizados a 1 Hz para investigar o comportamento viscoelástico linear reológico dos géis. O módulo de elasticidade ( $G'$ ) e módulo viscoso ( $G''$ ), a viscosidade complexa ( $\eta^*$ ) dos produtos foram avaliados na gama de 0,3-6,5 rad / s a 3 Pa.

## **2.4 Análises microbiológicas**

Após a inoculação (0 h) e consequentemente fermentação (12, 18, 24 h) foram efetuadas as contagens dos microrganismos. As contagens foram efetuadas até ao 14º dia e armazenadas a 5 °C em uma câmara de refrigeração.

As contagens dos *Lactococcus* e *Lactobacillus* foram efetuadas aerobicamente a 37 °C durante 48 h sobre os meios de Agar M17 BK 088 e sobre Agar MRS BK089 (Biokar Diagnostics, França). Para as contagens das leveduras, foi usado o agar cloranfenicol Rose Bengal BK 151 (Biokar Diagnostics, França), a 25 °C após 72 h.

## **2.5 Análise sensorial**

Foram realizados testes de preferência com um painel de provadores não treinados, com 30 pessoas. A análise sensorial foi realizada após o 14º dia de armazenamento, onde os provadores avaliaram o produto de acordo com a seguinte escala:

- 1- Desgosto
- 2- Gosto pouco
- 3- Gosto ligeiramente
- 4- Gosto
- 5- Gosto muito

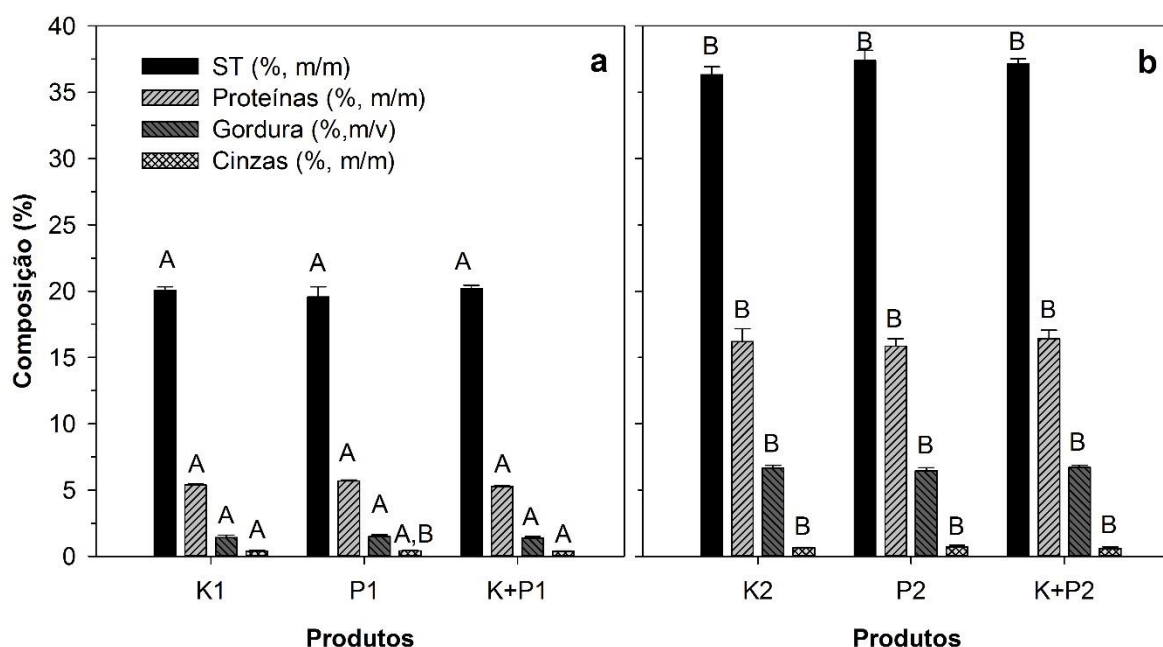
## **2.6 Análises estatísticas**

Análise da variância (ANOVA) para os diferentes testes foi efetuada, utilizando o programa estatístico Statistica 8 Software (Statsoft Inc. EUA). A Comparação entre os diferentes meios foi realizada por o método de Tukey, com 95% de confiança.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Análises físico-químicas

A figura 1 identifica a composição química total dos produtos fermentados. A grande diferença é claramente entre o teor médio de proteína nos produtos do tipo gel ( $16,15 \pm 0,28\%$  w/w) e nos produtos do tipo líquido ( $5,45 \pm 0,21\%$  w/w) o que, juntamente com um nível mais elevado de gordura nos produtos do tipo gel ( $6,61 \pm 0,13\%$  w/w em comparação com  $1,43 \pm 0,07\%$  w/w) faz com que exista efetivamente uma grande diferença entre os dois tipos de produtos, principalmente nas suas propriedades reológicas como se verá adiante.



**Figura 2** – Composição química total: **a)** produtos do tipo líquido, fermentados à base de grãos de kefir (K1), mistura comercial de probiótico (P1) e grãos de kefir + mistura comercial de probiótico (K + P1); **b)** produtos do tipo gel, fermentados à base de grãos de kefir (K2), mistura comercial de probióticos (P2) e grãos de kefir + mistura comercial de probiótico (K + P2). O teor de Sólidos Totais (TS). As letras diferentes (a, b) indicam estatisticamente o grau de significância ( $P < 0,05$ ) para produtos fermentados com esta formulação.

As figuras 3 e 4 revelam a evolução do pH e da acidez titulável durante o período de fermentação e armazenamento a  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Os produtos líquidos atingiram o pH ótimo após 12-18 h de fermentação, enquanto os produtos do tipo sólido só atingiram o pH ótimo após 24 h. Foram observadas diferenças significativas na acidez titulável dos produtos com um nível médio de teor de sólidos totais.

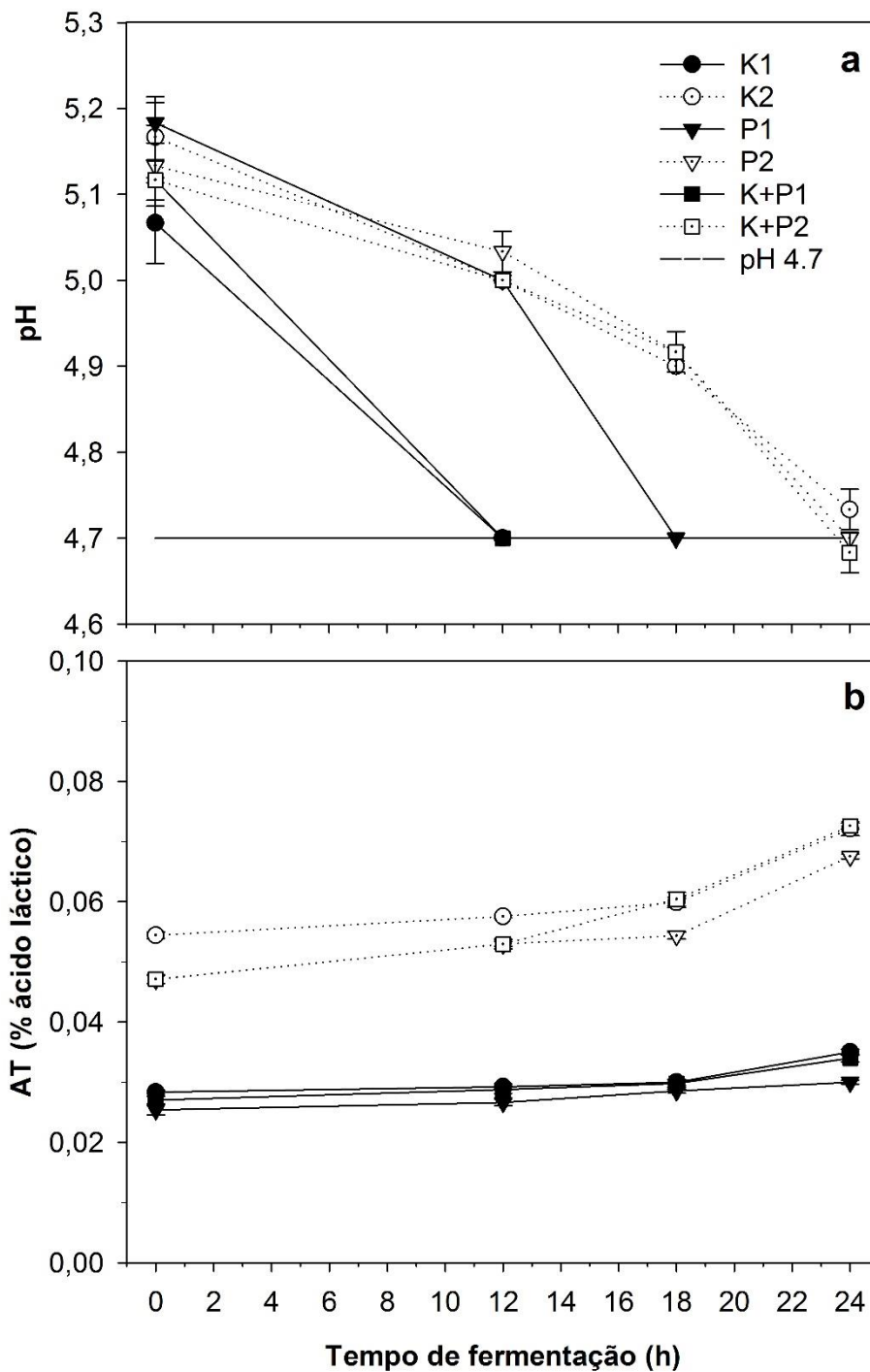
A concentração do ácido láctico nos produtos com um elevado nível de sólidos totais foi quase duas vezes superior à dos produtos com um baixo nível de sólidos totais. No entanto, o pH manteve-se mais elevado nos produtos tipo gel. Isto pode ser justificado através das quantidades de proteínas presentes nos produtos de alto teor de sólidos.

Em ambas as formulações, as quantidades de ácido láctico aumentam apenas 0,02% durante o processo de fermentação. Existe uma elevada acidez antes da fermentação, isto é resultado da acidez inicial do soro de leite, que por sua vez, vai aumentando durante a produção de CLPS. Os concentrados vão sofrer um arrefecimento rápido, que vai permitir por sua vez, níveis mais baixos de acidificação antes da fermentação.

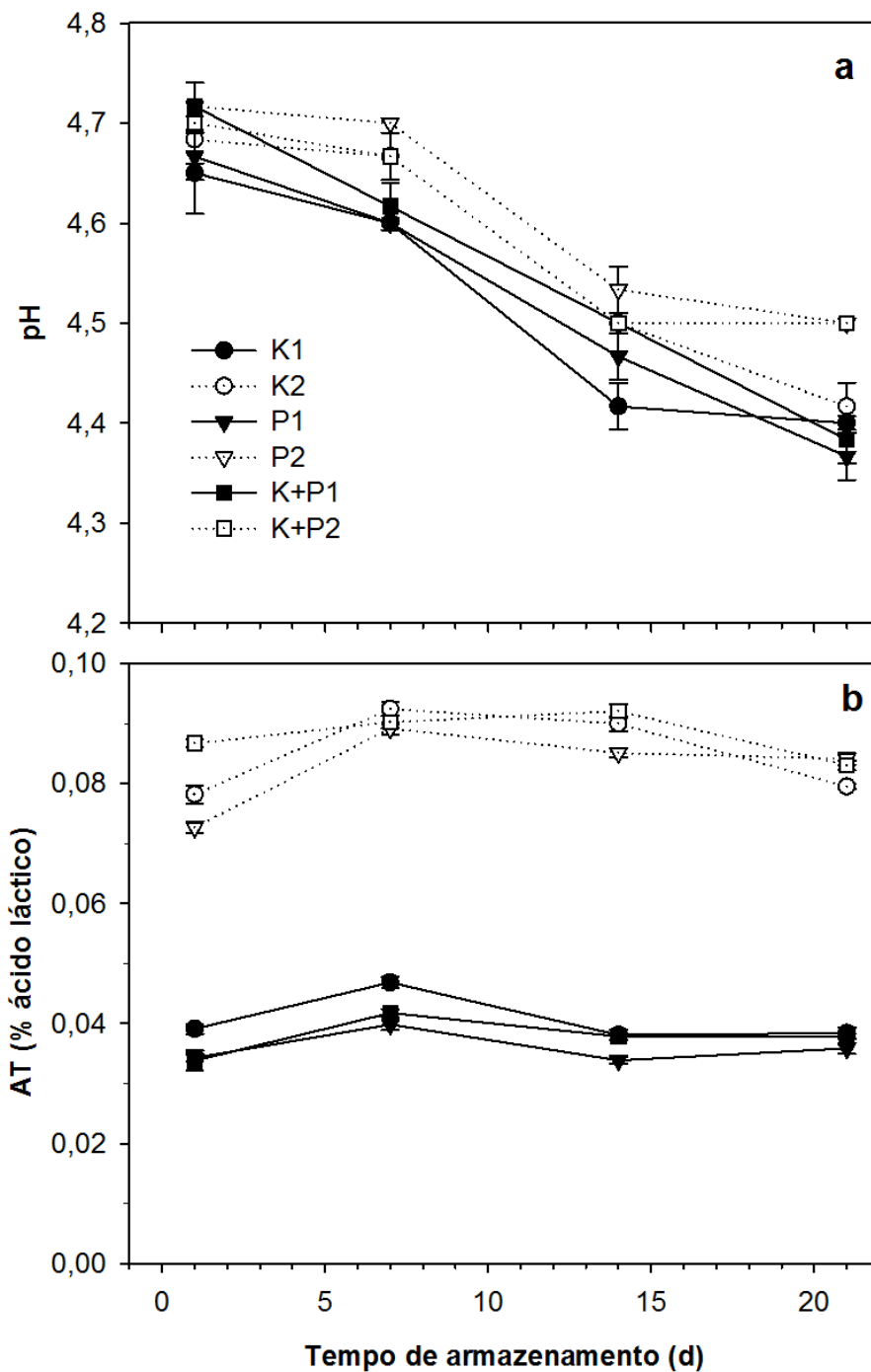
No entanto, a acidez pode ser difícil de controlar no soro de leite a partir do fabrico de queijo de leite cru. Durante o período de armazenamento, uma diminuição gradual do pH pode ser observado (com valores finais no intervalo dos 4.4-4.6), enquanto a acidez titulável manteve-se praticamente constante entre o 1º e o 21º dia de armazenamento. Os produtos do tipo gel mostraram novamente valores significativamente mais elevados de acidez. A concentração de ácido láctico nos produtos do tipo líquido é similar ao relatado por (Magalhães, 2011), após 24 h de incubação a 25 °C os grãos de kefir em soro de leite desproteínizado.

De acordo com estes autores, existem níveis significativos de consumo de lactose (> 50%) e etanol (isto é, 0,8%) e produção de ácido acético (ou seja, 0,06%) que foram observados somente 48 h após a fermentação.

Ao fim de 24h de fermentação, cerca de 20% da lactose foi consumida, enquanto o etanol e a produção de ácido láctico manteve-se em 0,025 e 0,03%, respetivamente. Quase nenhum ácido acético foi produzido. Estes aspetos devem merecer a nossa atenção em trabalhos futuros, ao fazer a análise sensorial do produto.



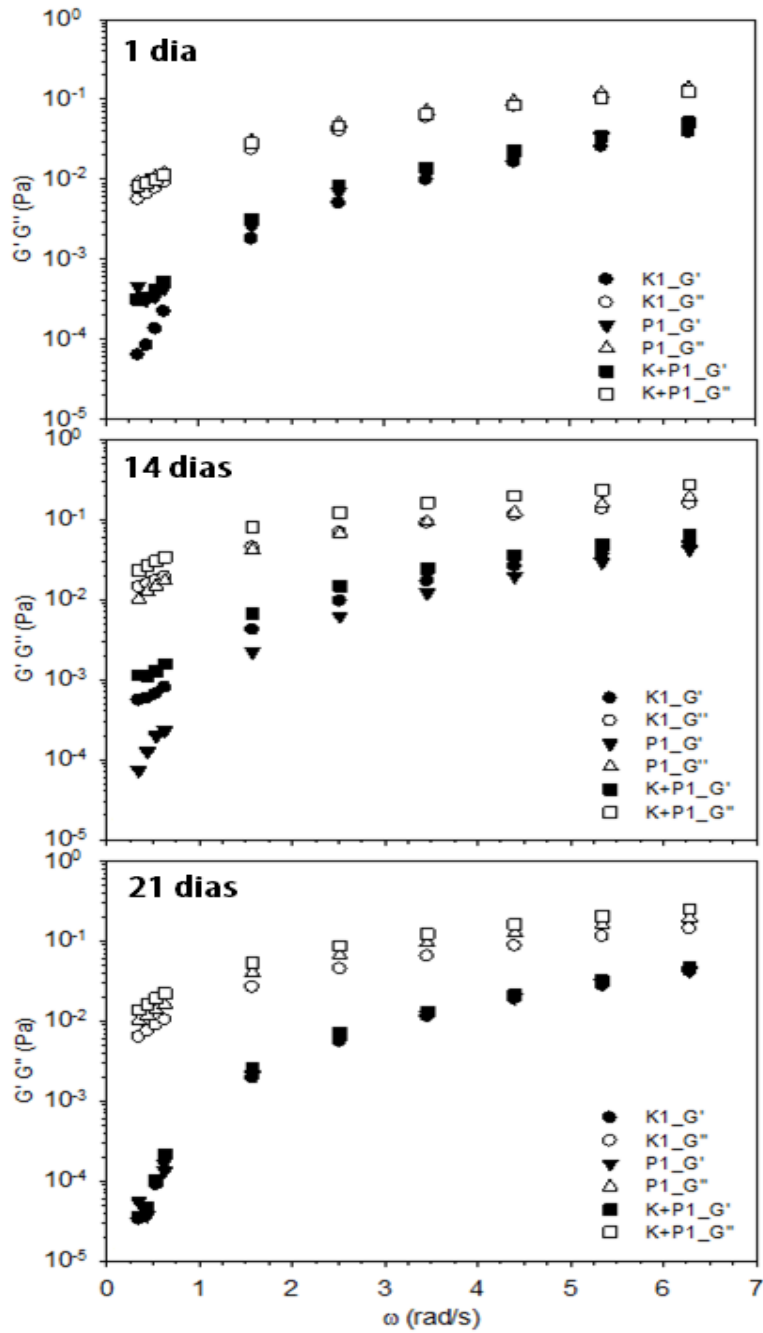
**Figura 3** – pH e acidez titulável (AT) durante a fermentação do produto do tipo líquido, fermentado à base de grãos de kefir (K1), mistura comercial de probiótico (P1) e grãos de kefir + mistura comercial dos probióticos (K + P1), e produtos do tipo gel fermentados à base de grãos de kefir (K2), mistura comercial de probiótico (P2) e grãos de kefir + mistura comercial de probiótico (K + P2).



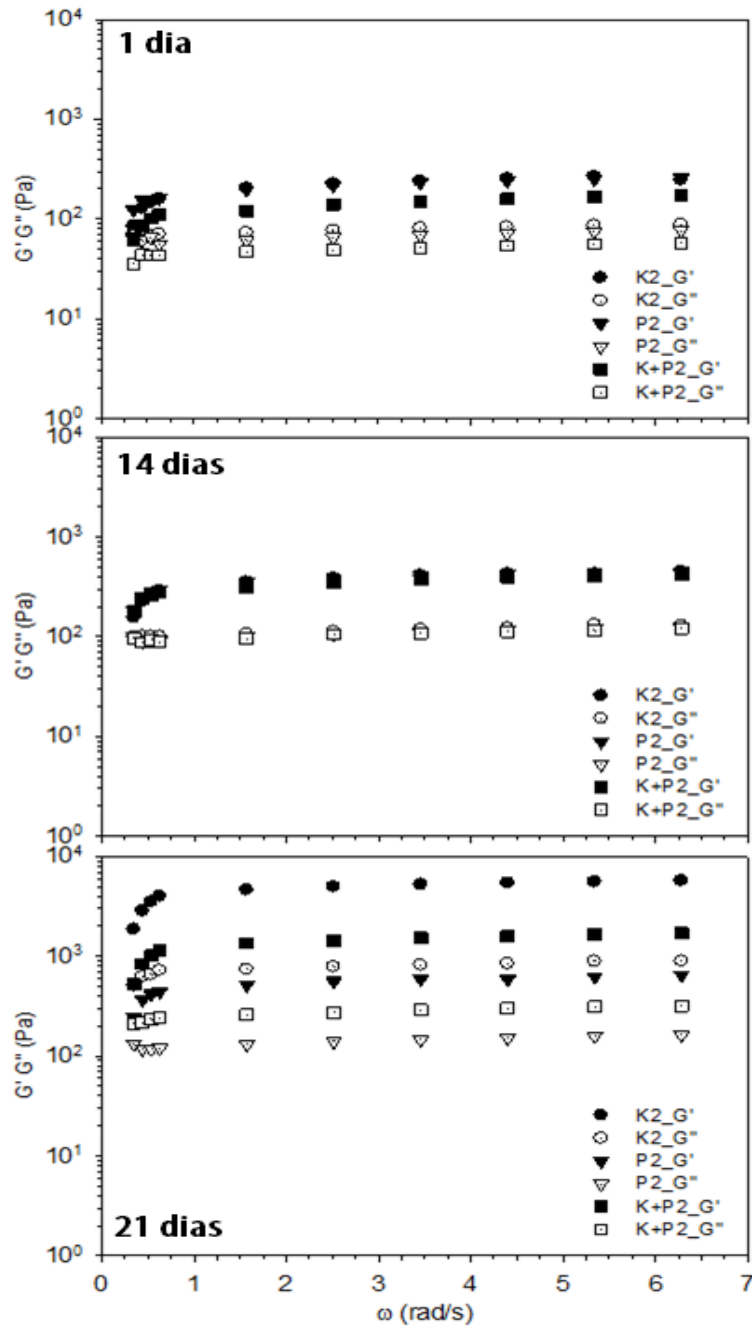
**Figura 4** – pH e acidez titulável (AT) durante o tempo de armazenamento dos produtos do tipo líquido, fermentados à base grãos de kefir (K1), mistura comercial de probiótico (P1) e grãos de kefir + mistura comercial de probiótico (K + P1); e produtos do tipo gel, fermentados à base de grãos de kefir (K2), mistura comercial de probióticos (P2) e grãos de kefir + mistura comercial de probióticos (K + P2).

As figuras 5 e 6 mostram a evolução das propriedades reológicas ( $G'$  e  $G''$ ) dos produtos fermentados e armazenados nas câmaras de refrigeração. O produto líquido com teor médio de sólidos totais (Fig. 5), onde o módulo viscoso ( $G''$ ) foi mais elevado do que o módulo elástico ( $G'$ ), refletindo assim, uma natureza mais líquida. As propriedades reológicas de produtos do tipo líquido não se alteraram significativamente durante o período de armazenamento.

Os produtos com alto teor de sólidos totais (Fig. 6) mostraram características do tipo gel ( $G' > G''$ ). Os valores para o módulo elástico de produtos de alto teor de sólidos totais são semelhantes aos relatados por (Dissanayake, Kelly, & Vasiljevic, 2010) para géis obtidos a partir de micropartículas de proteínas do soro desnaturadas pelo calor. Em produtos com elevado teor de sólidos totais e que contêm grãos de kefir (K2 e K+P2), elástico ( $G'$ ) e módulo viscoso ( $G''$ ) aumentou significativamente entre 14º e 21º dia de armazenamento.



**Figura 5** –  $G'$  e  $G''$  Produtos do tipo líquido fermentados à base de grãos de kefir (K1); mistura comercial de bactérias probióticas (P1); grãos de kefir + mistura comercial de bactérias probióticas (K + P1), armazenado em câmara de refrigeração.



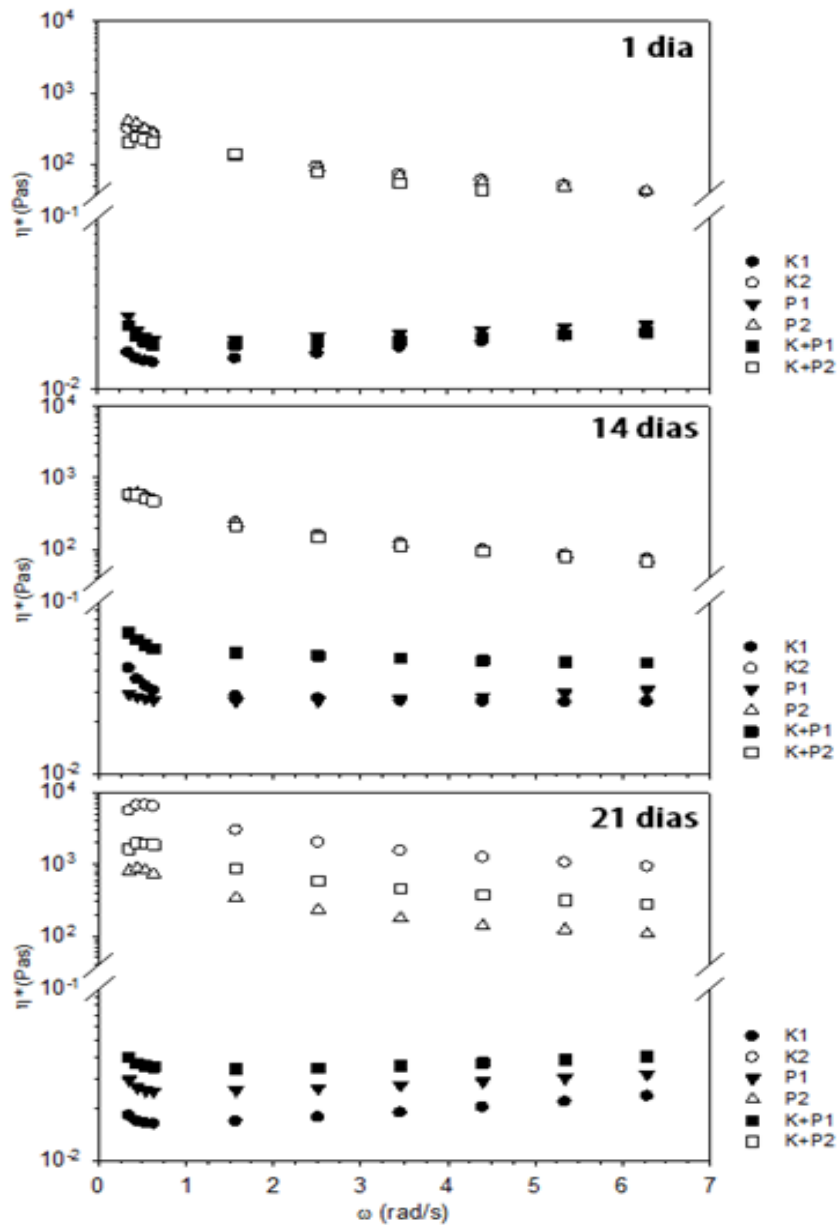
**Figura 6** –  $G'$  e  $G''$  produtos de tipo gel fermentados à base de grãos de kefir (K2); mistura comercial de bactérias probióticas (P2); grãos de kefir + mistura comercial de bactérias probióticas (K + P2), armazenado em câmara de refrigeração.

A viscosidade dinâmica dos produtos com elevado teor de sólidos totais, mostrou um aumento significativo a partir do 14º dia de armazenamento (Fig. 7). Após o 14º dia, os produtos com elevado teor de sólidos totais, apresentaram uma estrutura esponjiforme devido ao aprisionamento de gás na matriz de gel, resultando numa separação do soro. Como tal, levou a um aumento significativo da viscosidade, com efeitos marcantes na baixa

aceitabilidade sensorial do produto. Os valores do fator amortecimento ( $\tan \delta$ ) diretamente obtidos a partir de relação dos  $G''/G'$  podem ser usados para clarificar o comportamento viscoelástico do alimento semi-sólido. Se os valores  $\tan \delta$  são mais baixos do que um, o comportamento elástico predomina, ao passo que, se os valores de  $\tan \delta$  forem superiores a um o comportamento viscoso prevalece.

No presente estudo, os valores  $\tan \delta$ , com uma frequência  $6,28 \text{ rads}^{-1}$  (dados não mostrados) eram mais elevadas do que 1, para produtos com um teor médio de sólidos totais de (2,41-5,39) e menor que 1, para os que continham um elevado teor de sólidos totais (0,16-0,37).

Estes resultados indicam que a natureza elástica nos produtos com um elevado teor de sólidos totais (tipo-gel) é superior, aos que continham uma natureza viscosa (estado líquido), que são encontrados nos produtos com teor médio de sólidos totais. Com o armazenamento,  $\tan \delta$  mostrou um aumento nos produtos líquidos fermentados e uma diminuição nos produtos tipo gel fermentados.



**Figura 7** – Viscosidade dinâmica, armazenado em câmaras de refrigeração de produtos do tipo líquido fermentados à base de grãos de kefir (K1), mistura comercial de probiótico (P1) e grãos de kefir + mistura comercial de probiótico (K + P1), e produtos do tipo gel fermentados à base de grãos de kefir (K2), mistura comercial de probiótico (P2) e grãos de kefir + mistura comercial de probiótico (K + P2).

### 3.2 Análises microbiológicas

Geralmente, são as bactérias de ácido láctico que predominam nos grãos de kefir ( $> 8 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$ ) e são mais abundantes do que as leveduras e bactérias produtoras de ácido acético. No entanto, as condições de fermentação podem afetar esse padrão (Farnworth, 2005).

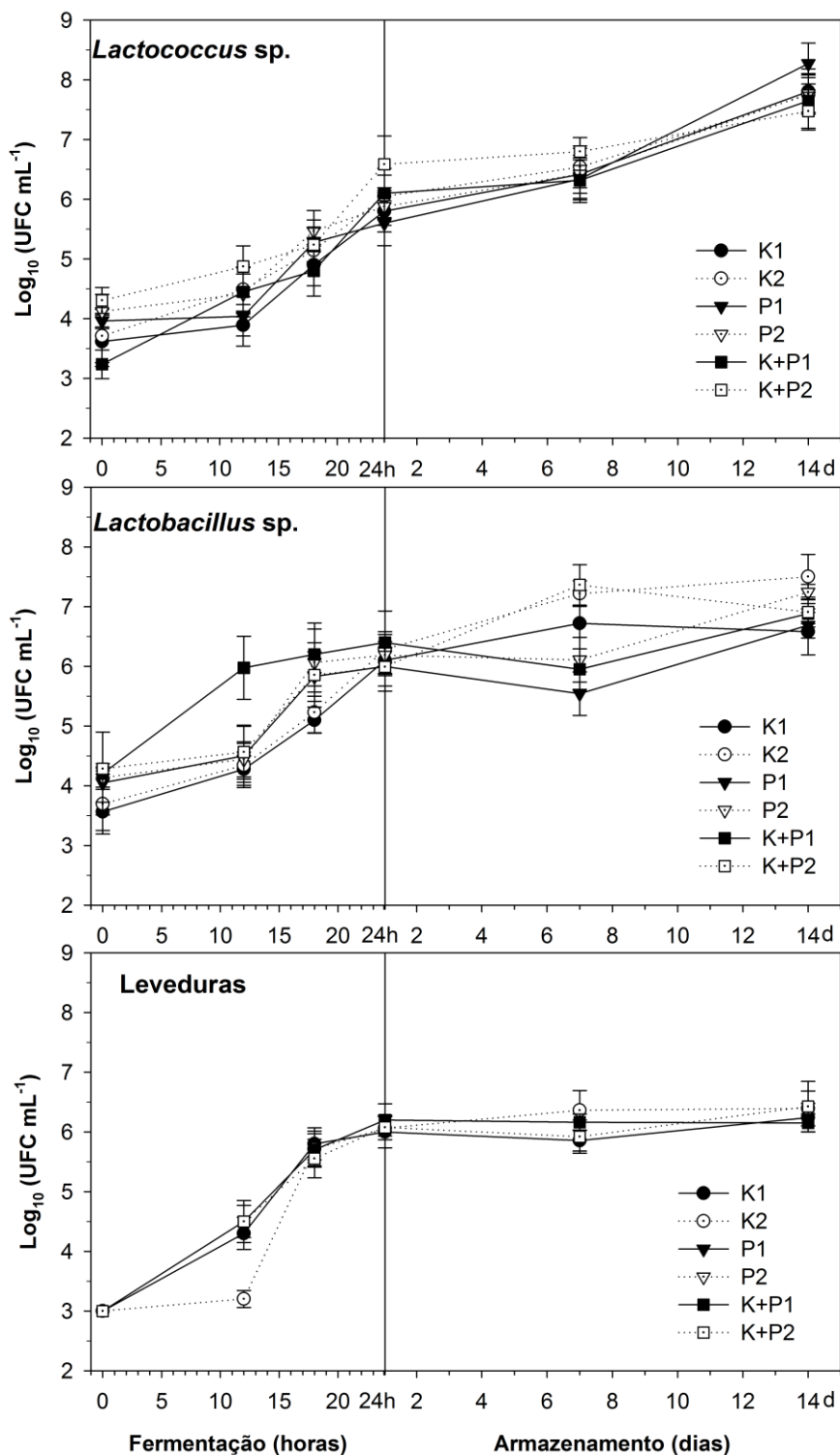
As características organolépticas do kefir resultam da atividade metabólica dos microrganismos, sendo o ácido láctico, o acetaldeído, etanol, acetona, diacetil e o dióxido de carbono, os principais produtos da fermentação. O etanol e CO<sub>2</sub> fornecem o típico sabor refrescante, (Beshkova, Blekas, & Kiosseoglou, 2003); (Lopitz- Otsoa, Rementería, A, Elguezabal, & J, 2006), enquanto o ácido láctico fornece o sabor ácido e amargo. Acetaldeído contém o sabor característico do leite fermentado (Ertekin & Guzel- Seydim, 2009).

As propriedades probióticas dos microrganismos nos grãos de kefir utilizados no presente trabalho foram referidas em outros lugares (Golowczyc, Mobili, Garrote, Abraham, & De Antoni, 2007); (Franco, Golowczyc, De Antoni, Pérez, & Humen, 2013); (Londero, Hamet, De Antoni, Garrote, & Abraham, 2012) Os benefícios mais falados são, principalmente, relacionados com a inibição dos microrganismos patogênicos e parasitas.

Os níveis adequados e presumíveis de *Lactococcus*, *Lactobacillus* e leveduras (Fig. 8) foram atingidos após os períodos de fermentação (isto é, 6-7 Log<sub>10</sub> CFU mL<sup>-1</sup>) e mantiveram-se constantes ou apresentaram um aumento de *Lactococcus*, até ser efetuada a análise sensorial (ao fim de 14 dias). Isto demonstra a resistência destas estirpes em condições de armazenamento.

Como esperado, os produtos que continham só a mistura de bactérias probióticas não continham contagens de leveduras. Tem sido amplamente referido que, pelo menos, 6-7 log<sub>10</sub> CFU g<sup>-1</sup> dos microrganismos probióticos viáveis são necessários num produto alimentar, reivindicando assim as suas propriedades probióticas (Tripathi & Giri, 2014).

Tendo em conta as altas contagens microbianas nos produtos, bem como a sua resistência ao longo do armazenamento, pode-se concluir que a utilização dos grãos de kefir e /ou probióticos comerciais como um inóculo nos CLPS parecem ser uma excelente opção para a produção de novos produtos fermentados.



**Figura 8** – Contagens microbianas ( $\text{Log}_{10} \text{CFU mL}^{-1}$ ) após a fermentação e armazenamento em câmara de refrigeração dos produtos do tipo líquido fermentado à base de grãos de kefir (K1), mistura comercial de probióticos (P1) e grãos de kefir + mistura comercial de probióticos (K + P1), e de produtos fermentados do tipo gel à base de grãos de kefir (K2), mistura comercial de probióticos (P2) e grãos de kefir + mistura comercial de probióticos (K + P2).

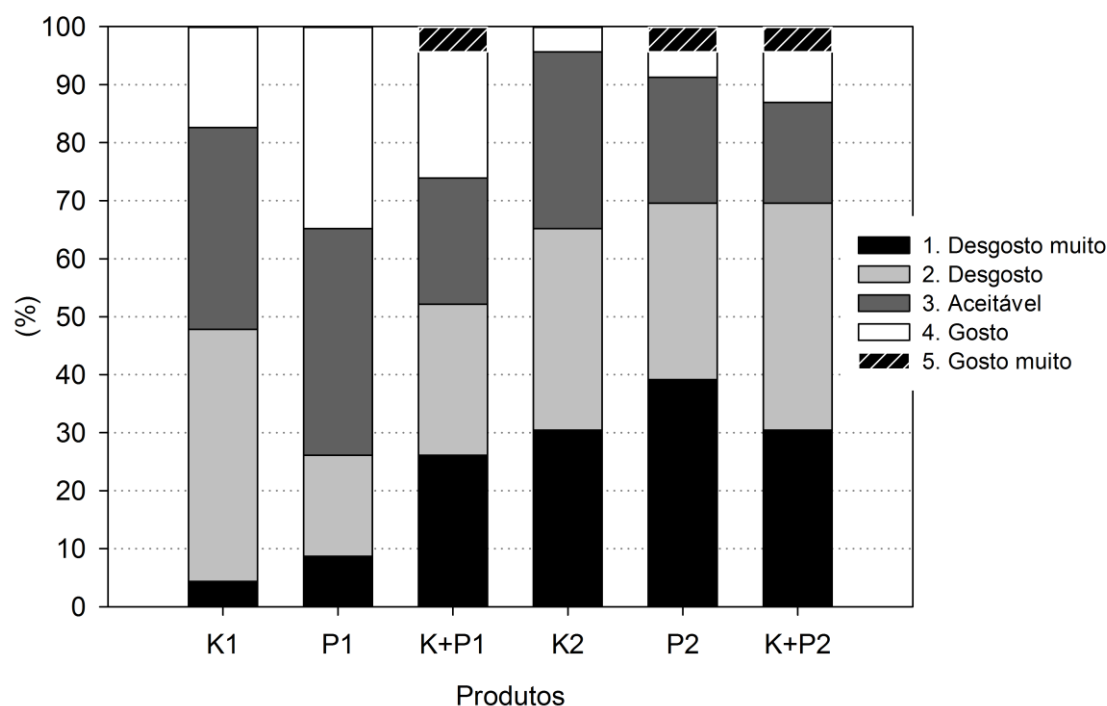
### 3.3 Análise Sensorial

Os produtos fermentados do tipo líquido foram melhor aceites do que produtos fermentados do tipo gel (Fig. 9). O produto mais aceitável era P1, mas quase 30% dos consumidores ainda considerou inaceitável.

Relativamente aos produtos sólidos, estes foram mal classificados, com mais do que 60% dos consumidores a considerar inaceitáveis. As principais falhas atribuídas aos produtos sólidos foram um sabor ácido intenso, textura fraca associada à separação de fases, e aroma a queijo de ovelha, ao qual não coincide com o sabor proveniente da polpa de fruta.

As falhas relativamente à textura podem ser eliminadas, se os níveis sólidos totais forem reduzidos para 20-25% no sentido de manter os produtos líquidos. No que diz respeito a problemas de sabor, vários consumidores preferem o produto sem a adição de polpa de frutas.

Estes aspetos devem ser tomados em consideração no desenvolvimento de novas formulações.



**Figura 9** – Análise sensorial de produtos fermentados do tipo líquido (K1, K + P1 e P1) e produtos fermentados do tipo gel (K2, P2 e K + P2).

#### **4. CONCLUSÃO**

Embora sejam necessários mais estudos para melhorar as propriedades das formulações organolépticas, a concentração do soro de leite de queijo de ovelha através da UF e desnaturação térmica concentrada fornece uma boa base para a produção de produtos lácteos fermentados inovadores. Esta tecnologia permite uma valorização direta do soro de leite de ovelha em fábricas de pequena e média escala. As principais vantagens são no maior potencial de rendimento e um produto com tempo de vida útil de prateleira superior. Além disso, a solução proposta pode também ser atrativa para os produtores, como uma maneira de atingir o nicho de mercado dos produtos lácteos saudáveis.

## 5. BIBLIOGRAFIA

- AOAC, A. o. (1997). *Dairy Products in: Official methods of analysis* (Vol. volume II). Arlington: 16th.
- Beshkova, D. P., Blekas, G., & Kiosseoglou, V. (2003). Development of a novel Whey beverage by Fermentation With Kefir granules. Effect of various treatments. *Biotechnol Prog* 20: 1091.
- Carla Jorge, N. A. (Março de 2006). Adição de proteínas de soro desnatadas no fabrico de queijo.
- Chiaradia, A. C. (1999). Redução do impacto ambiental causado pelo soro de queijo. *20 Congresso Brasileiro de engenharia sanitária e ambiental.*, 3929.
- Dissanayake, M., Kelly, A., & Vasiljevic, T. (2010). Gelling properties of microparticulated Whey proteins. *J Agric Food Chem* 58: 6825-6832.
- Ertekin, B., & Guzel- Seydim, Z. (2009). Effet of fat replacer on Kefir quality. *Journal Sci Food Agric*, 543-548.
- Farnworth. (2005). Kefir a complex Probiotic. *Food Sci Technol Bull Funct Foods*, 17.
- Franco, M., Golowczyc, M., De Antoni, G., Pérez, P., & Humen, M. (2013). Administration of kefir - Fermented milk protects mice against giardia intestinalis infection. *Journal Med Microbiol* , 62: 1815-1822.
- Golowczyc, M., Mobili, P., Garrote, G., Abraham, A., & De Amtoni, G. (2007). Protective action of Lactobacillus Kefir carrying S- layer protein against salmonella enterica serovar enteritidis. *Journal Food Microbiol*, 118: 264-273.
- Gomes-Zavaglia, A., Garrote, G., Brandi, L., Antoni de, G., Fausto, R., Abraham, A., et al. (2011). Fermented products based on Milk whey permeate: Production process and uses.
- IPQ, I. P. (1990). *Leite e produtos Lacteos*. Lisboa, Portugal.
- Kruger, R., Kempka, A., Valduga, E., Cansian, R., Ttreichel, H., & Oliveira, D. (janeiro/Março de 2008). Desenvolvimento de uma bebida láctea probiótica utilizando como subtratos soro de leite e extrato hidrossolúvel de soja. pp. 43-45.

- Londero, A., Hamet, M., De Antoni, G., Garrote, G., & Abraham, A. (2012). kefir grains as a starter for Whey fermentation at different temperatures: chemical and microbiological characterization. *Journal Dairy Res*, 79:262-271.
- Lopitz- Otsoa, F., Rementeria, A, Elguezabal, N., & J, G. (2006). Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community With alleged healthy capabilities. *Rev Iberoam Micol* . pp. 67-74.
- Magalhães, K. (2011). *Produção de bebidas fermentadas, Kefir de soro de queijo*. Lavras- Minas Gerais.
- Mizubuti, I. y. (Março de 1994). Soro de leite: composição, processamento e utilização na alimentação. pp. 80-84.
- Nataly Leidens. (2013). *Concentração das proteínas do soro de leite de ovelha por ultrafiltração e determinação das propriedades funcionais dos concentrados proteicos*. Departamento de Engenharia Química. Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- NP4146. (1991). Leite e produtos lácteos. Métodos de Colheita de amostras. Edição Portugal.
- Rocha, C., Teixeira, J. A., & Gonçalves, M. P. (Abril de 2008). Hidrolisados proteicos de soro de queijo como ingredientes funcionais.
- Santos, F., Silva, E., Barbosa, A., & Silva, J. (Março de 2012). Kefir: Uma fonte Alimentar Funcional. pp. 3-6.
- Silva, M., Ramos, A., Stamford, T., Machado, E., Lima, F., Garcia, E., et al. (Novembro/Dezembro de 2013). Elaboração de bebidas lácteas fermentadas: aceitabilidade e viabilidade de culturas probióticas. pp. 2817-2828.
- Thmer, K., & Penna, A. (Julho/ Setembro de 2006). Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidos de prebiótico. pp. 588-593.
- Trindade, & C., M. (2002). *Estudo da recuperação de ácido láctico proveniente do soro de queijo pela técnica de Membranas líquidas surfatantes*. Minas Gerais .

