

KARLA CURTARELLO PICCOLO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ENZIMA TRANSGLUTAMINASE NO
PROCESSO DE PRODUÇÃO DE REQUEIJÃO CREMOSO**

SÃO CAETANO DO SUL

2006

KARLA CURTARELLO PICCOLO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ENZIMA TRANSGLUTAMINASE NO
PROCESSO DE PRODUÇÃO DE REQUEIJÃO CREMOSO**

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia Mauá do Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Linha de Pesquisa: Análise e Otimização de Processos Industriais

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Paula Ribeiro

SÃO CAETANO DO SUL

2006

Piccolo, Karla Curtarello

Avaliação do efeito da enzima transglutaminase no processo de produção do requeijão cremoso - Karla Curtarello Piccolo – São Caetano do Sul, SP: CEUN-EEM, 2006. 116 p.

Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia Mauá do Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, SP, 2006.

Orientadora: Eliana Paula Ribeiro

1. Requeijão Cremoso. 2. Enzima Transglutaminase. I. Piccolo, Karla Curtarello. II. Instituto Mauá de Tecnologia. Centro Universitário. Escola de Engenharia Mauá. III. Título.

DEDICO

Aos meus pais Sergio e Nadya,
Às minhas irmãs Alessandra e Vanessa,
Aos meus cunhados Francisco e André,
Aos meus sobrinhos Giulia, Diego e Raí e
Ao meu marido Artur,
com amor e carinho por esta grande conquista.

OFEREÇO

À Profa. Dra. Eliana Paula Ribeiro, pela orientação prestada,
apoio, ensinamentos, compreensão, por estar sempre torcendo
por minhas conquistas e pela grande amizade.

AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais Sergio Eduardo Piccolo e Nadya Curtarello Piccolo pelo total apoio e incentivo, às minhas irmãs Alessandra Curtarello Piccolo e Vanessa Curtarello Piccolo Martins e aos meus cunhados André Martins e Francisco Abrahão pela enorme compreensão e paciência e aos meus sobrinhos Giulia, Diego e Rai por alegrarem meus dias com gestos de carinho;
- Ao meu marido Artur Jorge Faiad Farnella pelo amor, paciência, carinho, apoio e motivação;
- À Profa. Dra. Eliana Paula Ribeiro, pela idéia deste trabalho, orientação e grande apoio demonstrado durante o desenvolvimento deste trabalho;
- Ao Instituto Mauá de Tecnologia pelo fornecimento de todo material utilizado, equipamentos e espaço que viabilizou a execução deste trabalho;
- Aos Professores, Dra. Mirna Lúcia Gigante e Dra. Cyntia pelo exame prévio do trabalho e valiosas sugestões sobre a dissertação;
- À Profa. Dra. Alessandra Baroni, por todo o ensinamento transmitido e tempo dispensado para melhor execução do trabalho;
- À Ajinomoto pelo fornecimento da enzima transglutaminase e de material bibliográfico utilizados para a elaboração deste estudo;
- À BKG Rotem Química do Brasil pelo fornecimento do sal fundente JOHA S9, utilizado para a elaboração do produto;
- Ao corpo técnico Débora, Adnéia, Rose, Inês, Everton, Eduardo e Sidney pela prontidão em ajudar, pela força, ensinamentos, dicas, paciência e carinho. Sem vocês não teria tido o mesmo resultado;
- Aos estagiários da Engenharia de Alimentos pela impagável ajuda nas análises laboratoriais;
- À funcionária Maria Inês por auxiliar na limpeza e higienização da Planta Piloto e dos equipamentos;
- À todos os meus verdadeiros amigos;
- À todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a conclusão deste trabalho;
- À Deus, por tudo.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

O objetivo deste trabalho constituiu em estudar os efeitos da enzima transglutaminase no rendimento da massa coagulada, através do processo de acidificação direta, para obtenção de requeijão cremoso em comparação com aqueles obtidos sem a utilização da enzima. Na 1ª etapa foram desenvolvidos experimentos preliminares visando melhor estabelecer os principais parâmetros do processo de fabricação do requeijão cremoso tais como: quantidade de aproximada de ácido láctico, padronização da dessora, quantidade de leite a ser adicionado na massa coagulada e, por último, tempo e temperatura de cozimento da massa. Na 2ª etapa foram realizados 11 ensaios com diferentes concentrações e tempo de maturação da enzima transglutaminase e através dos produtos obtidos foram realizadas análises físico-químicas e reológicas, sempre comparando os requeijões produzidos com a adição da enzima transglutaminase com o requeijão produzido pelo método tradicional, ou seja, sem a adição da enzima. Nesta etapa foi realizado, também, a otimização do processo para as análises de rendimento, ruptura e viscosidade (n) através do delineamento experimental, fatorial 2^2 , para verificar as melhores condições de concentração e tempo de atuação da enzima. Os resultados obtidos mostraram que com a adição da enzima transglutaminase, o produto final apresenta um maior teor de umidade comparando o requeijão produzido pelo método tradicional, mas não diferiram em relação ao pH. O requeijão produzido com a adição de 0,02% de enzima e 90 minutos de atuação foi o ensaio que obteve maior teor de umidade e, conseqüentemente, o rendimento aumentou em, aproximadamente, 13% com relação ao requeijão produzido pelo método tradicional. Referente à textura, o requeijão produzido pelo método tradicional obteve maior firmeza, adesividade, gomosidade e mastigabilidade diferindo estatisticamente ao nível de 5% de significância dos ensaios com a adição da enzima transglutaminase. Quanto à viscoelasticidade os ensaios que obtiveram maior viscoelasticidade estão na faixa de 0,023% a 0,034% de TG a um tempo de atuação de 50 a 60 minutos, porém o requeijão produzido pelo processo tradicional foi o que obteve maior viscoelasticidade diferindo estatisticamente dos demais ao nível de 5% de significância. Em relação à consistência dos produtos não existe diferença significativa ao nível de 5%, mas existe diferença entre o coeficiente que indica o comportamento do fluido. Pôde-se verificar que os requeijões com 0,02% de TG o fluido obtido é um fluido pseudoplástico assim como o requeijão produzido pelo processo tradicional.

Palavras-chave: Requeijão cremoso. Enzima transglutaminase. Rendimento.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effects of the transglutaminase enzyme in the yield of the curd obtained through a direct acidification process to produce a Brazilian processed cheese (*Requeijão cremoso*) comparing with the *requeijão* produced without a transglutaminase enzyme, the traditional method. The first phase was developed some preliminaries experiments to establish the main parameters of the manufacturing process of the *requeijão* such as: lactic acid amount, draining standardization, milk amount to add in the curd and melting time and temperature. The second phase was accomplished 11 experiments with different incubation times and levels of transglutaminase enzyme and was accomplished physical-chemical and rheological analyses of the final products, always comparing the *requeijões* with transglutaminase enzyme with the traditional *requeijão cremoso*. In this phase, the optimization process was also accomplished for yield, rupture and viscosity (η) analysis through experimental delineation, factorial 2^2 , to verify the best conditions of incubation time and temperature of the transglutaminase enzyme. The obtained results present that the final product with transglutaminase have higher moisture level comparing with the traditional *requeijão*, but had not differed in relation to pH. The *requeijão* produced with 0.02% with transglutaminase and 90 minutes of incubation time was the experiment that obtained the highest level of moisture and consequently, obtained the yield 13% higher than the traditional *requeijão*. Referring to the texture, the traditional *requeijão* obtained the highest firmness, adhesiveness, gumminess and chewiness differing statistically at the 5% significance level from the experiments with transglutaminase. In relation with viscoelasticity the experiments with transglutaminase that obtained the highest viscoelasticity was in the transglutaminase level in the range of 0.023% to 0.034% and an incubation time in the range of 50 to 60 minutes, however the traditional *requeijão* presented the highest viscoelasticity differing statistically at the 5% significance level from the experiments with transglutaminase. In relation to the *requeijões* viscosity, there is not statistically significant difference at the 5% significance level, but there are differences between the fluid behavior coefficient. It could be verified that the *requeijões* with 0.02% of transglutaminase enzyme obtained a pseudoplastic fluid as well as the traditional *requeijão*.

Key-words: *Requeijão cremoso* (Brazilian processed cheese). Transglutaminase enzyme. Yield.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 3.1- REAÇÕES CATALIZADAS PELA TG	28
FIGURA 3.2- ESTRUTURA PRIMÁRIA DA MTG	31
FIGURA 3.3- CENTRO ATIVO DA TG: CISTEÍNA	32
FIGURA 3.4- ATIVIDADE RELATIVA DA MTG EM RELAÇÃO AO pH	33
FIGURA 3.5- ATIVIDADE RELATIVA DA MTG EM RELAÇÃO À TEMPERATURA	34
FIGURA 3.6- RELAÇÃO ENTRE OS TEMPOS DE REAÇÃO DA MTG E AS TEMPERATURAS	34
FIGURA 3.7- MÉTODO DE MEDIÇÃO DA ATIVIDADE DA MTG (MÉTODO HIDROXAMATO)	35
FIGURA 3.8- EXEMPLO DA CURVA FORÇA-TEMPO GERADA PELO TEXTUTÔMETRO EM ANÁLISE DE DUPLA COMPRESSÃO (TPA)	42
FIGURA 4.1- BANHO-MARIA A 65 °C	47
FIGURA 4.2- MISTURADOR STEPHAN	47
FIGURA 4.3- TEXTURÔMETRO: <i>TAXT2i -TEXTURE ANALYSER</i>	49
FIGURA 4.4- REÔMETRO: <i>RHEOMETER- BROOKFIELD MOD. DV-III</i>	49
FIGURA 4.5- DIAGRAMA DE BLOCOS DO PROCESSO DE FABRICAÇÃO DO REQUEIJÃO CREMOSO	51
FIGURA 5.1- GRÁFICO COM OS PONTOS OBTIDOS ATRAVÉS DO MODELO EQUACIONAL CODIFICADO DO RENDIMENTO	58
FIGURA 5.2- GRÁFICO COM OS PONTOS OBTIDOS ATRAVÉS DO MODELO EQUACIONAL REAL DO RENDIMENTO	59
FIGURA 5.3- SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DO MODELO CODIFICADO DO RENDIMENTO	59

FIGURA 5.4- CURVAS DE CONTORNO DO MODELO CODIFICADO DO RENDIMENTO	60
FIGURA 5.5- GRÁFICO COMPARATIVO DO RENDIMENTO MÉDIO OBTIDO EXPERIMENTALMENTE COM AS DOS MODELOS CODIFICADO E REAL	61
FIGURA 5.6- GRÁFICO COMPARATIVO DOS DESVIOS DO RENDIMENTO MÉDIO OBTIDO EXPERIMENTALMENTE COM AS DOS MODELOS CODIFICADO E REAL	61
FIGURA 5.7- GRÁFICO COMPARATIVO DOS VALORES MÉDIOS DE UMIDADE	63
FIGURA 5.8- GRÁFICO COMPARATIVO DOS VALORES MÉDIOS DE FIRMEZA	65
FIGURA 5.9- GRÁFICO COMPARATIVO DOS VALORES MÉDIOS DE ADESIVIDADE	66
FIGURA 5.10- GRÁFICO COMPARATIVO DOS VALORES MÉDIOS DE COESIVIDADE	67
FIGURA 5.11- GRÁFICO COMPARATIVO DOS VALORES MÉDIOS DE ELASTICIDADE	67
FIGURA 5.12- GRÁFICO COMPARATIVO DOS VALORES MÉDIOS DE GOMOSIDADE	68
FIGURA 5.13- GRÁFICO COMPARATIVO DOS VALORES MÉDIOS DE MASTIGABILIDADE	68
FIGURA 5.14- GRÁFICO COM OS PONTOS OBTIDOS ATRAVÉS DO MODELO EQUACIONAL CODIFICADO DE F/D	72
FIGURA 5.15- GRÁFICO COM OS PONTOS OBTIDOS ATRAVÉS DO MODELO EQUACIONAL REAL DE F/D	73
FIGURA 5.16- SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DO MODELO CODIFICADO DE F/D	74

FIGURA 5.17- CURVAS DE CONTORNO DO MODELO CODIFICADO DE F/D	74
FIGURA 5.18- GRÁFICO COMPARATIVO DOS VALORES DE F/D OBTIDOS EXPERIMENTALMENTE COM AS DOS MODELOS CODIFICADO E REAL	75
FIGURA 5.19- GRÁFICO COMPARATIVO DOS DESVIOS DOS VALORES DE F/D OBTIDO EXPERIMENTALMENTE COM AS DOS MODELOS CODIFICADO E REAL	75
FIGURA 5.20- GRÁFICO COM OS PONTOS OBTIDOS ATRAVÉS DO MODELO EQUACIONAL CODIFICADO DE n	79
FIGURA 5.21- GRÁFICO COM OS PONTOS OBTIDOS ATRAVÉS DO MODELO EQUACIONAL REAL DE n	80
FIGURA 5.22- SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DO MODELO CODIFICADO DE n	80
FIGURA 5.23- CURVAS DE CONTORNO DO MODELO CODIFICADO DE n	81
FIGURA 5.24- GRÁFICO COMPARATIVO DOS VALORES DE n OBTIDOS EXPERIMENTALMENTE COM AS DOS MODELOS CODIFICADO E REAL	82
FIGURA 5.25- GRÁFICO COMPARATIVO DOS DESVIOS DOS VALORES DE n OBTIDO EXPERIMENTALMENTE COM AS DOS MODELOS CODIFICADO E REAL	82

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1- EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO DE REQUEIJÃO NO BRASIL ¹	21
TABELA 3.2- AVALIAÇÃO SENSORIAL DE REQUEIJÃO	22
TABELA 3.3- DEPENDÊNCIA DE Ca ⁺² DA TG DE MICROORGANISMO E DA TG DE FÍGADO DE PORQUINHO DA ÍNDIA	31
TABELA 3.4- ESPECIFICIDADE DA MTG PARA SUBSTRATOS SINTÉTICOS	32
TABELA 3.5- REATIVIDADE DA MTG PARA VÁRIAS PROTEÍNAS	33
TABELA 3.6- RESULTADOS DA APLICAÇÃO DA TG EM QUEIJO FRESCO	38
TABELA 3.7- RESULTADOS DA APLICAÇÃO DA TG EM REQUEIJÃO CREMOSO	39
TABELA 3.8- DEFINIÇÕES DE PARÂMETROS MECANICOS DE TEXTURA	42
TABELA 3.9- INTERPRETAÇÃO DA CURVA FORÇA-TEMPO (FIGURA 3.8) GERADA PELO TEXTURÔMETRO	43
TABELA 4.1- PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL – FATORIAL 2 ²	52
TABELA 5.1- PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL. VALORES REAIS E CODIFICADOS DE RENDIMENTO	55
TABELA 5.2- COEFICIENTES DE REGRESSÃO DO MODELO CODIFICADO DO RENDIMENTO	56
TABELA 5.3- COEFICIENTES DE REGRESSÃO DO MODELO CODIFICADO DO RENDIMENTO – SEM OS FATORES ELIMINADOS (p>0,05)	56
TABELA 5.4- ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO MODELO CODIFICADO DO RENDIMENTO	57
TABELA 5.5- COEFICIENTES DE REGRESSÃO DO MODELO REAL DO RENDIMENTO – SEM OS FATORES ELIMINADOS (p>0,05) NO MODELO CODIFICADO	58

TABELA 5.6 – pH E UMIDADE DO REQUEIJÃO CREMOSO	62
TABELA 5.7- COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS ENSAIOS 7 E PADRÃO	64
TABELA 5.8- ANÁLISE DO PERFIL DE TEXTURA: TPA	65
TABELA 5.9- ANÁLISE DE TEXTURA: RUPTURA – F X D X F/D	69
TABELA 5.10- COEFICIENTES DE REGRESSÃO DO MODELO CODIFICADO DE F/D	70
TABELA 5.11- COEFICIENTES DE REGRESSÃO DO MODELO CODIFICADO DE F/D – SEM O FATOR ELIMINADO ($p>0,05$)	70
TABELA 5.12- ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO MODELO CODIFICADO DE F/D	71
TABELA 5.13- COEFICIENTES DE REGRESSÃO DO MODELO REAL DE F/D – SEM O FATOR ELIMINADO ($p>0,05$) NO MODELO CODIFICADO	72
TABELA 5.14- PARÂMETROS REOLÓGICOS DO REQUEIJÃO CREMOSO OBTIDO POR REOMETRIA ROTACIONAL CONVENCIONAL A 60 °C	76
TABELA 5.15- COEFICIENTES DE REGRESSÃO DO MODELO CODIFICADO DE n	77
TABELA 5.16- ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA)	78
TABELA 5.17- COEFICIENTES DE REGRESSÃO DO MODELO REAL DE n - SEM O FATOR ELIMINADO ($p>0,05$) NO MODELO CODIFICADO DE n	79

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1. QUEIJOS	18
3.1.1. Histórico	18
3.1.2. Composição e Classificação	19
3.2. QUEIJOS FUNDIDOS	19
3.3. REQUEIJÃO	20
3.3.1. Histórico	20
3.3.2. Classificação	20
3.3.3. Produção no Brasil	21
3.3.4. Requeijão Cremoso	22
3.3.4.1. Processos de Fabricação	23
3.3.4.2. Matérias-primas e Ingredientes básicos	24
3.3.4.2.1. Leite	24
3.3.4.2.2. Sal	25
3.3.4.2.3. Creme de leite	25
3.3.4.2.4. Sais emulsificantes	26
3.3.4.2.5. Ácido láctico	26
3.3.4.2.6. Formas de comercialização/ conservação	27
3.4. ENZIMA TRANSGLUTAMINASE (TG)	28
3.4.1. Características Gerais da TG	28
3.4.2. Transglutaminase Derivada de Microorganismo (MTG)	29
3.4.2.1. Processo de Fabricação da MTG	29
3.4.2.2. Propriedades Básicas da MTG	31

3.4.2.3. Valor Nutricional	35
3.4.2.4. Propriedades Funcionais	36
3.4.2.5. Aplicação da Transglutaminase em Produtos Lácteos	37
3.4.2.5.1 Aplicação da ACTIVA® TG-MP em Requeijão Cremoso	39
3.5. PROPRIEDADES REOLÓGICAS	40
4. MATERIAS E MÉTODOS	45
4.1. MATERIAIS	45
4.1.1. Materiais de Consumo	45
4.1.1.1. Leite	45
4.1.1.2. Creme de Leite	45
4.1.1.3. Cloreto de Sódio	45
4.1.1.4. Sal Emulsificante	45
4.1.1.5. Ácido Lático	46
4.1.1.6. Enzima Transglutaminase ACTIVA® TG-MP	46
4.1.1.7. Outros	46
4.1.2. Equipamentos	46
4.1.2.1. Tanque para Produção de Queijos	46
4.1.2.2. Misturador/ Stephan – <i>Geiger</i>	47
4.1.2.3. Estufas a 40 °C e a 105 °C	47
4.1.2.4. Mufla a 550 °C <i>Fanem</i>	48
4.1.2.5. Potenciômetro <i>Micronal mod. B-474</i>	48
4.1.2.6. Bloco Digestor	48
4.1.2.7. Destilador de Kjeldahl	48
4.1.2.8. Centrifugador <i>Fanem – Mod. 202</i>	48
4.1.2.9. Texturômetro: <i>TAXT2i – Texture Analyser</i>	48
4.1.2.10. Reômetro: <i>Rheometer – Bookfield Mod. DV-III</i>	49
4.1.2.11. Outros	49
4.2. MÉTODOS	50

4.2.1. Processo de fabricação	50
4.2.2. Desenvolvimento do Trabalho	51
4.2.2.1.Otimização das condições de atuação da enzima transglutaminase	52
4.2.2.2. Avaliação das Características do Produto Final	52
4.2.2.2.1. Análises Físico-Químicas	52
4.2.3. Análise dos Dados	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	55
5.1. OTIMIZAÇÃO DE PROCESSOS: ANÁLISE DO RENDIMENTO	55
5.2. COMPOSIÇÃO FÍSICO- QUÍMICA	62
5.2.1. Análise de Textura	64
5.2.1.1. TPA	64
5.2.1.2. Ruptura	69
5.2.2. Viscosidade	76
6. CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ANEXO I	94
ANEXO II	99
ANEXO III	101

1. INTRODUÇÃO

O queijo é um dos mais antigos alimentos preparados que a história da humanidade registra. O requeijão é um tipo de queijo fundido, tipicamente brasileiro, fabricado inicialmente de forma bastante artesanal, produzido a partir de leite desnatado, sendo considerado um subproduto do processo de fabricação de manteiga, que com o decorrer da evolução tecnológica foi obtendo uma maior difusão no mercado (CAMPOS & MUNCK, 1994).

Em 2002 foram comercializadas 49.247 toneladas de requeijão perfazendo 11,9% da produção total de queijos. Desses 11,9%, referem-se ao requeijão cremoso 7,1%. Nos últimos 12 anos, o crescimento do volume de produção do requeijão cremoso foi de 119,26% (BARROS et al, 2002).

De acordo com o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Requeijão ou Requesón (ANEXO I), existem, basicamente, quatro tipos de requeijão: comum, cremoso, cremoso UHT (UAT) e manteiga ou do norte. O requeijão cremoso é aquele obtido por fusão de uma massa coalhada e/ou fermentada, dessorada e/ou lavada, obtida por coagulação ácida e/ou enzimática do leite, com adição de creme de leite e/ou manteiga e/ou gordura anidra de leite e/ou *butter oil* (BRASIL, 1997). Possui consistência cremosa, coloração branca e paladar levemente salgado (CAMPOS & MUNCK, 1994).

No Brasil, para a produção da massa destinada à fabricação de requeijão cremoso, a indústria tem utilizado três processos: o tradicional, aonde a fermentação é feita por meio de fermentos lácticos; a acidificação direta do leite aquecido e a coagulação enzimática (GIGANTE, 1998).

Os processadores de alimentos têm buscado tecnologias inovadoras, tanto para produtos quanto para processos, que aumentem o lucro das empresas, mantendo a qualidade e a competitividade dos produtos elaborados. Por isso, a procura por ingredientes inovadores na indústria de alimentos tem crescido nos últimos anos e já é uma tendência mundial. Dentre estes ingredientes inovadores, têm-se a enzima transglutaminase, reconhecida internacionalmente (OLIVEIRA, 2003).

A enzima transglutaminase está largamente distribuída na natureza, podendo ser encontrada no sangue e fígado dos mamíferos, moela e sangue de aves, músculos e ovas de pescados e no tecidos de alguns vegetais como ervilhas. Em humanos, a transglutaminase é conhecida como Fator XIII, um dos fatores responsáveis pela coagulação sangüínea. Comercialmente, a transglutaminase é produzida por processo de fermentação microbiológica, separada e, posteriormente, purificada para utilização em alimentos (KURAISHI et al, 1996).

A transglutaminase é uma transferase que catalisa a reação de acil-transferência entre resíduos de proteína, ou seja, ao contrário da maioria das enzimas que hidrolisam o substrato em pequenos compostos, como amilases e proteases, a transglutaminase catalisa a polimerização de pequenos substratos protéicos em moléculas maiores. A transglutaminase forma ligações covalentes, *crosslinks*, entre resíduos dos aminoácidos Glutamina e Lisina (ligações G-L). A transglutaminase reage muito bem com a caseína do leite. Essas ligações melhoram a estabilidade da massa através do aumento da firmeza e da viscosidade, reduzindo, assim, a sinerese durante o armazenamento e conseqüente redução da necessidade da adição de sólidos, melhorando o rendimento do processo (KURAISHI et al,1996).

O presente trabalho tem a finalidade de estudar o efeito da adição da enzima transglutaminase, acima descrita, no processo de fabricação de requeijão cremoso, através da medida da influência da ação desta enzima no rendimento e nas características físico-químicas e reológicas do mesmo.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é avaliar os efeitos do uso da enzima transglutaminase no rendimento da massa coagulada para obtenção do requeijão cremoso, em comparação com aqueles obtidos sem a utilização deste coadjuvante de tecnologia.

Os objetivos específicos incluem a determinação das melhores condições de processo (variações de concentração e tempo de atuação da enzima); verificação do efeito da ação da enzima transglutaminase no produto final; caracterização físico-química e reológica do produto final.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. QUEIJOS

3.1.1. Histórico

Desde que o homem aprendeu a domesticar os animais, o leite passou a fazer parte de seus hábitos alimentares. Não demorou muito e logo se começou a descobrir os derivados do produto, dentre os quais o queijo, cuja verdadeira origem é recheada de lendas e mitos, podendo ter sido em diferentes épocas, nos diversos continentes e países. Existem vestígios pré-históricos de mais de 6.000 anos antes de Cristo, nas civilizações mediterrâneas, que indicam a existência de variedades de queijos nesta época (MARCHIORI, 2004).

O queijo é um dos mais antigos alimentos preparados que a história da humanidade registra. Foram encontradas imagens, nas paredes da tumba de Ramesid (100 AC), de cabras sendo conduzidas para pastar e, também, de bolsas, feitas com pele e estômago de animais, suspensas por varas. Estas bolsas, de pele ou de estômago seco de animais, eram um modo conveniente para as tribos nômades armazenarem os líquidos que transportavam. O leite que não era consumido de imediato era colocado nestas bolsas e com os resquícios de uma enzima digestiva chamada renina, encontrada nos estômagos secos, o calor e o movimento de bamboleo dos animais durante as viagens, ocorria a fermentação do leite resultando na formação de uma coalhada branca separada de um líquido fino, chamado atualmente de soro. Enquanto o soro provia uma bebida refrescante para as viagens quentes, os coalhos, preservados pelo ácido da fermentação e um “punhado” de sal, resultavam em um alimento rico em proteína que suplementava o suprimento escasso de carne (ROBINSON & WILBEY, 1998 e MARCHIORI, 2004).

Esse pode ter sido o momento do nascimento do queijo moderno, um desenvolvimento lógico e inevitável pelo qual os elementos nutritivos do leite podiam ser preservados. Depois com o correr dos séculos, até chegar ao momento atual, foram-se aperfeiçoando as técnicas de fabricação, embora o fundamento básico que ainda perdura é o descrito acima (MADRID et al, 1996).

Atualmente a definição admitida internacionalmente é a seguinte: “Queijo é o produto fresco ou maturado obtido por coagulação e separação do soro de qualquer dos seguintes

produtos: leite, nata, leite desnatado (total ou parcialmente), soro de manteiga ou uma mistura de qualquer um deles” (ROBINSON & WILBEY, 1998).

3.1.2. Composição e Classificação

O queijo é um alimento de alto valor nutritivo, rico em proteínas, gorduras, sais minerais, principalmente cálcio e fósforo. A composição do queijo varia de acordo com o tipo, tempo de maturação, composição do leite utilizado etc., apresentando diferentes sabores e textura. Atualmente, existem mais de quinhentos tipos de queijos em todo o mundo (MADRID et al, 1996).

Quanto à classificação, os queijos podem ser classificados conforme diversas circunstâncias tais como: país de origem, sistema de coagulação (acidificação e adição de coalho), tipo de leite empregado (vaca, ovelha, cabra, búfala...), textura final (compactos, com furos arredondados, granulares com furos de formas irregulares...), tipo de microorganismos utilizados na maturação, conteúdo de gordura (de duplamente gorduroso a magro), formatos, tamanhos e, por último, a mais conhecida das classificações que se faz, relativa ao conteúdo de água (queijos frescos, macios, semiduros e duros) (ROBINSON & WILBEY, 1998).

Devem ser mencionados nestas classificações os queijos fundidos que são o produto obtido por moagem, mistura, fusão e emulsão com tratamento térmico de uma ou mais variedades de queijo, com ou sem a adição de agentes emulsificantes, de leite e de produtos alimentícios de outro tipo (GIGANTE, 1998).

3.2. QUEIJOS FUNDIDOS

A fabricação de queijos fundidos é uma área relativamente nova na indústria de laticínios, já que os primeiros experimentos envolvendo fusão de queijos foram realizados na Suíça há apenas pouco mais de 80 anos. A produção em escala comercial de queijos fundidos à base de queijo Emmental foi iniciada naquele país por volta de 1911. Independentemente disto, a fusão de queijos começou a ser feita também nos Estados Unidos, utilizando outras variedades de queijos, além do Emmental, como matéria-prima para o processo. A França e a Alemanha iniciaram a produção de queijos fundidos em 1919 e em 1922, respectivamente. A partir daí, essa indústria se desenvolveu bastante, sendo hoje um setor importante no ramo de laticínios (VAN DENDER, 1997). De acordo com OLIVEIRA (1986), conforme o próprio nome indica, qualquer queijo cuja massa apresenta

características que evidenciam a destruição completa da estrutura original do coágulo, pode ser classificado como queijo de massa fundida. O princípio da fabricação destes tipos de queijos consiste em fundir os dois elementos principais do queijo, isto é, a gordura e a proteína. A fusão só ocorre de maneira adequada quando a matéria-prima é submetida ao calor e à agitação mecânica em tachos especiais. Além disso, há necessidade do emprego de produtos emulsificantes conhecidos como sais fundentes para evitar a separação de gordura e de água da mistura, o que iria ocorrer normalmente após o aquecimento, se estes aditivos não fossem acrescentados. O objetivo dos sais fundentes consiste, portanto, em promover a emulsificação da mistura (gordura, proteína e água), obtendo-se, deste modo, um produto final homogêneo e estável (VAN DENDER, 2000).

O requeijão é um tipo de queijo fundido, diferentemente elaborado a partir da massa fresca e não por mistura de queijos, e sua produção no Brasil, mais especificamente do requeijão cremoso, vem aumentando consideravelmente nos últimos anos (VAN DENDER, 2000).

3.3. REQUEIJÃO

3.3.1. Histórico

O requeijão é um queijo tipicamente brasileiro, fabricado em todo território nacional, com algumas variações de tecnologia e características de região para região.

Trata-se de um produto originário de antigas regiões produtoras de creme para a fabricação de manteiga, onde o leite desnatado, tido na época como subproduto, era utilizado para a fabricação de requeijão, então de forma bastante artesanal, com seu consumo restrito à própria unidade que o fabricava (CAMPOS & MUNCK, 1994).

Atualmente, com a melhoria das condições de transporte, a figura da fazenda produtora de creme desapareceu e, conseqüentemente, a produção de requeijão passou a integrar a linha dos produtos das indústrias de laticínios, o que implicou na evolução de sua tecnologia, padronização de composição e maior difusão de mercado (CAMPOS & MUNCK, 1994).

3.3.2. Classificação

Com o nome de requeijão, existem no mercado queijos com diferentes teores de umidade e, conseqüentemente, consistência específica, desde produtos bem cremosos, com propriedade de espalhabilidade como o requeijão cremoso, até produtos bastante firmes e até mesmo fatiáveis como o requeijão do norte. O mesmo acontece com relação ao teor de gordura, que pode variar desde bastante elevado, quase como um creme fermentado, até requeijões praticamente sem gordura. Não existe, portanto, um padrão típico para os produtos comercializados com a denominação de requeijão (OLIVEIRA, 1986; CAVALCANTE, 1991). A legislação estabelece as características do requeijão quanto ao formato, peso, crosta, consistência, textura e cor, mas não define sua composição (ANEXO I). Portanto, não há um padrão típico para o requeijão (OLIVEIRA, 1986).

De acordo com o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Requeijão ou Requesón (ANEXO I), existem, basicamente, quatro tipos de requeijão: comum, cremoso, cremoso UHT (UAT) e manteiga ou do norte (BRASIL, 1997).

3.3.3. Produção no Brasil

O produto vem ganhando mercado de forma bastante expressiva, de acordo com a TABELA 3.1, apresentada a seguir:

TABELA 3.1- EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO DE REQUEIJÃO NO BRASIL¹

ANO	PRODUÇÃO (ton)	CRESCIMENTO DO CONSUMO ANUAL (%)
1991	18.457	---
1992	18.005	-2,45
1993	22.704	26,10
1994	26.494	16,69
1995	29.774	12,38
1996	32.669	9,72
1997	36.505	11,74
1998	39.180	7,33
1999	42.980	9,70
2000	44.670	3,93
2001	46.903	5,00
2002	49.247	4,99

FONTE: SIPA/ABIQ/DESK RESEARCH (Requeijão Cr. - Nielsen 95);
Anuário Milkbuzz - 2001/2002

(1) Estabelecimento sob Inspeção Federal

Dentre estes volumes de produção total de requeijão, 60% é referente à produção de requeijão cremoso, sendo assim, o tipo de requeijão mais consumido no Brasil. Nos últimos

12 anos, o crescimento do volume de produção do requeijão cremoso foi de 119,26% (BARROS et al, 2002).

3.3.4. Requeijão Cremoso

Segundo a classificação genérica de queijos, o requeijão cremoso pertence ao grupo de queijos denominados fundidos, processados ou pasteurizados e é o produto que melhor representa essa classe no Brasil (OLIVEIRA, 1986).

O requeijão cremoso é consumido normalmente logo após a fabricação e deve apresentar sabor ligeiramente ácido e agradável ao paladar, aroma característico de produto fermentado por microorganismos lácticos e massa homogênea com uma cremosidade ou untuosidade típica (OLIVEIRA, 1986).

Sob o ponto de vista higiênico-sanitário, não há exigência quanto à pasteurização do leite, pois o produto sofre tratamento térmico durante o processo. Mas, sob o ponto de vista tecnológico, a pasteurização permite o controle do processo da coagulação e conseqüente obtenção de um produto de qualidade padronizada (OLIVEIRA, 1987).

O requeijão cremoso típico deverá apresentar ao final do processo a seguinte composição: cerca de 57-60% de umidade, 28-30% de gordura, 0,8-1,0% de sal, pH entre 5,7-5,9, e características sensoriais de acordo com a TABELA 3.2 (VAN DENDER, 2000; CAVALCANTE, 1971).

TABELA 3.2- AVALIAÇÃO SENSORIAL DE REQUEIJÃO

ATRIBUTO	DEFINIÇÃO
COR	Coloração característica do requeijão, variando do branco-creme homogêneo ao amarelo pálido. Uma atípica coloração é caracterizada pela presença de manchas e pela coloração amarela.
AROMA	Próprio, tendente ao ácido. Não picante.
TEXTURA	Cremosa, fina, lisa ou compacta.
CONSISTÊNCIA	Mole, homogênea. A consistência atípica é caracterizada pelo aspecto arenoso e pela presença de grumos.
GOSTO ÁCIDO	Acidez suave característica, produzida por seus componentes ácidos.
GOSTO SALGADO	Ligeiramente salgado. Típico do produto.
GOSTO AMARGO	Não é típico. O requeijão não apresenta gosto amargo.
SABOR	Deve ser bem suave e ligeiramente salgado. Tolerar-se o sabor ligeiramente adocicado, mas deve ser picante.

FONTE: Adaptada de CAVALCANTE, 1971.

3.3.4.1. Processos de Fabricação

Para o processo de fabricação do requeijão cremoso típico, normalmente utilizam-se misturadores a vácuo que permitam tanto o aquecimento direto quanto o indireto. Esse equipamento permite um controle mais eficiente da consistência e textura do produto final.

No Brasil, para a produção de massa destinada à fabricação de requeijão cremoso a indústria tem utilizado principalmente três processos: o tradicional, onde a fermentação é feita por meio de fermentos lácticos; a acidificação direta (com ácido láctico 85% ou ácido acético) do leite aquecido e a coagulação enzimática (ANON, 1999 e FERNANDES, 1981b).

A coagulação ácida é obtida através da redução do pH do leite até atingir o ponto isoelétrico da caseína em torno de 4,6 a 20 °C. Com essa acidificação as cargas elétricas das partículas coloidais da caseína se neutralizam e a força de repulsão, devido ao excesso de cargas negativas existentes na caseína a um pH próximo da neutralidade, deixa então de existir, permitindo assim, que as partículas coloidais se unam formando um coágulo ou gel (OLIVEIRA, 1987).

A acidificação ocorre por adição de ácido (direta), ou desenvolvimento de uma fermentação láctica (indireta) (GIGANTE, 1998). Na acidificação com fermentos ocorre o abaixamento do pH do leite de 6,6 para 4,6, onde se obtém a coagulação também pelo ponto isoelétrico da caseína. Isso ocorre, pois, a cultura existente neste fermento é produtora de ácido láctico. A cultura deve apresentar produção equilibrada de ácido láctico, sobretudo a baixas temperaturas e baixa atividade proteolítica (OLIVEIRA, 1987; NETO, 1999).

Na coagulação enzimática, uma enzima proteolítica qualquer (sendo a renina a mais importante, na prática), age sobre a fração “kappa” da micela de caseína, destruindo a sua capacidade protetora e as partículas coloidais se tornam instáveis na presença de íons de cálcio. Em consequência, o leite transforma-se num gel, ou seja, coagula. A principal diferença entre o emprego do coágulo ácido e o enzimático reside no sabor e aroma, uma vez que o coágulo enzimático não sofre processo fermentativo para produção de acidez e aroma característicos a não ser que seja adotado o sistema de acidificação da massa (OLIVEIRA, 1987).

Atualmente já existe no mercado nacional requeijão cremoso fabricado a partir de retentado obtido por ultrafiltração de leites nas modalidades tradicional, *light*, zero de gordura e com diversos sabores.

Uma alternativa tecnológica importante para o requeijão cremoso consiste na fabricação de produtos com teor de gordura reduzido (9 a 12%) e umidade em torno de 70%. O desenvolvimento de tais produtos tem sido um dos principais objetivos dos

profissionais da área, já que a demanda do mercado consumidor por este tipo de alimento tem aumentado de forma expressiva por estar fortemente associado à crescente preocupação com a saúde e com uma alimentação equilibrada (SAMPAIO & BRANDÃO, 1995).

Por esse motivo, o desenvolvimento de produtos que mantenham as características sensoriais originais e apresentem menor teor de gordura é imprescindível, tendo em vista principalmente a carência deste tipo de conhecimento técnico no Brasil e a necessidade cada vez maior de dominar as novas tecnologias para competir em um mercado globalizado (ANON, 1999).

Do ponto de vista econômico, a umidade do produto final é um fator importante, pois quanto maior é a sua porcentagem, maior é o rendimento. Além disso, a umidade influencia na consistência (VAN DENDER, 2000). Para auxiliar no aumento do rendimento e viabilizar economicamente o produto final, pode ser adicionado o coadjuvante de tecnologia; a enzima transglutaminase.

É importante salientar, mais uma vez, a importância de se utilizar leite de boa qualidade para a produção de requeijão cremoso. Caso contrário, toda a sequência de processamento fica comprometida. O leite é também o ponto de partida para a elaboração de outros produtos que são empregados na fusão tais como o creme de leite. Finalmente, deve-se ter o mesmo rigor com os outros ingredientes para que não ocorram problemas com contaminação microbiológica e / ou física do produto final (VAN DENDER, 2000).

3.3.4.2. Matérias-primas e ingredientes básicos

3.3.4.2.1. Leite

A principal matéria-prima utilizada para a fabricação de requeijão é o leite, sendo o de vaca o mais utilizado. O principal constituinte do leite é a água, dentre os sólidos do leite têm-se os compostos de gordura, proteínas, lactose e sais minerais. Os sais minerais e a lactose formam uma solução verdadeira com a água, a gordura forma uma emulsão e a proteína uma dispersão coloidal. A gordura exerce uma função muito importante na cor, na consistência e no sabor final do queijo (RIBEIRO, 2000).

As principais proteínas do leite são: α s1-caseína, α s2-caseína, β -caseína, κ -caseína, β -lactoglobulina (β -Lg), α -lactoalbumina (α -La). As caseínas (fosfoproteínas insolúveis a pH 4,6 a 20 °C) aproximadamente 80% do conteúdo total de proteínas e encontram-se no leite na forma de micelas constituídas das 4 frações protéicas principais (α s1, α s2, β e κ -

caseína), além de cálcio inorgânico, fosfato, citrato e pequenas quantidades de magnésio, sódio e potássio. A κ -caseína, única entre as caseínas que não precipita na presença de íon cálcio, encontra-se na superfície externa da micela e exerce um efeito protetor sob as demais caseínas. É a quebra desse efeito protetor, por ação enzimática ou ácida (queda do pH), que ocorre a quebra da dispersão coloidal da proteína, precipitando a caseína e formando a massa que será utilizada na fabricação de queijo (EIGEL et al, 1984; WONG et al, 1996).

A β -lactoglobulina (β -Lg), α -lactoalbumina (α -La), são solúveis na água, não coagulam por ação enzimática nem por ação ácida, pois possuem um ponto isoelétrico diferente das caseínas. Em função deste fato, estas são chamadas de proteínas do soro do leite (SGARBIERI, 1996).

O leite também é utilizado para realizar a lavagem da massa obtida após a coagulação, tendo como função a de neutralização da acidez elevando o pH da massa para cerca de 5,3-5,4, que é a faixa normalmente necessária para que ocorra a fusão da massa. Outro efeito é na produção de uma nova porção de coágulo que é incorporado à massa (OLIVEIRA, 1986).

O leite para fabricação do queijo deve apresentar cor, sabor e odor típicos, ser isento de antibióticos e possuir qualidade microbiológica adequada, ou seja, ser isento de microorganismos patogênicos e produtores de gás (SGARBIERI, 1996).

3.3.4.2.2. Sal

O sal é utilizado na fabricação de queijos com várias finalidades. Além de complementar e enriquecer-lhes o sabor, o sal melhora a textura e a aparência do queijo. Além disso, controla a fermentação láctica, determinando o nível ideal de acidez, inibe o desenvolvimento de microorganismos indesejáveis e auxilia na expulsão do soro (RIBEIRO, 2000).

3.3.4.2.3. Creme de leite

O creme de leite, manteiga ou outras fontes de gordura permitidas é adicionado quando a massa estiver fundindo-se (VALLE, 1981).

A quantidade de creme de leite a ser adicionado depende do teor de gordura que se deseja no extrato seco do produto final, bem como a porcentagem de gordura e extrato seco da massa inicial (MEYER, 1973; VALLE, 1981). A sua adição, além de realçar o sabor do

produto, exerce um papel importante na sua cremosidade, tornando-o mais atraente para o consumo e melhorando suas características organolépticas (VALLE, 1981). A adição de gordura, diminui consideravelmente a viscosidade e a consistência se torna macia e adquire aspecto amanteigado (FERNANDES, 1981b).

3.3.4.2.4. Sais emulsificantes

Os sais emulsificantes são indispensáveis para a fabricação de queijos fundidos, entretanto o tipo e a quantidade utilizados dependem de diversos fatores, tais como: tipo, pH, grau de maturação e estrutura do queijo utilizado como matéria-prima; uso de outros ingredientes permitidos pela legislação; equipamento utilizado para fusão e do produto final que deseja obter (MEYER, 1973; ZEHREN & NUSBAUM, 1992).

Quando um queijo é aquecido, observa-se que sob a ação do calor, ele se transforma em uma massa elástica, com separação de água e óleo. Entretanto, ao se adicionar 2-3% de sais emulsificantes, o queijo se transforma em uma pasta homogênea, processo este que pode ser acelerado pela agitação (MEYER, 1973).

Segundo MEYER (1973) a principal característica de um sal emulsificante é sua capacidade de solubilizar a caseína com formação de um “sol” homogêneo e essa capacidade aumenta paralelamente com seu poder de fixação ao cálcio.

Na fabricação dos queijos fundidos, os sais emulsificantes são usados com a finalidade de remover o cálcio do sistema protéico, peptizar, hidratar, solubilizar e dispersar a proteína; estabilizar a emulsão; controlar o pH e contribuir para a formação de uma estrutura apropriada no queijo fundido após o resfriamento. Além disso, é também desejável que o sal emulsificante não influa no paladar e aroma do produto, não recristalize durante o armazenamento e tenha ação bacteriostática (PALMER & SLY, 1994; HOLTORFF et al, 1951; MEYER, 1973; CARL'C et al, 1985; SHIMP, 1985).

3.3.4.2.5. Ácido láctico

O ácido láctico é utilizado na acidificação direta do leite, para a realização da coagulação ácida.

Com a adição do ácido láctico ocorre a quebra da estabilidade micelar decorrente da existência de cargas elétricas na superfície da micela e de sua afinidade pelo líquido dispersante. Os íons H^+ provenientes da dissociação do ácido neutralizam as cargas da micela. Por outro lado a afinidade do eletrólito pela água provoca uma certa desidratação da

micela. Estes dois fenômenos provocam a quebra da dispersão coloidal da proteína. Entretanto, não são as micelas de fosfocaseinato de cálcio que floculam e sim a caseína desmineralizada. Durante a acidificação, ocorre uma migração progressiva, para fora da micela, do cálcio ligado às caseínas e do fosfato de cálcio. No pH 4,6, ponto isoelétrico da caseína bruta a 20 °C, ocorre uma completa desmineralização e a caseína precipita sob a forma de caseína isoelétrica (VEISSEYRE, 1980).

3.3.4.3. Formas de comercialização / conservação

Uma das principais formas de comercialização do requeijão cremoso é em copos de vidro, onde o mais comercializado possui capacidade para 250g de produto e fechamento com folha-de-flandres com sistema de abertura fácil. O sistema de fixação e a hermeticidade, deste sistema de fechamento, são garantidos pelo vácuo interno formado na embalagem quando realiza-se o resfriamento do produto, sendo mantido praticamente o mesmo nível de vácuo durante toda a vida útil do produto. A vida-de-prateleira do requeijão neste tipo de embalagem pode variar de 45 a 60 dias ou 5 meses, dependendo do processo de fabricação do produto (VAN DENDER, 2000).

Outras empresas vêm apostando nas embalagens plásticas que podem ser encontradas na forma de copos, potes, bandejas ou baldes, fabricadas com polipropileno (PP) ou polietileno de alta densidade (PEAD). Estas embalagens são termosseladas com selo de estrutura alumínio/ verniz termosselante ou alumínio/ filme plástico, e fechadas posteriormente com uma sobre-tampa plástica. A vida-de-prateleira do requeijão neste tipo de embalagem é de 2 meses (VAN DENDER, 2000).

O mercado institucional utiliza baldes de PEAD fechados com tampa de pressão com lacre de segurança. Estas embalagens são normalmente comercializadas em capacidade de 3,6 kg e possuem prazo de validade variando de 45 a 75 dias (VAN DENDER, 2000).

Atendendo ao crescimento do mercado de embalagens porcionadas, o requeijão vem sendo comercializado em forma de *blister* (bandeja termoformada) de poliestireno (PS), contendo 20g do produto. O fechamento desse sistema é garantido por termossoldagem de um selo de alumínio/ material selante. O prazo de validade para este tipo de embalagem é de 60 dias (VAN DENDER, 2000).

Atualmente encontram-se, em fase final de desenvolvimento no Brasil, embalagens cartonadas assépticas para requeijão cremoso submetido a tratamento térmico UHT (VAN DENDER, 2000).

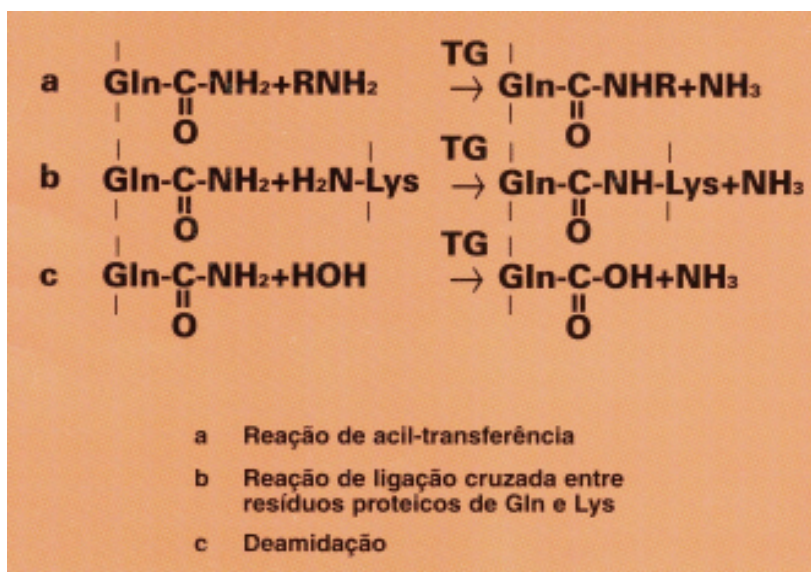
3.4. ENZIMA TRANSGLUTAMINASE (TG)

3.4.1. Características Gerais da TG

A enzima transglutaminase (EC 2.3.2.13) é um tipo de transferase que catalisa reações de acil-transferência entre os grupos γ -carboxiamida dos resíduos glutâmicos ligados em proteína ou peptídeos e aminas primárias (FIGURA 3.1a). Essa reação pode ser usada para introduzir lisina às proteínas, melhorando assim o desempenho das proteínas (melhoramento nutricional) (NOKATA et al, 1996).

Quando a transglutaminase usa grupos ϵ -amínicos dos resíduos de lisina ligados em proteínas como receptores de acil, formam-se ligações cruzadas ϵ -(γ -Glutamina) Lisina (ligação G-L) intermoleculares e intramoleculares (FIGURA 3.1b). Essa reação causa a ligação cruzada das moléculas de proteínas e resulta em mudanças físicas de alimentos e outros produtos, levando à ligação de pedaços dessas matérias. Até agora a maioria das enzimas industriais, como amilases e proteases, quebram o substrato em pequenos compostos. Entretanto, a transglutaminase é um tipo diferente de enzima que cria moléculas maiores a partir de pequenos substratos protéicos (KURAISHI et al, 1996).

A quantidade de ligações cruzadas depende da acessibilidade de resíduos de lisina e glutamina reativos no substrato protéico.



FONTE: KURAISHI et al, 1996

FIGURA 3.1- REAÇÕES CATALIZADAS PELA TG

Finalmente quando não há aminas primárias, a água age como o acil receptor e os resíduos de glutamina são deamidados (FIGURA 3.1c). Se os grupos amínicos dos substratos puderem ser bloqueados usando um método econômico e seguro, essa reação pode ser usada para mudar o ponto isoelétrico e a solubilidade. Todavia não há um reagente bloqueador apropriado que seja seguro e comestível, e essa reação de deamidação não é utilizada em indústrias de alimentos até o momento (NONAKA et al, 1996).

A transglutaminase (TG) está largamente distribuída na natureza podendo ser encontrada no sangue e fígado de mamíferos, moela e sangue de aves, músculos e ovas de pescados, nos tecidos de alguns vegetais e em microorganismos. A transglutaminase, no sangue de humanos, é conhecida como Fator XIII, um dos fatores responsáveis pela coagulação sanguínea (KURAISHI et al, 1996).

Os estudos das aplicações desta enzima em alimentos começaram com a transglutaminase extraída de mamíferos, o que era extremamente caro quando se transferia para escalas industriais. No entanto, recentemente foi desenvolvida a transglutaminase de origem microbiana (MTG), produzida em grande escala por fermentação. A transglutaminase derivada de microorganismos (MTG), é geralmente muito utilizada na indústria de alimentos (KURAISHI et al, 1996).

3.4.2. Transglutaminase Derivada de Microorganismo (MTG)

3.4.2.1. Processo de Fabricação da MTG

A produção da transglutaminase derivada de microorganismo começou a ser estudada em 1989, onde foi descoberta a principal espécie de microorganismo produtora de transglutaminase, o *Streptoverticillium mobaraense*. O processo de fermentação para a produção de transglutaminase requer, como meio de cultura para os microorganismos, fontes de carbono (glicose, sacarose, amido, glicerina, dextrina...), fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico (uréia, aminoácidos, NaNO_3 ...), minerais e vitaminas. Como é um processo de fermentação aeróbia, o meio de cultura tem que ser agitado para incorporação de ar. A temperatura para o crescimento do microorganismo e produção da MTG está entre 25 °C e 35 °C e o tempo de fermentação depende das condições do meio de cultura e é determinado pela maior atividade da transglutaminase que pode ser alcançada, normalmente varia de 2 a 4 dias. A MTG é uma enzima extracelular dissolvida no caldo de fermentação, assim é necessário realizar uma purificação da enzima através da utilização

de álcool, solventes orgânicos, processos de ultrafiltração, entre outros métodos, com a finalidade de recuperar de forma mais eficiente a MTG pura no final do processo. A MTG obtida pode ser misturada com estabilizantes de enzima como vários sais, açúcares, proteínas, lipídios e surfactantes (ZHU et al, 1995).

A Ajinomoto comercializa a transglutaminase produzida por fermentação microbológica usando um meio de cultura com amido e o microorganismo *Streptovorticillium mobaraence* sendo que após a fermentação os microrganismos são completamente removidos do produto final (ANDO et al, 1989).

A Ajinomoto possui a patente mundial para a produção da MTG que é destinada à aplicação em alimentos. No Brasil, a sua utilização ainda é restrita aos setores de carnes e frutos do mar e farináceos, sendo pouco conhecidas as suas possibilidades de aplicação em produtos lácteos.

Portanto, a enzima transglutaminase empregada em alimentos é produzida atualmente pela AJINOMOTO e recebe o nome de ACTIVA® TG, possuindo vários tipos de preparações da transglutaminase, que diferem em função do tipo de aplicação a que se destina. A grande variação de cada tipo de preparação é o veículo utilizado e a concentração de transglutaminase existente. Dentre as preparações têm-se:

- ACTIVA® TG-B: consiste na mistura de enzima MTG, caseinato de sódio, ester de sacarose e ácido graxo e maltodextrina. Esta preparação é utilizada para embutidos em geral e carnes reestruturadas;

- ACTIVA® TG-BP: consiste na mistura de enzima MTG, proteínas do leite, polifosfato e pirofosfato de sódio e dióxido de silicone. Esta preparação é utilizada principalmente para carnes reestruturadas e embutidos;

- ACTIVA® TG-S: consiste na mistura de enzima MTG, lactose, maltodextrina, polifosfato e pirofosfato de sódio e L-ascorbato de sódio. Esta preparação é utilizada para emulsionados em geral, presuntos e injetados em geral;

- ACTIVA® STG-M: consiste na mistura de enzima MTG e amido. Esta preparação é utilizada em massas em geral como: massas secas e frescas, pães, massas de pizza, entre outros;

- ACTIVA® TG-MP: consiste na mistura de enzima MTG, lactose e maltodextrina (ANEXO II). Esta preparação é utilizada em produtos derivados de leite como iogurtes e queijos.

Desta maneira, a preparação de enzima MTG escolhida para este projeto foi a ACTIVA® TG-MP, da qual, maiores detalhes serão citados adiante.

3.4.2.2. Propriedades básicas da MTG

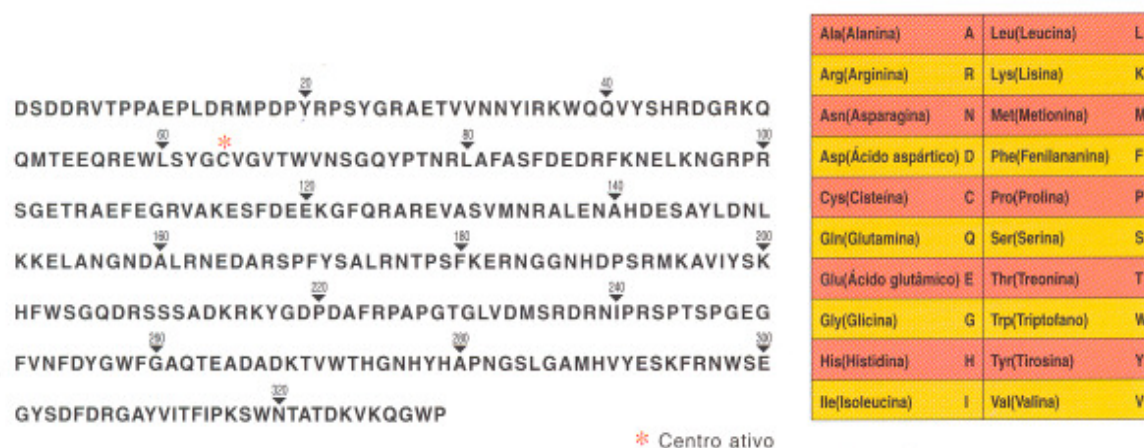
A TG derivada de microorganismos, quando comparada com a TG derivada de mamíferos, possui uma maior aplicação em alimentos, tanto por ser mais viável economicamente, quanto por ser Ca^{+2} independente, ou seja, ela não necessita de cálcio para atuar nos produtos (TABELA 3.3), facilitando sua aplicação nos alimentos (NIELSEN, 1995).

TABELA 3.3- DEPENDÊNCIA DE Ca^{+2} DA TG DE MICROORGANISMO E DA TG DE FÍGADO DE PORQUINHO DA ÍNDIA

CONCENTRAÇÃO DE CaCl_2	TG DE MICROORGANISMOS (Atividade relativa)	TG DE FÍGADO DE PORQUINHO-DA-ÍNDIA
0 mM	100%	0%
1 mM	100%	39%
5 mM	99%	100%

FONTE: catálogo AJINOMOTO

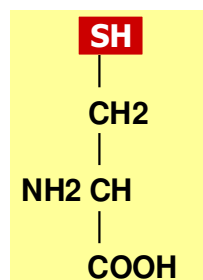
A MTG possui uma cadeia simples de polipeptídeos, com peso molecular de aproximadamente 38,0 daltons e consistindo de 331 aminoácidos. Um resíduo de cisteína fica alocado no centro ativo da enzima (FIGURA 3.2).



FONTE: KANAJI et al,1993.

FIGURA 3.2- ESTRUTURA PRIMÁRIA DA MTG

O grupo SH da cisteína é envolvido na reação catalítica (FIGURA 3.3). A atividade da enzima é inibida por reagentes que modificam os grupos SH (KANAJI et al, 1993).



FONTE: ANDO et al,1989

FIGURA 3.3- CENTRO ATIVO DA TG: CISTEÍNA

A atividade da enzima é perdida por meio da oxidação do grupo SH, então, o processo desde a manufatura até a embalagem é controlado para minimizar o contato com o oxigênio (KANAJI et al, 1993).

A especificidade da MTG tem sido estudada a fundo usando substratos sintéticos como modelo (TABELA 3.4). Embora o Benziloxycarbonil-Glutamina-Glicina seja um bom substrato para a transglutaminase, a reatividade com a enzima, é claramente diferente, dependendo da localização do resíduo Glutamina, mesmo com peptídeos contendo glutaminas. Este resultado sugere que a habilidade da proteína em agir como substrato para a transglutaminase é afetada por condições ambientes envolvendo a glutamina na cadeia peptídica (ANDO et al,1989).

TABELA 3.4- ESPECIFICIDADE DA MTG PARA SUBSTRATOS SINTÉTICOS

Substrato	Atividade	Substrato	Atividade
Z-Gln-Gly	100%	Z-Gly-Gly-Gln-Gly	28%
Z-Gln-Gly-OEt	65%	Z-Gln	0%
Z-Gln-Gln-Gly	38%	Z-Asn-Gly	0%
Z-Gly-Gln-Gly-Gly	13%	Gly-Gln-Gly	0%

* Z: grupo Benziloxycarbonil ($C_6H_5CH_2OCO-$)

FONTE: ANDO et al,1989

Proteínas contendo muitas estruturas aleatórias, como a caseína e a gelatina, que são bons substratos para outras enzimas são, também, bons substratos para a transglutaminase. Proteínas contendo muitos resíduos de lisina e glutamina, assim como proteínas de soja e de trigo, são bons substratos também (TABELA 3.5). As reatividades das proteínas podem, muitas vezes, serem otimizadas por aquecimento ou mudança de pH para desnaturar parcialmente a conformação do substrato (SAKAMOTO et al, 1994).

TABELA 3.5- REATIVIDADE DA MTG PARA VÁRIAS PROTEÍNAS

Proteína de Alimento			Proteína de Alimento			
		Reatividade			Reatividade	
Leite	Caseína	⊙	Carnes	Mioglobina	△	
	Caseinato de Sódio	⊙		Colágeno	○	
	α-Lactoalbumina	△		Gelatina	⊙	
	β-Lactoglobulina	△		Miofibrila: Miosina	⊙	
Ovos	Proteína da Clara (ovoalbumina)	△	Soja	Miofibrila: Actina	×	
	Proteína da Gema	○		Globulina 11S	⊙	
					Globulina 7S	⊙
				Trigo	Gliadina	○
					Glutenina	○

⊙ : reage muito bem

○ : reage bem

△ : reage dependendo das condições

× : em geral não reage

⊙ : reage muito bem

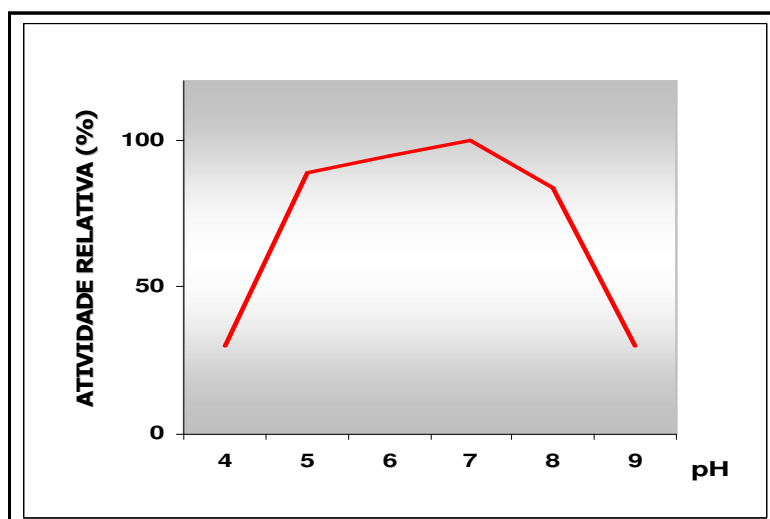
○ : reage bem

△ : reage dependendo das condições

× : em geral não reage

FONTE: SAKAMOTO et al, 1994

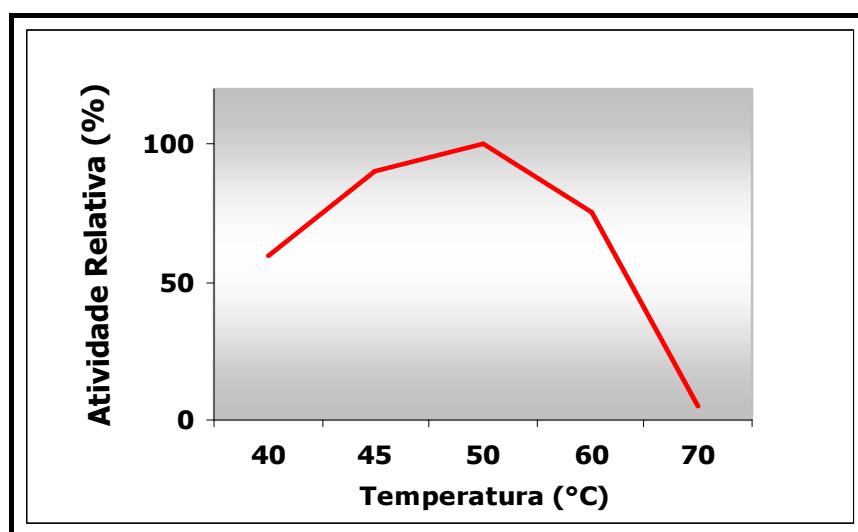
Como toda enzima, a atividade da MTG varia com o pH e com temperatura. A MTG é altamente ativa em uma larga faixa de pH que vai de 5 a 8 (FIGURA 3.4). Não há, portanto, nenhum problema de inativação para a maioria dos processamentos de alimentos (ANDO et al, 1989).



FONTE: ANDO et al, 1989

FIGURA 3.4- ATIVIDADE RELATIVA DA MTG EM RELAÇÃO AO pH

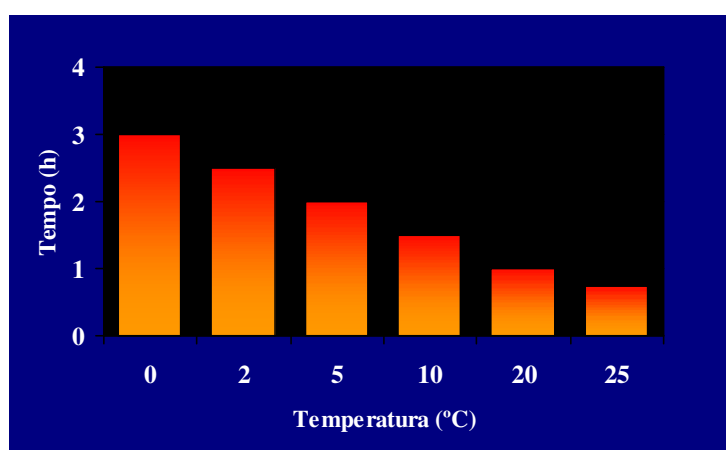
A enzima é estável até a temperatura de 50 °C onde a partir daí a atividade começa a reduzir-se gradualmente (FIGURA 3.5).



FORTE: ANDO et al,1989

FIGURA 3.5- ATIVIDADE RELATIVA DA MTG EM RELAÇÃO À TEMPERATURA

Quando há substrato suficiente, as relações entre tempo e temperatura necessárias para se obter resultados equivalentes em um mesmo produto estão indicadas através do gráfico abaixo (FIGURA 3.6), onde a 50 °C (temperatura ótima de atuação) a enzima atua em 10 minutos (ANDO et al,1989).

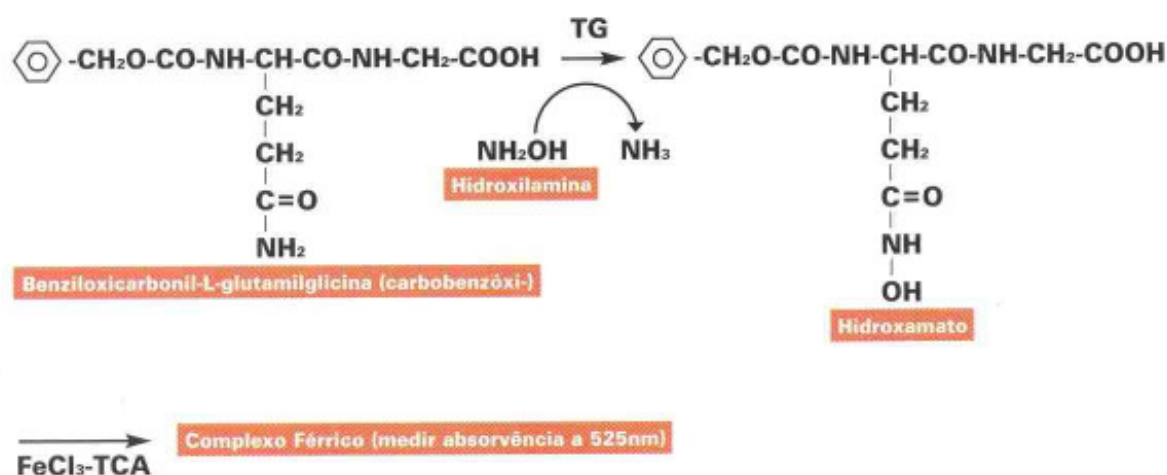


FORTE: ANDO et al,1989

FIGURA 3.6- RELAÇÃO ENTRE OS TEMPOS DE REAÇÃO DA MTG E AS TEMPERATURAS

Embora a inativação da MTG esteja comprovada a 75 °C para a maioria dos alimentos, as temperaturas e tempos necessários para a inativação são diferentes dependendo de cada tipo de alimento. Como regra geral, uma vez que a estabilidade aumenta quando as enzimas coexistem com substratos, a atividade é mais facilmente mantida com alimentos contendo muitas proteínas-substrato (ANDO et al,1989).

A atividade da MTG pode ser medida incorporando-se hidroxilamina, uma amina primária, ao Z-Gln-Gly, um substrato sintético, e então medindo a quantidade de ácido hidroxâmico produzido (FIGURA 3.7). A unidade enzimática é definida como a quantidade que causa a formação de 1μM de ácido hidroxâmico em um minuto a 37 °C (FOLK & COLE, 1966; U.S. PATENT n. 5).



FONTE: FOLK & COLE, 1966

FIGURA 3.7- MÉTODO DE MEDIÇÃO DA ATIVIDADE DA MTG (MÉTODO HIDROXAMATO)

A transglutaminase é uma enzima muito eficiente, não altera o pH, sabor e cor do produto nas suas aplicações e é totalmente adequada a produtos de valor agregado e de alta qualidade (ANDO et al,1989).

3.4.2.3. Valor Nutricional

Na reação de ligação cruzada da transglutaminase, são formadas ligações ε-(γ-Glutamina) Lisina intermoleculares e intramoleculares (KURAISHI et al, 1996). Essas ligações entre os resíduos de lisina e glutamina existem em vários alimentos e são utilizadas eficientemente no que diz aos valores nutricionais, pois ocorre a proteção da lisina das reações químicas em diversas proteínas. Finalmente, uma vez que as pessoas têm consumido alimentos que contenham ligações de lisina e glutamina há muito tempo, a segurança pode ser comprovada (SEGURO et al, 1996).

3.4.2.4. Propriedades Funcionais

As ligações G-L formadas pela transglutaminase causam efeitos significativos nas proteínas, mudando as propriedades físicas dos alimentos que são muito úteis, pois ajudam a melhorar seu valor comercial (KURAISHI et al, 1996). Dessa forma, pode-se descrever algumas mudanças na estrutura protéica fornecida pela adição da transglutaminase.

Capacidade de gelificação: em soluções protéicas não formadoras de gel, com uso de TG, pode-se reverter essa situação. No caso de soluções (sóis, suspensões) que formam gel, com auxílio de TG, o gel fica ainda mais firme. A força de ruptura do gel varia com o aumento do número de ligações ϵ -(γ -Glu) Lys. O excesso de MTG causa um decréscimo na força do gel, e este, por sua vez, fica mais fraco e perde sua capacidade de retenção de água, podendo ocorrer a sinerese. O excesso de ligações ϵ -(γ -Glu) Lys pode inibir o desenvolvimento uniforme da rede protéica (KURAISHI et al, 1996).

NOKATA et al (1996) comparou a formação de géis de caseinato de cálcio em leite desnatado adicionado de leite em pó e em leite desnatado adicionado de MTG (enzima/proteína de leite na razão de 0,4%). Ambos os sistemas formaram géis firmes. Este estudo demonstrou que a TG melhora a textura de alimentos protéicos. Como resultado, foi observado que o gel formado pela coagulação do leite fica mais viscoso na medida que novas ligações covalentes são introduzidas pelas ligações cruzadas.

Uma rede mais compacta pode ser também formada quando um tratamento térmico (95 °C/ 5 min) é aplicado no leite antes da coagulação. Isso é devido à associação da betalactoglobulina desnaturada com as micelas de caseína ocorrendo a formação das pontes dissulfetos (FAEGEMAND & QVIST, 1997).

Ligações cruzadas produzem uma estrutura do gel com uma rede de melhor qualidade e com maior capacidade de retenção de água (ou soro). A formação de uma rede protéica mais compacta leva a menores poros na rede, que por sua vez, causa uma menor permeabilidade (FAEGEMAND & QVIST, 1997).

Viscosidade: quando a proteína é polimerizada e aumenta seu peso molecular, a solução normalmente apresenta um aumento na sua viscosidade (NIELSEN, 1995).

Estabilidade térmica: As ligações covalentes formadas pela TG são termicamente estáveis, dessa forma, aumentam a estabilidade térmica do alimento quando adicionada a este (NIELSEN, 1995; KURAISHI et al, 1996).

Capacidade de retenção de água: o gel formado por ligações ϵ -(γ -Glu) Lys apresentam uma melhor capacidade de retenção de água. Mesmo a 2% de concentração protéica, o gel de gelatina, por exemplo, consegue adquirir uma boa estabilidade. Com o uso da TG, géis alimentícios com boa capacidade de retenção de água podem ser produzidos sem adição de gelatina (KURAISHI et al, 1996).

3.4.2.5. Aplicação da Transglutaminase em Produtos Lácteos

A aplicação da transglutaminase tem sido sugerida na fabricação de queijos, iogurtes e sorvetes, principalmente os de baixa caloria (LAUBER et al, 2000). Ela é capaz de induzir a ligação da caseína, levando ao aumento do seu peso molecular. Entretanto, a relação entre a oligomerização da caseína e a formação de isopéptides, ou seja, o grau de ligação e as propriedades funcionais, ainda não são bem conhecidos (LAUBER et al, 2000).

Segundo LORENZEN & SCHLIMME (1998), alguns usos potenciais da transglutaminase no processamento de proteínas e produtos lácteos são:

- Aumento da firmeza do gel e diminuição da sinerese em iogurtes;
- Aumento do rendimento e diminuição da sinerese na produção de queijos;
- Aumento da capacidade de retenção de água e aumento das propriedades de gelificação de sorvetes;
- Aumento da viscosidade e das propriedades de gelificação e emulsificação em caseinatos;
- Obtenção de concentrados lácteos gelificados como ingredientes para sobremesas lácteas;
- Melhoria das propriedades físicas de cremes batidos;
- Utilização de proteínas micro-particuladas como substitutos de gordura;
- Incorporação covalente de lisil-péptides em proteolisados;
- Produção de filmes alimentícios a base de soro;
- Produção de filmes ou camadas comestíveis, polímeros médicos (pele artificial) e imobilização de enzima a partir da α s1-caseína.

A produção de queijos utilizando transglutaminase é uma alternativa viável que pode trazer vantagens, como o aumento do rendimento de fabricação e possível recuperação de proteínas solúveis. Como resultado da adição da enzima durante a fabricação, o peso da coalhada formada pode ser aumentado e esta é transformada em queijo com boa qualidade

sensorial, mantendo suas características de firmeza e corpo, mesmo após a maturação (TABELA 3.6) (KURAISHI et al, 1997).

TABELA 3.6- RESULTADOS DA APLICAÇÃO DA TG EM QUEIJO FRESCO

	SEM TG	TG 1 U/ g proteína	TG 5 U/ g proteína
Massa (g)	166,5 (100)	176,6 (106)	183,9 (110)
Umidade (%) Massa(g) / 800g	20,8	22,1	23,0
Sólidos (%)	35,4	34,0	32,1
Proteína (%)	13,4	12,8	12,0
Gordura (%)	17,6	17,3	15,6
Cor	branca	branca	branca
Sinerese (3 dias da produção)	+++	—	—
Corpo e Textura	Consistência adequada Ligeiramente seca e esfarelante	Consistência adequada Textura suave	Consistência adequada Textura lisa e suave

FONTE: material técnico AJINOMOTO USA, 1997

NOTA: Massa de queijo fresco, obtida a partir de 800 g de leite
1g de ACTIVA TG-MP = 100 U enzimáticas

O soro geralmente possui proteínas solúveis que normalmente não são afetadas pela coagulação da caseína e, conseqüentemente, não são incorporadas à massa diminuindo a eficiência na produção dos diversos queijos. A utilização das proteínas do soro para melhorar o rendimento da fabricação de queijos é um interesse atual na pesquisa aplicada (HAN & SPRADLIN, 2000).

Diversos métodos têm sido propostos com o objetivo de recuperar as proteínas solúveis em queijos, tais como concentração, secagem, ultrafiltração, com posterior adição do concentrado à massa do queijo. Todos os métodos conhecidos são onerosos e resultam, na maioria das vezes, em produtos com drenagem insatisfatória do soro e, cuja firmeza, corpo, textura e propriedades sensoriais são alteradas, não sendo empregados pela maioria das indústrias (KURAISHI et al, 1997).

A utilização da transglutaminase pode ser uma alternativa tecnológica viável, resultando na produção de queijos com características reológicas e sensoriais satisfatórias, e possibilitando um melhor aproveitamento do leite, reduzindo os custos e aumentando a lucratividade para a indústria (OLIVEIRA, 2003).

3.4.2.5.1. Aplicação da ACTIVA® TG-MP em Requeijão Cremoso

Segundo FOLTRAN et al (2001), a transglutaminase atua melhor no requeijão elaborado a partir do processo de acidificação direta. Quando adicionou a TG antes da coagulação o rendimento da massa obtido foi maior do que quando a TG foi adicionada depois da coagulação, mas adicionando a TG depois da coagulação o produto final ficou mais viscoso. Foi necessário um tempo de maturação, para a atuação da enzima, de 1 hora e 30 minutos a 40 °C. A concentração de TG considerada ideal foi a de 0,02% onde foi obtida a melhor característica reológica e sensorial, além de um aumento de 12,39% de rendimento e redução de 38% do custo em relação à amostra controle (sem TG). Os resultados deste estudo podem ser analisados na TABELA 3.7.

TABELA 3.7- RESULTADOS DA APLICAÇÃO DA TG EM REQUEIJÃO CREMOSO

	SEM TG (CONTROLE)	TG 0,01%	TG 0,02%	TG 0,03%
Aw	0,992	0,995	0,995	0,996
Umidade (%)	72,9	74,7	75,2	75,8
Proteína (%)	15,9	12,6	12,9	Não analisado
pH	5,78	5,93	5,80	6,13
Cor	branca	branca	branca	branca
Sinerese (após 120 dias)	+	Não analisado	—	—
Consistência	Mole Pouco viscoso (---)	Mole Pouco viscoso (--)	Firme Muito viscoso (++)	Firme Muito viscoso (++)

FONTE: FOLTRAN et al, 2001

3.5. PROPRIEDADES REOLÓGICAS

Reologia é o ramo da física que estuda a deformação e o fluxo de materiais sólidos e fluidos, em resposta a uma força ou deformação aplicada. A deformação diz respeito aos materiais sólidos, como é o caso dos queijos semiduros e o fluxo se refere aos materiais líquidos, como é o caso do requeijão. As qualidades reológicas são percebidas principalmente pelos órgãos do tato e, em pequena extensão, pela visão. A avaliação reológica dos produtos alimentícios pelos métodos instrumentais como viscosímetros e texturômetros, resulta em informação de grande importância em cálculos de engenharia de processos englobando uma grande quantidade de equipamentos tais como agitadores, extrusoras, bombas, trocadores de calor, tubulações ou homogeneizadores, determinação da funcionalidade de ingredientes no desenvolvimento de produtos, controle de qualidade do produto final ou intermediário, determinação de vida-de-prateleira e avaliação da textura pela correlação com dados sensoriais (ANJO, 2000).

As propriedades de textura estão intimamente relacionadas à deformação, desintegração e ao fluxo do alimento, sob a aplicação de uma força. São objetivamente medidas pelas funções: tempo, força, massa e distância (GIESE, 1995).

Viscosidade pode ser definida como a fricção interna de um fluído ou sua tendência a resistir ao fluxo, ou seja, é uma medida da intensidade da interação energética entre as moléculas do fluído. A distinção entre textura e viscosidade parece bastante simples; viscosidade relaciona-se a alimentos fluidos, ou seja, que apresentam propriedade de escoamento e textura relaciona-se a alimentos sólidos (CAMPOS, 1989; GIESE, 1995).

O requeijão possui um comportamento reológico complexo, como a grande maioria dos alimentos, exibindo caráter pseudoplástico e em alguns casos, tixotropia. O conhecimento dos parâmetros reológicos do material é muito útil na escolha e projetos de equipamentos, no controle de qualidade e no desenvolvimento de novos produtos; como já foi dito. Existem inúmeros equipamentos que medem as propriedades reológicas, mas somente alguns reômetros capilares e os rotacionais com geometrias bem definidas (cilindros concêntricos, placas paralelas ou cone-placa) podem quantificar a taxa de deformação do sistema de medida (STEFFE, 1996).

No caso dos reômetros rotacionais, a velocidade não varia com o tempo no cisalhamento em estado estacionário e as tensões geradas pelo escoamento podem atuar tanto na direção paralela (tensões de cisalhamento), como na direção perpendicular ao cisalhamento (tensões normais). Com este tipo de equipamento pode-se determinar a viscosidade aparente, que é definida como a relação entre a tensão de cisalhamento e a taxa de deformação (BARONI et al, 1999).

Pressão (“stress”) é a intensidade dos componentes da força agindo num material e é expressa em unidades de força por unidade de área. Existem 3 tipos de pressão: compressão, aplicada perpendicularmente contra a superfície do material; tensão, esticando o material; e cisalhamento, aplicada tangencialmente ao material (SZCZESNIAK, 1983).

E deformação (“strain”) é a mudança no tamanho ou espessura de um corpo, em resposta a uma força aplicada. É um parâmetro adimensional, se traduz como uma relação ou porcentagem, e é expresso como uma mudança em relação ao tamanho ou espessura original (SZCZESNIAK, 1983; GIESE, 1995).

De acordo com SHOEMAKER et al (1992), a avaliação das propriedades reológicas dos queijos é tão importante quanto a avaliação do sabor e aroma. Em queijos processados untáveis, como é o caso particular do requeijão cremoso, a textura é uma propriedade que exerce um papel fundamental na qualidade do produto final. As características reológicas: espalhabilidade, cremosidade, elasticidade e viscosidade são tão importante quanto o sabor e aroma do produto final (VERMA & GUPTA, 1981; CAMPOS, 1989; TUNICK & NOLAN, 1992).

Dentre os mais diversos produtos derivados de leite, os queijos, de modo geral são os que possuem a estrutura mais complexa (CAMPOS, 1989; VERMA & GUPTA, 1981; SHIMP, 1985). Conforme CARIC’ et al (1985), queijo processado é um sistema complexo composto por proteínas, gordura, água, sais minerais e outros ingredientes, sendo que suas principais características de textura são: firmeza, adesividade, elasticidade, gomosidade, coesividade e arenosidade. Estas características dependem da estrutura e do rearranjo das moléculas de proteína. O corpo e a textura dos queijos processados são afetados por vários fatores tais como: composição e grau de maturação da massa utilizada como matéria-prima, pH, tipo e quantidade de sal emulsificante, temperatura e tempo de cozimento, velocidade de agitação e temperatura de resfriamento (RAPACCI, 1997; VERMA & GUPTA, 1981).

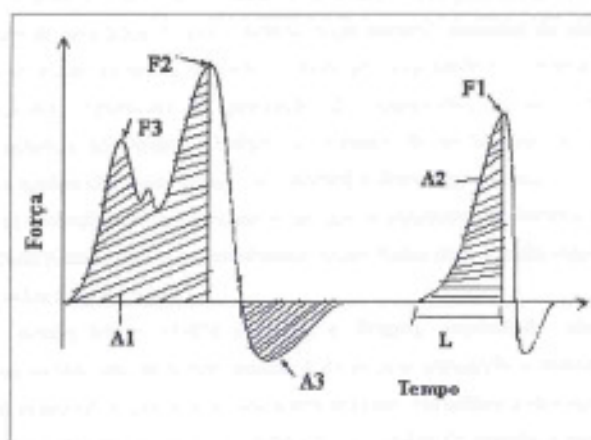
Estas análises podem ser analisadas pelo método de TPA (*Texture Profile Analysis*) aplicável tanto para medidas sensoriais como instrumentais. O método instrumental consiste em comprimir o alimento pelo menos duas vezes e quantificar os parâmetros mecânicos a partir das curvas de força-deformação. Excelentes correlações entre análises de textura experimental e sensorial foram encontradas para o parâmetro de firmeza (SZCZESNIAK, 2002). A TABELA 3.8 mostra as definições de parâmetros mecânicos de textura em relações aos sensoriais.

TABELA 3.8- DEFINIÇÕES DE PARÂMETROS MECANICOS DE TEXTURA

PARÂMETROS	FÍSICO	SENSORIAL
FIRMEZA	Força necessária para atingir uma dada deformação.	Força requerida para comprimir uma substância sólida entre os dentes incisivos.
COESIVIDADE	Extensão que o material pode ser deformado antes da ruptura.	Grau de deformação da amostra antes da ruptura com os molares.
ELASTICIDADE	Taxa em que o material deformado volta para a condição inicial.	Grau em que o produto retorna para sua forma original quando comprimido entre os dentes.
MASTIGABILIDADE	Energia requerida para desintegrar um alimento a um estado pronto para ser engolido.	Número de mastigações necessárias, com força constante, para reduzir a amostra a uma consistência adequada para ser engolida.

FONTE: Adaptado de SZCZESNIAK, 2002.

A curva força-tempo (FIGURA 3.8) da análise TPA gerada por analisador de textura, por exemplo, o Texturômetro TA-TX2i da *Stable Micro Systems*, está interpretada na TABELA 3.9.



FONTE: BRASEC, 1998

FIGURA 3.8- EXEMPLO DA CURVA FORÇA-TEMPO GERADA PELO TEXTUTÔMETRO EM ANÁLISE DE DUPLA COMPRESSÃO (TPA)

TABELA 3.9- INTERPRETAÇÃO DA CURVA FORÇA-TEMPO (FIGURA 3.8) GERADA PELO TEXTURÔMETRO

PARÂMETROS	UNIDADE	DEFINIÇÃO
FIRMEZA	N	Altura do pico do primeiro ciclo (F2).
COESIVIDADE	Adimensional	Relação entre áreas do segundo ciclo (A2) e do primeiro (A1), do contato inicial até o pico.
ELASTICIDADE	m	Distância medida do contato inicial da amostra no segundo ciclo até o pico F1 (L).
ADESIVIDADE	J	Área do pico negativo formado quando o êmbolo é puxado da amostra (A3).
FRATURABILIDADE	N	Caracterizada pela forma dos multi-picos do traçado do primeiro ciclo e é medida como o primeiro máximo local da primeira compressão (F3).
MASTIGABILIDADE	N.m	Firmeza x coesividade x elasticidade.
GOMOSIDADE	N	Firmeza x coesividade x 100.

FONTE: BRASEC, 1998.

As propriedades reológicas dos queijos são funções de sua composição, microestrutura (arranjo estrutural de seus componentes), do estado físico-químico e das interações de seus componentes e de sua macroestrutura (presença de olhaduras, fissuras, etc.) e mudanças nestes fatores podem acarretar alterações do seu comportamento reológico. Entretanto, os queijos são considerados materiais viscoelásticos, ou seja, apresentam comportamento tanto de sólido elástico como de líquido viscoso (requeijão). A viscoelasticidade dos queijos resulta da contribuição individual e da interação entre seus constituintes – proteína, gordura e água (RAPACCI, 1997).

As propriedades da superfície protéica são importantes para a formação e estabilização de emulsões e géis. Proteínas do leite (especialmente as caseínas) possuem uma superfície muito ativa fazendo com que estas proteínas sejam excelentes estabilizantes. A principal função da proteína é formar camadas macromoleculares na interface para proteger as “gotas” de emulsão ou bolhas de ar de reagrupamentos logo após a formação. As propriedades reológicas da camada interfacial da proteína são importantes em relação à estabilidade de ruptura e reagrupamento e são significativas para a formação inicial de espumas e emulsões e sua posterior estocagem por longo período de tempo. A maioria dos processos, envolvidos na formação de emulsão / espuma e estabilidade, estão conectados com as mudanças na área interfacial. Por isso, que a dilatação reológica é considerada muito importante nesses processos. As propriedades reológicas diferem de

acordo com o tipo de proteína e o tipo de interface, particularmente o tipo de óleo. A dilatação superficial das proteínas do leite em superfícies óleo-água e ar-água, aumenta significativamente após ligações enzimáticas cruzadas realizadas pela TG. Essas ligações servem para controlar as propriedades reológicas interfaciais, que são de grande importância para a estabilidade de emulsões ou de espumas (FAEGEMAND & MURRAY, 1998).

O aumento do teor de gordura tem no mínimo o mesmo efeito positivo na estabilidade do gel como a reticulação transversal enzimática das proteínas lácticas com a enzima transglutaminase (SCHILIME et al, 1999).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

4.1.1. Materiais de Consumo

4.1.1.1. Leite

Empregou-se, no presente trabalho, o leite pasteurizado tipo B da marca Paulista, procedente da Cooperativa Central de Laticínios do Estado de São Paulo.

4.1.1.2. Creme de Leite

O creme de leite adicionado à massa no momento da fusão foi o creme de leite pasteurizado da marca Paulista, procedente da Cooperativa Central de Laticínios do Estado de São Paulo, possuindo um teor mínimo de gordura láctea de 35%.

4.1.1.3. Cloreto de Sódio

O cloreto de sódio utilizado foi o sal comercial da marca Cisne, procedente da Refinaria Nacional de Sal S/A.

4.1.1.4. Sal Emulsificante

O sal emulsificante utilizado foi o JOHA[®] S9, composto por Polifosfato de sódio e Fosfato dissódico, gentilmente fornecido pela empresa BKG Chemie. Vide especificação do produto em anexo (ANEXO III).

4.1.1.5. Ácido Láctico

O ácido láctico utilizado neste experimento foi de padrão alimentar, 85% de pureza, procedente da VETEC.

4.1.1.6. Enzima Transglutaminase ACTIVA® TG-MP

O coadjuvante de tecnologia que foi adicionado ao leite a fim de melhorar as propriedades reológicas do produto final foi a enzima transglutaminase, mais especificamente a preparação ACTIVA® TG-MP, gentilmente fornecida pela empresa Ajinomoto. Esta preparação enzimática possui atividade declarada de 100U/ g de preparação enzimática; vide especificação do produto em anexo (ANEXO II).

4.1.1.7. Outros

- Frascos de vidro próprios para Requeijão;
- Reagentes e vidrarias de laboratório para a realização das análises e
- Utensílios de Planta Piloto.

4.1.2. Equipamentos

4.1.2.1. Tanque para Produção de Queijos

O tanque para produção de queijos foi utilizado para realizar o banho-maria a 65 °C na etapa de coagulação para aquecer e manter o leite a 65 °C até o leite atingir o pH de 4,8 através da adição de ácido láctico.

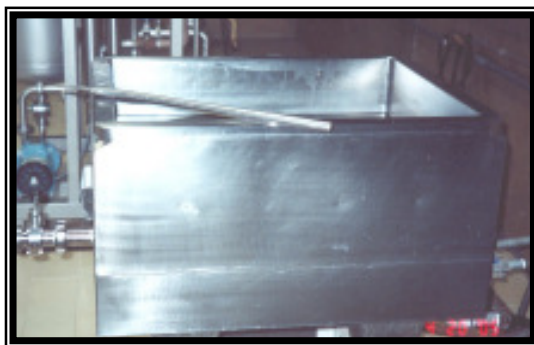


FIGURA 4.1- BANHO-MARIA A 65 °C

4.1.2.2. Misturador/ Stephan – Geiger

O misturador Stephan foi utilizado para a realização da fusão, realizada na temperatura de 95 °C por 5 minutos.



FIGURA 4.2- MISTURADOR STEPHAN

4.1.2.3. Estufas a 40 °C e a 105 °C

As estufas a 40 °C foram utilizadas para a realização da maturação do leite com a enzima transglutaminase. As estufas a 105 °C foram utilizadas para as análises de umidade.

4.1.2.4. Mufla a 550 °C *Fanem*

A mufla a 550 °C foi utilizada para a realização da análise de cinzas.

4.1.2.5. Potenciômetro *Micronal mod. B-474*.

O potenciômetro foi utilizado para a realização das medições de pH como: leite, leite coagulado, requeijão.

4.1.2.6. Bloco Digestor

O bloco digestor foi utilizado para análise de proteína pelo método de Kjeldahl.

4.1.2.7. Destilador de Kjeldahl

O destilador foi utilizado para análise de proteína pelo método de Kjeldahl.

4.1.2.8. Centrifugador *Fanem – Mod. 202*

O centrifugador foi utilizado para análise de gordura pelo método de Gerber.

4.1.2.9. Texturômetro: *TAXT2i -Texture Analyser*

O texturômetro foi utilizado para algumas análises como perfil de textura e avaliar a viscoelasticidade do requeijão.

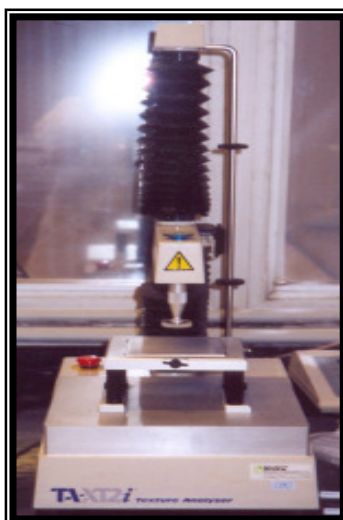


FIGURA 4.3- TEXTURÔMETRO: *TAXT2i -TEXTURE ANALYSER*

4.1.2.10. Reômetro: *Rheometer- Brookfield Mod. DV-III*

O reômetro foi utilizado para medir a viscosidade do requeijão. As análises foram realizadas na temperatura de 60 °C e em duplicata para todas as amostras. O probe selecionado foi spindle SC4-18.

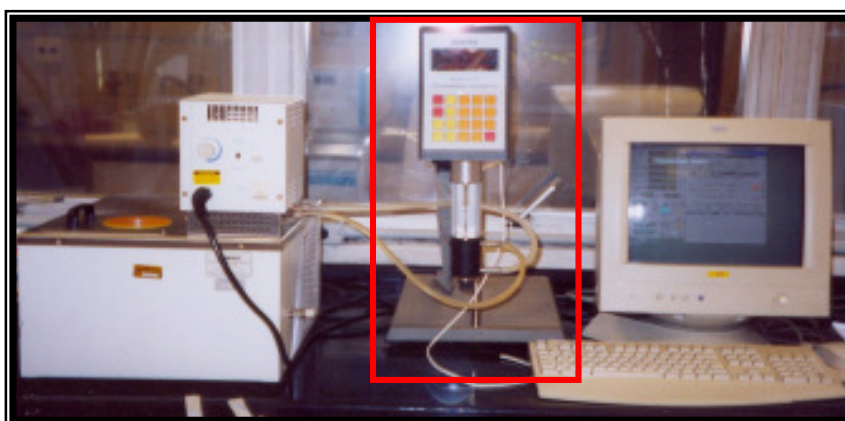


FIGURA 4.4- REÔMETRO: *RHEOMETER- BROOKFIELD MOD. DV-III*

4.1.2.11. Outros

- Balança analítica – *Micronal S/A*
- Balança semi-analítica – *Sartorius*

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Processo de Fabricação

O processo de fabricação foi determinado a partir do método que forneceu maior rendimento, no estudo realizado por FOLTRAN et al (2001). Desta forma, o processo produtivo foi o de acidificação direta a quente (65 °C) com adição da enzima transglutaminase antes da coagulação a 40 °C.

Inicialmente foram desenvolvidos alguns experimentos preliminares visando melhor estabelecer os principais parâmetros do processo de fabricação do requeijão cremoso tais como: quantidade aproximada de ácido láctico que seria utilizado para o leite a 65°C atingir o pH de 4,8, padronização da dessora, melhor quantidade de leite a ser adicionada na massa coagulada a fim de obter uma boa cremosidade do produto final, tempo e temperatura de cozimento da massa.

Definidos os parâmetros de processo, foram realizados 11 ensaios utilizando a enzima transglutaminase em diferentes concentrações e diferentes tempos de atuação, e um ensaio Padrão sem a adição da enzima transglutaminase. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Em todos os processamentos utilizou-se o leite pasteurizado tipo B do mesmo lote. O leite foi pesado, 13 L para cada ensaio, aquecido a 40 °C e, após o leite atingir 40 °C, foi adicionada a enzima TG-MP. O leite já com a enzima foi acondicionado em estufa a 40 °C durante o tempo pré-determinado de atuação.

Após o tempo de atuação, o leite foi colocado em um banho-maria a 65 °C e foi adicionado ácido láctico na quantidade necessária para o leite atingir pH 4,8 e ocorrer a coagulação do mesmo.

A massa coagulada foi retirada com peneiras e mantida por 5 minutos em formas para queijos para a realização da dessora. Após a dessora, pesou-se a massa para a avaliação do rendimento e para tornar possível a pesagem dos outros ingredientes.

Em seguida realizou-se o processo de fusão da massa que foi realizado em uma máquina homogeneizadora STEPHAN (FIGURA 4.2), a 95 °C por 5 minutos. Nesta etapa foram adicionados 1,5% de sal, 2,0% de sal fundente, 5,0% de creme de leite e 1 parte de leite: 2 partes de massa.

Após a fusão, o produto final foi envasado e armazenado em câmara fria.

Todo processo pode ser avaliado no diagrama de blocos apresentado na FIGURA 4.5.

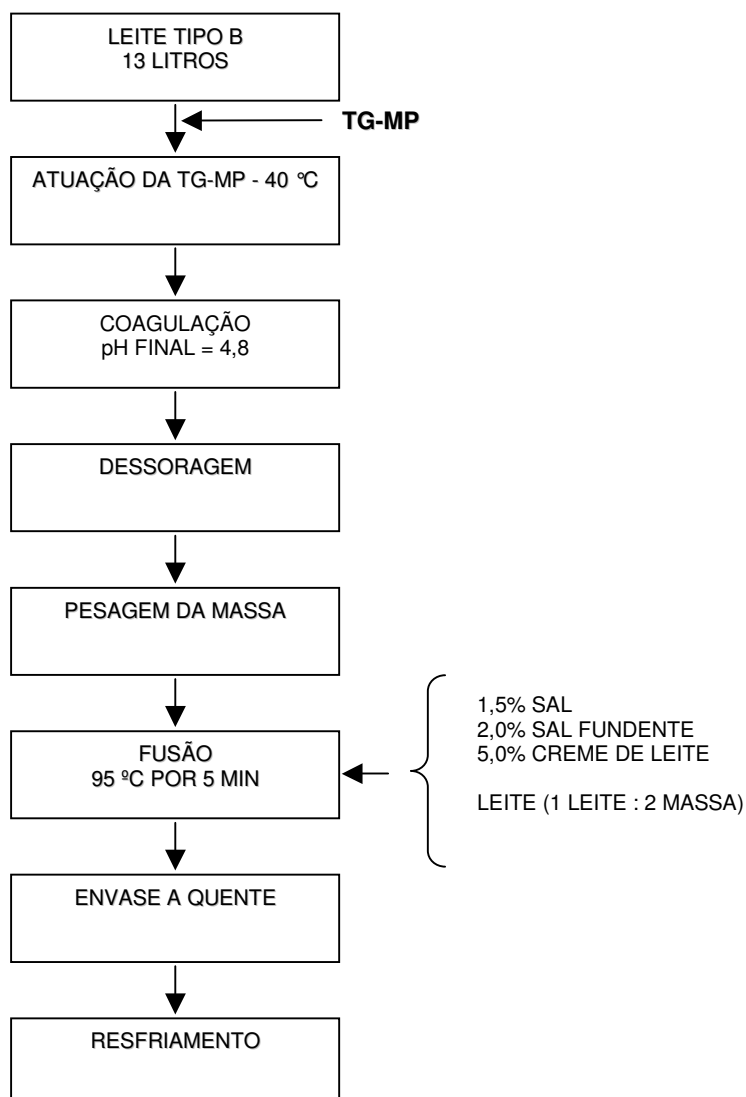


FIGURA 4.5- DIAGRAMA DE BLOCOS DO PROCESSO DE FABRICAÇÃO DO REQUEIJÃO CREMOSO

4.2.2. Desenvolvimento do Trabalho

O trabalho foi desenvolvido em 2 etapas: otimização das condições de atuação da enzima transglutaminase e avaliação das características do produto final, descritas a seguir:

4.2.2.1. Otimização das condições de atuação da enzima transglutaminase

Foi realizado um delineamento experimental, fatorial 2^2 , para verificar as melhores condições de concentração de enzima e tempo de atuação, com a finalidade de obter um maior rendimento final (TABELA 4.1). Os pontos centrais do planejamento experimental foram determinados a partir dos pontos (0,02% de TG-MP e 1h 30 min de atuação) que forneceram maior rendimento no estudo de FOLTRAN et al (2001). Os experimentos foram dimensionados utilizando-se o método de análise de superfície de resposta e os resultados foram avaliados conforme descrito por BRUNS et al (1996). Os ensaios apresentados na TABELA 4.1 foram realizados em duplicata, ensaios A e ensaios B.

TABELA 4.1- PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL – FATORIAL 2^2

ENSAIOS	VARIÁVEIS INDEPENDENTES			
	TG (%) - X1		TEMPO (HORA) - X2	
	CODIFICADA	REAL	CODIFICADA	REAL
1	-1	0.01	-1	1
2	+1	0.03	-1	1
3	-1	0.01	+1	2
4	+1	0.03	+1	2
5	0	0.02	0	1.5
6	0	0.02	0	1.5
7	0	0.02	0	1.5
8	-1.41	0.006	0	1.5
9	0	0.02	+1,41	2.2
10	+1,41	0.034	0	1.5
11	0	0.02	-1.41	0.8

4.2.2.2. Avaliação das características do produto final

4.2.2.2.1. Análises Físico-Químicas

- pH: foi realizado em um potenciômetro Micronal modelo V, conforme descrito na A.O.A.C. (1995).
- Gordura: foi realizado segundo Método de Gerber, conforme descrito por ATHERTON & NEWLANDER (1977).
- Proteína: foi realizado segundo Método de Kjeldahl (digestor e destilador de Kjeldahl), conforme descrito na A.O.A.C. (1995).
- Cinzas: foi realizado em uma mufla a 550 °C, conforme descrito na A.O.A.C. (1995).

- Sólidos Totais: foi realizado em uma estufa a 105 °C, conforme descrito na A.O.A.C. (1995).
- Cálcio Total: foi realizada uma titulação por quelatometria, conforme descrito na A.O.A.C. (1995).
- Textura: foi avaliada, através da análise do perfil de textura e ruptura, utilizando o texturômetro universal modelo TAXT2i (Texture Profile Analyser – Stable Micro Systems) interligado com um microcomputador tipo PC utilizando o aplicativo *Texture Expert* – v. 3.1. A coleta dos dados foi realizada com auxílio do *Software XY / Texture Analyser*, conforme descrito no manual da BRASEQ (1998). Estas análises foram realizadas após 15 dias de armazenamento.

A determinação do perfil de textura foi realizada segundo metodologia descrita por RAPACCI (1997). As condições do teste foram:

TPA compressão:

- Distância que o dispositivo penetra na amostra: 20% da altura;
- Velocidade: 1,0 mm/s;
- Força de contato: 100 g ou 0,98 N;
- Dispositivo a ser utilizado: probe de acrílico, cilindro achatado, de 35 mm de diâmetro;
- Temperatura da amostra: 25 °C;
- Recipiente: pote plástico.

Ruptura:

A amostra foi colocada na plataforma do aparelho centralizada de acordo com uma marca existente na parte central da mesma e por fim seguiu-se a obtenção de dados. Esta foi submetida a uma compressão de cerca de 35% de deformação da mesma, onde o aparelho percebe a força resposta da amostra.

A obtenção de dados é dada por um grupo de pontos de força e distância, em forma de gráficos, para interpretação dos resultados de força máxima de ruptura do queijo analisado, fornecendo conseqüentemente a viscoelasticidade do mesmo. Estas análises foram realizadas em duplicata após 15 dias de armazenamento.

- Viscosidade: foi realizada em um reômetro Brookfield modelo DV-III, em cilindros concêntricos a 60 °C, em duplicata e após 7 dias de armazenamento. O probe selecionado foi spindle SC4-18. O programa escolhido foi V3.3 LV. Este processo fornece a viscosidade aparente.

4.2.3. Análise dos Dados

Os dados resultantes das análises de rendimento, ruptura e viscosidade foram analisados segundo o método de superfície de respostas e curvas de contorno com a utilização do programa MINITAB, sendo avaliados através da otimização de processos conforme descrito por BRUNS et al (1996). Através do programa estatístico, MINITAB, obtêm-se os coeficientes de regressão, os modelos equacionais, a análise do modelo através da ANOVA e cálculo dos desvios.

Quanto aos dados resultantes de composições físico-químicas e a análise de textura TPA, foram analisados através da análise estatística ANOVA, verificando se existia ou não diferença significativa ao nível de 5% entre os dados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. OTIMIZAÇÃO DE PROCESSO: ANÁLISE DO RENDIMENTO

Durante o processamento foi analisado o rendimento da massa obtida após a coagulação. Conforme descrito em 4.2.1, para a análise do rendimento foi utilizado o Planejamento Experimental, fatorial 2^2 . Este planejamento consta de 11 pontos: 4 fatoriais, 4 pontos axiais ($\alpha=1,41$) e 3 pontos centrais. Os resultados obtidos estão apresentados na TABELA 5.1.

TABELA 5.1-. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL. VALORES REAIS E CODIFICADOS DE RENDIMENTO.

ENSAIOS	VARIÁVEIS INDEPENDENTES				VARIÁVEL DEPENDENTE
	TG (%) - X1		TEMPO (HORA) - X2		RENDIMENTO MEDIO (%)
	CODIFICADA	REAL	CODIFICADA	REAL	
1	-1	0.01	-1	1	$14,61 \pm 0,01$
2	+1	0.03	-1	1	$15,0 \pm 0,2$
3	-1	0.01	+1	2	15 ± 0
4	+1	0.03	+1	2	$15,544 \pm 0,008$
5	0	0.02	0	1.5	$15,8 \pm 0,2$
6	0	0.02	0	1.5	16 ± 1
7	0	0.02	0	1.5	$16,1 \pm 0,8$
8	-1.41	0.006	0	1.5	$14,46 \pm 0,05$
9	0	0.02	+1,41	2.2	$15,97 \pm 0,03$
10	+1,41	0.034	0	1.5	$15,58 \pm 0,05$
11	0	0.02	-1.41	0.8	$15,3 \pm 0,2$

Na produção do requeijão padrão, segundo o processo tradicional obteve-se um rendimento de 14 ± 0 , sendo este um rendimento menor quando comparado com os ensaios nos quais foi adicionada a enzima transglutaminase.

Na TABELA 5.2 são apresentados os coeficientes de regressão obtidos a partir da análise dos dados apresentados na TABELA 5.1, realizada com o auxílio do programa estatístico MINITAB.

MODELO CODIFICADO:

TABELA 5.2- COEFICIENTES DE REGRESSÃO DO MODELO CODIFICADO DO RENDIMENTO

	COEFICIENTE DE REGRESSÃO	DESVIO PADRÃO	T	P
MÉDIA	15,9867	0,13271	120,467	0,000
(1) TG (%) (L)	0,3205	0,08127	3,944	0,011
TG (%) (Q)	-0,5552	0,09672	-5,74	0,039
(2) t (hora) (L)	0,2249	0,08127	2,768	0,002
t (hora) (Q)	-0,2377	0,09672	-2,458	0,057
1 (L) x 2 (L)	0,0250	0,11493	0,218	0,836

Deve-se eliminar os fatores onde $p > 0,05$, pois estes termos do modelo não são estatisticamente significativos. Quanto menor o P melhor o coeficiente de regressão. Dessa forma, são eliminados os seguintes fatores:

t quadrático (Q) e a relação TG linear (L) x t linear (L)

Na TABELA 5.3 são apresentados os coeficientes de regressão sem os fatores que foram eliminados.

TABELA 5.3- COEFICIENTES DE REGRESSÃO DO MODELO CODIFICADO DO RENDIMENTO – SEM OS FATORES ELIMINADOS ($p > 0,05$)

	COEFICIENTE DE REGRESSÃO	DESVIO PADRÃO	T	P
MÉDIA	15,7629	0,1215	129,716	0,000
(1) TG (%) (L)	0,3205	0,1023	3,134	0,017
TG (%) (Q)	-0,4853	0,1163	-4,171	0,004
(2) t (hora) (L)	0,2249	0,1023	2,199	0,064

A partir dos valores dos coeficientes de regressão apresentados na TABELA 5.3, obteve-se o seguinte modelo equacional codificado:

$$Y = 15,7629 + 0,3205 X_1 + 0,2249 X_2 - 0,4853 X_1^2$$

Para se obter a amplitude do modelo, foi realizada a análise de variância e os resultados obtidos são apresentados na TABELA 5.4.

TABELA 5.4- ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO MODELO CODIFICADO DO RENDIMENTO

Fonte de Variação	SQ	gl	MQ	F	P
Regressão	2,68225	3	0,89408	10,68	0,005
Linear	1,22637	2	0,61318	7,33	0,019
Quadrático	1,45588	1	1,45588	17,4	0,004
Erro Residual	0,58575	7	0,08368		
Falta de Ajuste	0,53268	5	0,10654	4,02	0,211
Erro Puro	0,05307	2	0,02653		
Total	3,268	10			

A partir dos resultados obtidos na ANOVA (TABELA 5.4) obteve-se a seguinte amplitude do modelo:

$$R^2 = \text{SQ}_{\text{regressão}} / \text{SQ}_{\text{Total}}$$

$$R^2 = 0,82$$

$$R = 0,90$$

A amplitude do modelo foi de 0,90, o que mostra que é um modelo muito bom e preciso.

Através dos valores de distribuição de F ao nível de 0,05 juntamente com os graus de liberdade (gl) apresentados na TABELA 5.4, obtêm-se:

$$F_{\text{tabelado } 0,95; 3; 7} = 4,35 \text{ (} F_{\text{tabelado da regressão/resíduo}} \text{)}$$

$$F_{\text{tabelado } 0,95; 5; 2} = 19,30 \text{ (} F_{\text{tabelado da falta de ajuste/ erro puro}} \text{)}$$

O valor de $F_{\text{calculado da falta de ajuste/ erro puro}}$ (4,02) deve ser menor que F_{tabelado} (19,30) e o valor de $F_{\text{calculado da regressão/ resíduos}}$ (10,68) deve ser maior que F_{tabelado} (4,35) para a construção da superfície de resposta.

Com a obtenção do modelo equacional, é possível visualizar os pontos do modelo codificado graficamente (FIGURA 5.1).

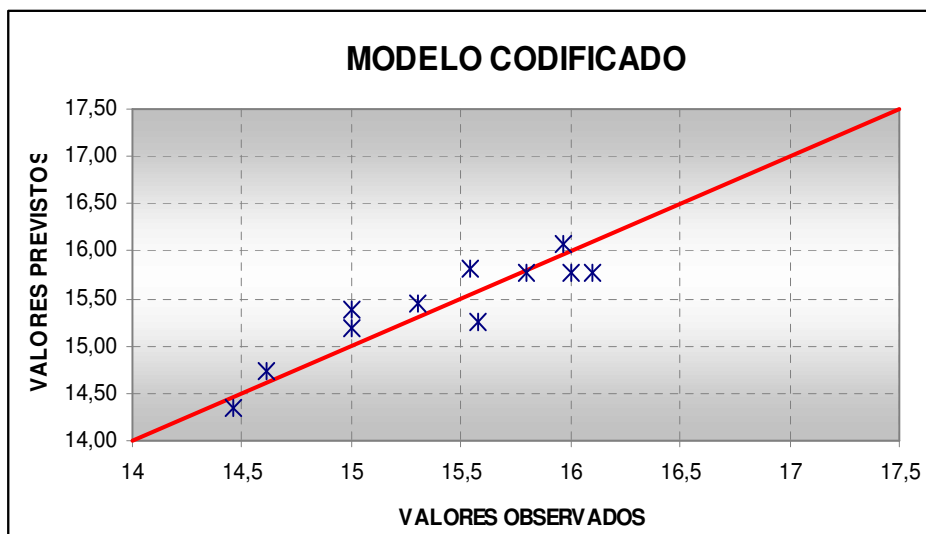


FIGURA 5.1- GRÁFICO COM OS PONTOS OBTIDOS ATRAVÉS DO MODELO EQUACIONAL CODIFICADO DO RENDIMENTO

Através dos valores de R e F e do gráfico obtido (pontos extremamente próximos da reta) pode-se verificar que o modelo codificado é satisfatório.

MODELO REAL:

Através do programa estatístico MINITAB se obtém o modelo equacional real, a partir do coeficiente de regressão apresentado na TABELA 5.5.

TABELA 5.5- COEFICIENTES DE REGRESSÃO DO MODELO REAL DO RENDIMENTO – SEM OS FATORES ELIMINADOS ($p > 0,05$) NO MODELO CODIFICADO

	COEFICIENTE DE REGRESSÃO
MÉDIA	15,7629
(1) TG (%) (L)	0,2266
TG (%) (Q)	-0,2426
(2) t (hora) (L)	0,1590

A partir dos valores dos coeficientes de regressão apresentados na TABELA 5.5, obteve-se o seguinte modelo equacional real:

$$Y = 15,7629 + 0,2266 X_1 + 0,1590 X_2 - 0,2426 X_1^2$$

Com a obtenção do modelo equacional, é possível visualizar os pontos do modelo real graficamente (FIGURA 5.2).

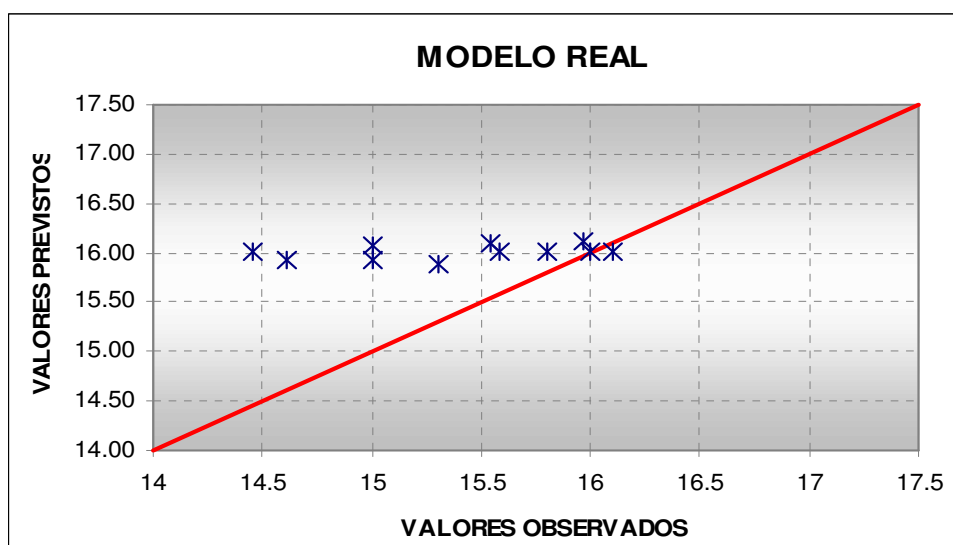


FIGURA 5.2- GRÁFICO COM OS PONTOS OBTIDOS ATRAVÉS DO MODELO EQUACIONAL REAL DO RENDIMENTO

Através do gráfico obtido (pontos próximos da reta) pode-se verificar que o modelo real é satisfatório, mas que o codificado está mais preciso que o real. Dessa forma o ideal é a utilização do modelo codificado.

Para obter a faixa da concentração de enzima TG e do tempo que resultará no maior rendimento da massa, são apresentados os gráficos de superfície de resposta e curvas de contorno nas FIGURAS 5.3 e 5.4. Com estes é possível realizar a otimização do projeto.

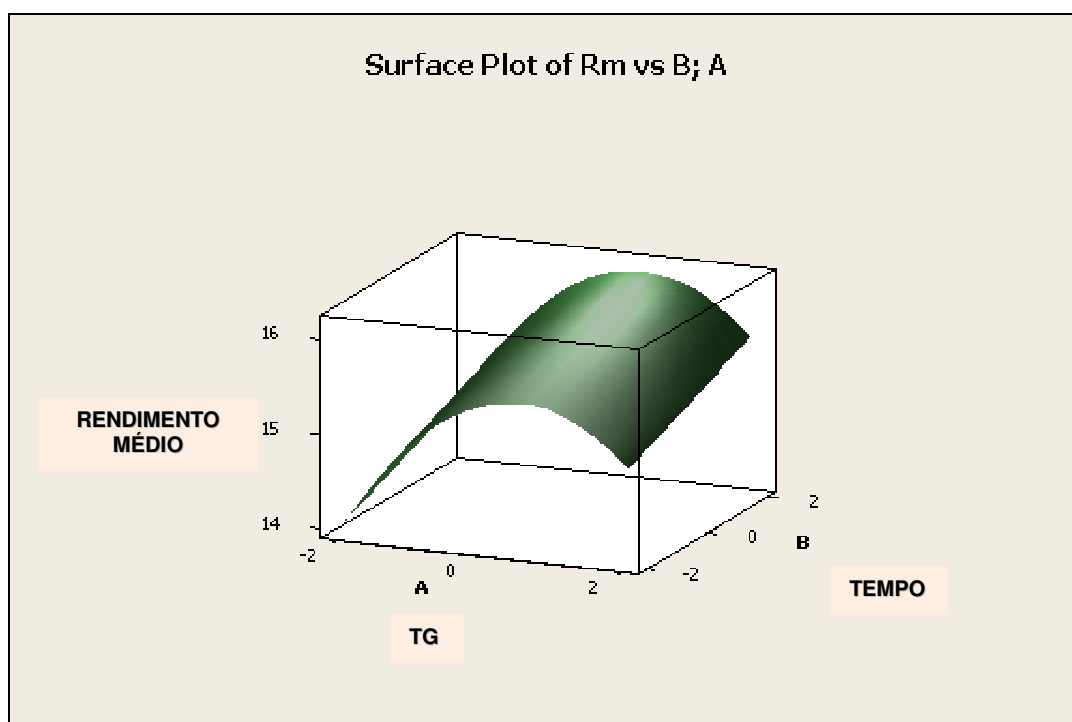


FIGURA 5.3- SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DO MODELO CODIFICADO DO RENDIMENTO

A FIGURA 5.3 apresenta o gráfico da superfície de resposta do rendimento médio obtido referente à relação entre a concentração de TG e o tempo de atuação da mesma.

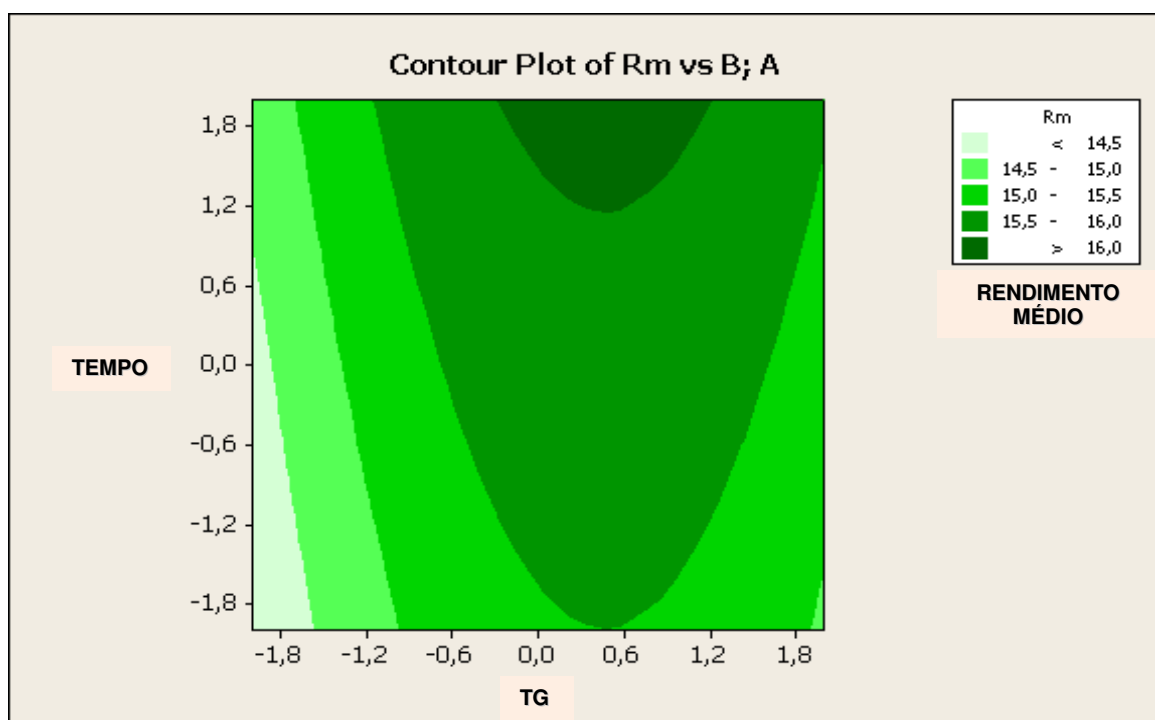


FIGURA 5.4- CURVAS DE CONTORNO DO MODELO CODIFICADO DO RENDIMENTO

Em ensaios realizados por FOLTRAN et al (2001), considerando o mesmo processo de fabricação que o utilizado neste estudo (acidificação direta com adição da TG antes do processo de coagulação), foi verificado que as condições ótimas para obtenção de um maior rendimento, no caso de 8,65%, foi a de 0,02% de TG em um tempo de atuação de 90 minutos.

No presente estudo, a partir das curvas de contorno (FIGURA 5.4), verifica-se que as faixas ótimas para obtenção de um maior rendimento ($> 16\%$) são de $-0,3$ a $1,2$ para a quantidade de TG e de $1,1$ a $2,0$ para o tempo necessário para a ótima atuação da TG. Estes pontos são, respectivamente, equivalentes a $0,019$ a $0,025\%$ de TG e a 104 a 120 minutos. Verifica-se que o rendimento é muito mais influenciado pela concentração da enzima do que pelo tempo de atuação, nos valores de $15,5\%$ a 16% de rendimento observa-se que o tempo não exerce influencia. Com estes dados, é possível realizar a combinação mais adequada para cada fabricante obtendo o máximo rendimento.

Para uma análise complementar do rendimento na FIGURA 5.5 é apresentado o comparativo dos rendimentos entre os modelos.

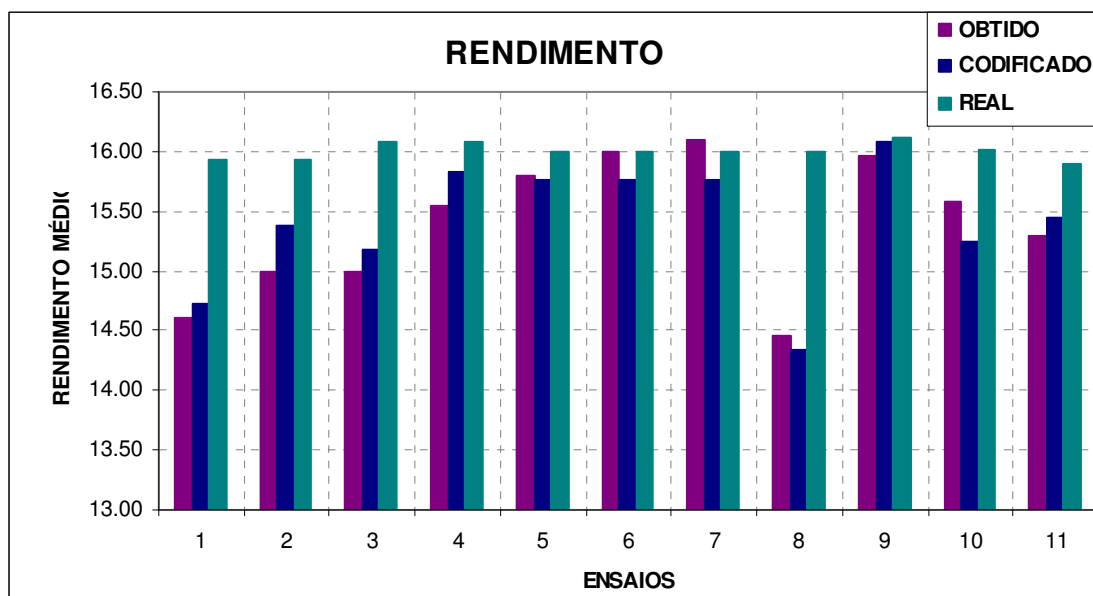


FIGURA 5.5- GRÁFICO COMPARATIVO DO RENDIMENTO MÉDIO OBTIDO EXPERIMENTALMENTE COM AS DOS MODELOS CODIFICADO E REAL

Neste gráfico verifica-se a variação do rendimento médio obtido experimentalmente nos diversos ensaios realizados, com os rendimentos fornecidos pelos modelos codificado e real.

Comparando o rendimento obtido, nas mesmas condições de 0,02% de TG e de 90 minutos de tempo de atuação, do estudo presente com o estudo de FOLTRAN et al (2001), neste estudo foi obtido um rendimento 86,13% maior.

Outros fatores de grande importância são os desvios obtidos entre os rendimentos, que é apresentado na FIGURA 5.6.

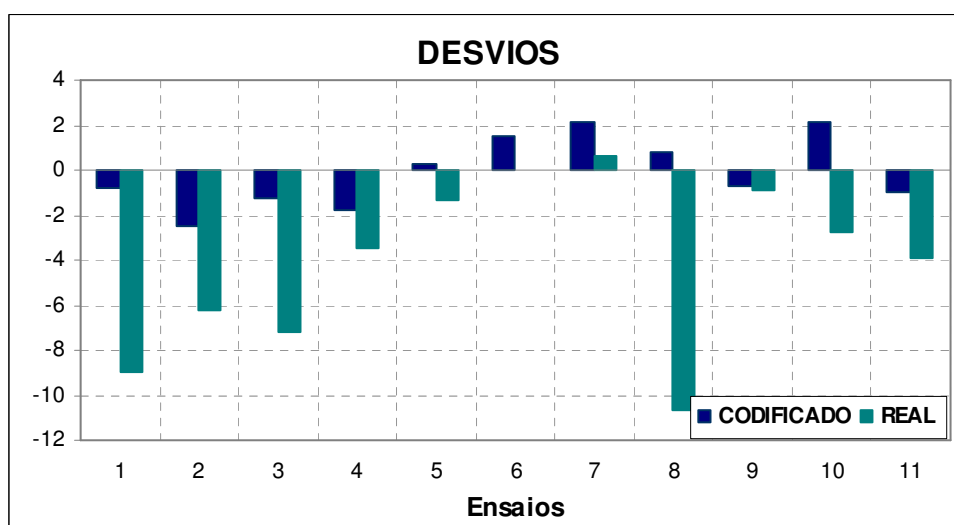


FIGURA 5.6- GRÁFICO COMPARATIVO DOS DESVIOS DO RENDIMENTO MÉDIO OBTIDO EXPERIMENTALMENTE COM AS DOS MODELOS CODIFICADO E REAL

Segundo BRUNS et al (1996) o ideal para se obter neste gráfico é um desvio pequeno onde o rendimento do produto é maior. Então, como o rendimento foi maior nos ensaios 5, 6, 7 e 9, os desvios nestes ensaios devem ser pequenos, o que pode ser verificado. Desvios grandes podem ser atribuídos a uma falha na execução de processo e/ou na realização das análises.

5.2. COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

O leite padronizado utilizado para o processo de fabricação do Requeijão Cremoso apresentou um pH de 6,7 e uma densidade média de 1,021 g/ mL.

Dentre as análises físico-químicas do requeijão, as análises de umidade e pH foram realizadas para todos os ensaios em triplicata e os resultados médios destas estão apresentados na TABELA 5.6.

TABELA 5.6- pH E UMIDADE DO REQUEIJÃO CREMOSO

ENSAIOS	pH MÉDIO	UMIDADE MÉDIA (%)
1	5,67 ± 0,04	64 ± 1
2	5,7 ± 0,1	65,2 ± 0,3
3	5,74 ± 0,08	64,6 ± 0,1
4	5,71 ± 0,06	65 ± 1
5	5,68 ± 0,08	64,7 ± 0,8
6	5,70 ± 0,01	65,85 ± 0,03
7	5,66 ± 0,04	65,8 ± 0,2
8	5,66 ± 0,08	65 ± 1
9	5,6 ± 0,1	66,1 ± 0,05
10	5,62 ± 0,01	63,9 ± 0,1
11	5,62 ± 0,07	65,0 ± 0,3
Padrão	5,69	62,8 ± 0,3

Os dados apresentados na TABELA 5.6 mostram que o pH dos requeijões obtidos com a adição da enzima transglutaminase apresentou-se praticamente o mesmo com uma pequena variabilidade, sendo a máxima de 0,14, o que está condizente com o processo, já que o pH foi ajustado, através da adição de leite e do sal emulsificante à massa coagulada, para não existir diferença significativa (TABELA 5.7). Importante ressaltar que os valores de pH encontraram-se dentro dos limites indicados na literatura (FERNANDES, 1981^a,

OLIVEIRA, 1986). De forma geral, pH abaixo de 5,4 provoca um aumento na firmeza do queijo e uma maior redução pode resultar na coagulação do produto. A medida que o pH aumenta, a consistência se torna menos viscosa. Queijo fundido de consistência firme deve ter $\text{pH} < 5,7$, enquanto que o queijo de consistência cremosa e suave deve ter $\text{pH} > 5,7$ (FERNANDES, 1981^a).

Quanto aos valores de umidade, observa-se que os ensaios 4, 6, 7 e 9 apresentaram um maior teor de umidade, apesar de não diferirem estatisticamente dos demais, o que era esperado já que a enzima transglutaminase, através da formação da rede tridimensional pela formação das ligações covalentes entre os aminoácidos glutamina e lisina, auxilia na retenção de água do produto. Verifica-se, que a umidade do padrão foi a menor comparando com os outros ensaios e apresentou-se diferença significativa ao nível de 5% dos requeijões produzidos com a adição da enzima transglutaminase indicando a maior retenção de água no produto (FIGURA 5.7).

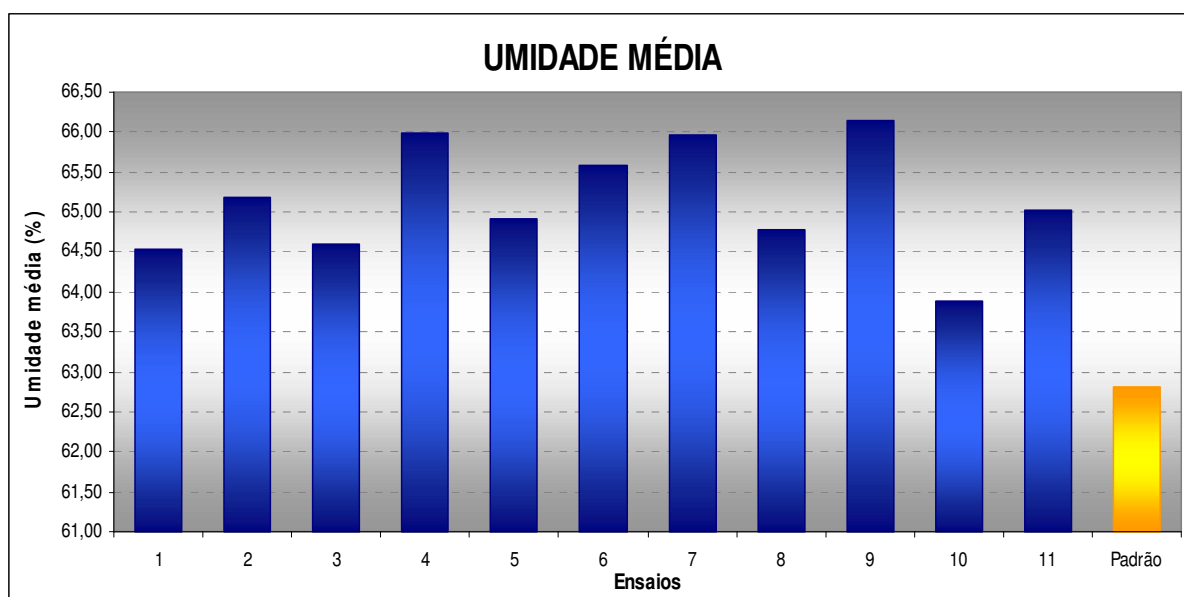


FIGURA 5.7- GRÁFICO COMPARATIVO DOS VALORES MÉDIOS DE UMIDADE

Para avaliar a composição físico-química dos requeijões, foram realizadas análises em triplicata para os ensaios 7 e Padrão. O ensaio 7 foi o escolhido dentre os outros, pois foi um dos que obteve maior rendimento. Dessa forma, é possível avaliar como a TG estará influenciando nas características do produto acima citado.

A TABELA 5.7 apresenta os valores das análises físico-químicas realizadas para o ensaio 7 e ensaio padrão.

TABELA 5.7- COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS ENSAIOS 7 E PADRÃO

ENSAIOS	UMIDADE MÉDIA (%)	PROTEÍNA MÉDIA (%)	GORDURA MÉDIA (%)	CINZAS MÉDIA (%)	CÁLCIO MÉDIA (%)	EST (%)	GES (%)	CARBOIDRATO (%)
7	65,8 ± 0,3 ^a	10,6 ± 0,30 ^a	14,7 ± 0,0 ^a	2,7 ± 0,4 ^a	0,43 ± 0,05 ^a	34,2	43,0	5,77 ^a
Padrão	62,8 ± 0,3 ^b	12,2 ± 0,2 ^b	16,5 ± 0,0 ^b	2,86 ± 0,04 ^a	0,6 ± 0,3 ^a	37,2	44,3	5,64 ^a

Médias seguidas de uma mesma letra na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade ($p > 0,05$) pelo teste F.

Por conter um maior teor de umidade, o requeijão produzido no ensaio 7 apresentou menores teores de proteína, gordura do que o obtido com o requeijão produzido pelo método tradicional, diferindo estatisticamente ao nível de 5%.

Estudos anteriores realizados por SILVA (2003) em requeijão cremoso tradicional obtido pelo processo de acidificação direta, apresentaram compatibilidade quanto aos resultados obtidos na TABELA 5.8 de umidade, proteína e cinzas, mas quanto aos resultados de gordura e cálcio, o estudo atual apresentou respectivamente teores 40% e 73% maior quando comparado com o estudo de SILVA (2003).

5.2.1. Análise de Textura

Após a obtenção do produto final, requeijão cremoso, foram realizadas as seguintes análises de textura: Análise do perfil de textura (TPA) e Ruptura.

5.2.1.2. TPA

Na análise do perfil de textura, obtêm-se os atributos de Firmeza, Adesividade, Coesividade, Elasticidade, Gomosidade e Mastigabilidade do produto final. Os resultados obtidos da análise TPA são apresentados na TABELA 5.8.

TABELA 5.8- ANÁLISE DO PERFIL DE TEXTURA: TPA

Ensaio	Firmeza(N) média	Adesividade(N.s) média	Coesividade média	Elasticidade média	Gomosidade média	Mastigabilidade média
1	0,3 ± 0,1 ^a	-0,146 ± 0,004 ^a	0,73 ± 0,04 ^a	1,00 ± 0,03 ^a	0,2 ± 0,1 ^a	0,2 ± 0,1 ^a
2	0,23 ± 0,01 ^a	-0,3 ± 0,1 ^a	0,688 ± 0,009 ^a	0,993 ± 0,003 ^a	0,16 ± 0,01 ^a	0,16 ± 0,1 ^a
3	0,206 ± 0,007 ^a	-0,217 ± 0,004 ^a	0,69 ± 0,03 ^a	1,003 ± 0,004 ^a	0,142 ± 0,002 ^a	0,142 ± 0,003 ^a
4	0,22 ± 0,01 ^a	-0,2 ± 0,1 ^a	0,7 ± 0,1 ^a	0,992 ± 0,004 ^a	0,14 ± 0,01 ^a	0,14 ± 0,01 ^a
5	0,2 ± 0,2 ^a	-0,2 ± 0,1 ^a	0,67 ± 0,01 ^a	1,2 ± 0,2 ^a	0,14 ± 0,02 ^a	0,14 ± 0,01 ^a
6	0,18 ± 0,03 ^a	-0,18 ± 0,04 ^a	0,7 ± 0,2 ^a	1,06 ± 0,08 ^a	0,12 ± 0,02 ^a	0,134 ± 0,003 ^a
7	0,24 ± 0,02 ^a	-0,52 ± 0,06 ^a	0,737 ± 0,004 ^a	1,03 ± 0,07 ^a	0,17 ± 0,02 ^a	0,17 ± 0,02 ^a
8	0,25 ± 0,02 ^a	-0,4 ± 0,1 ^a	0,73 ± 0,02 ^a	0,990 ± 0,008 ^a	0,18 ± 0,02 ^a	0,18 ± 0,02 ^a
9	0,298 ± 0,008 ^a	-0,64 ± 0,02 ^a	0,68 ± 0,01 ^a	1,1 ± 0,2 ^a	0,16 ± 0,05 ^a	0,18 ± 0,03 ^a
10	0,28 ± 0,07 ^a	-0,6 ± 0,02 ^a	0,69 ± 0,02 ^a	0,98 ± 0,01 ^a	0,19 ± 0,04 ^a	0,19 ± 0,04 ^a
11	0,19 ± 0,01 ^a	-0,263 ± 0,004 ^a	0,71 ± 0,04 ^a	1,06 ± 0,09 ^a	0,14 ± 0,01 ^a	0,146 ± 0,003 ^a
Padrão	0,53 ± 0,03 ^b	-2,04 ± 0,02 ^b	0,788 ± 0,002 ^a	0,981 ± 0,002 ^a	0,42 ± 0,02 ^b	0,41 ± 0,02 ^b

Médias seguidas de uma mesma letra na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade ($p > 0,05$) pelo teste F.

A partir dos resultados obtidos na análise de variância (ANOVA) verifica-se que não existe diferença significativa ao nível de 5% de significância entre os requeijões com relação aos atributos avaliados. A existência de diferença significativa foi observada nos atributos como Firmeza, Adesividade, Gomosidade e Mastigabilidade, quando comparado aos Ensaio com a utilização da TG e o Padrão sem a utilização de TG.

Segundo OLIVEIRA (2003), não existiu diferença significativa ao nível de 5% de significância dos requeijões com e sem TG em relação à avaliação do perfil de textura, mas verificou-se que durante o período de estocagem dos requeijões com TG, a gomosidade aumentou e a adesividade, a coesividade e a elasticidade diminuíram.

Para melhor visualização do resultado da análise do perfil de textura, os atributos e sua variabilidade são apresentados nas FIGURAS 5.8 (firmeza), 5.9 (adesividade), 5.10 (coesividade), 5.11 (elasticidade), 5.12 (gomosidade) e 5.13 (mastigabilidade).

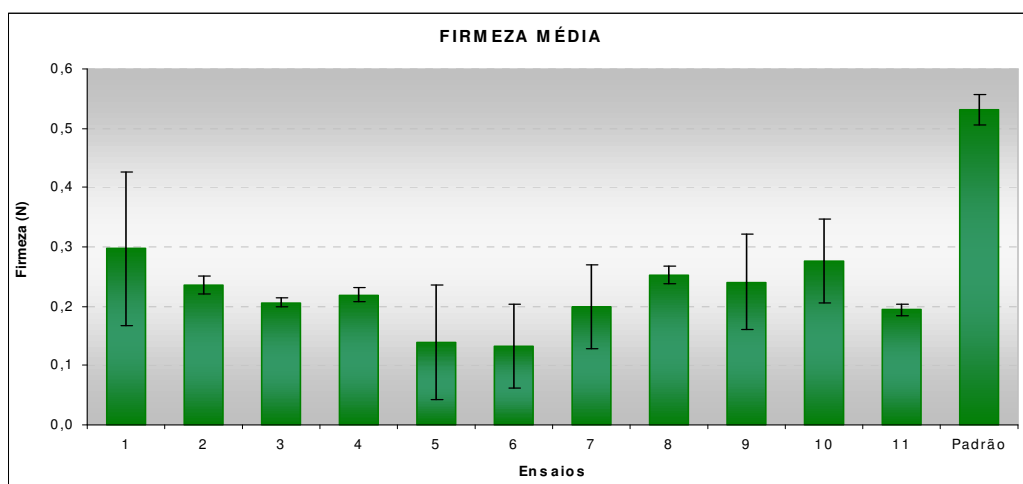


FIGURA 5.8- GRÁFICO COMPARATIVO DOS VALORES MÉDIOS DE FIRMEZA

Verifica-se na FIGURA 5.8 que o ensaio Padrão, sem TG, obteve maior firmeza e na FIGURA 5.7 que o mesmo possui menor umidade, dessa forma, conclui-se que o teor de umidade influencia na firmeza do produto.

Por outro lado, OLSON & PRICE (1961) avaliando o efeito que alguns componentes de queijos processados exercem sobre a firmeza, verificaram que embora o aumento do conteúdo de umidade diminua consideravelmente a firmeza, o teor de gordura, parece influenciar muito pouco tal propriedade.

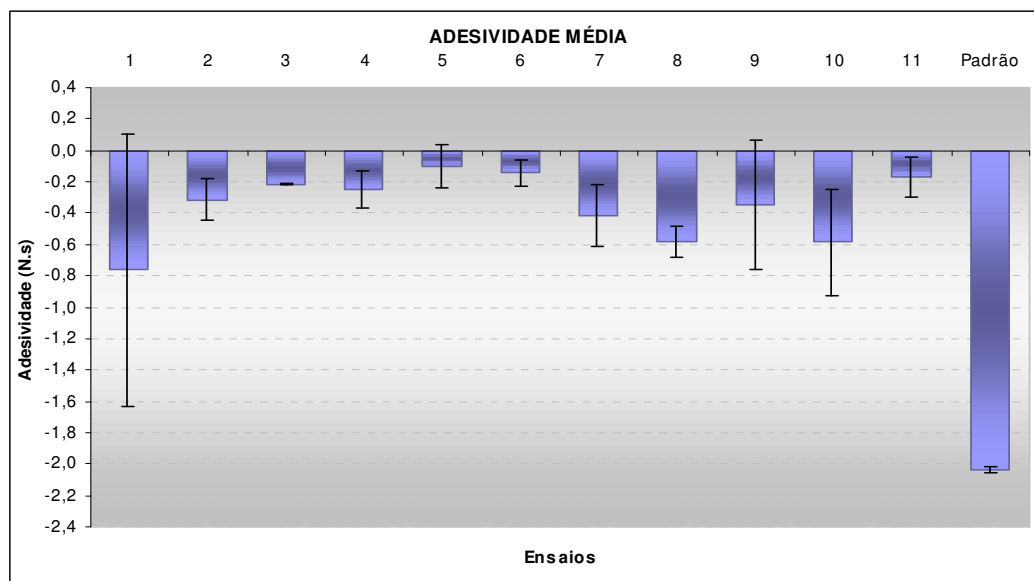


FIGURA 5.9- GRÁFICO COMPARATIVO DOS VALORES MÉDIOS DE ADESIVIDADE

Verifica-se na FIGURA 5.9 que o ensaio padrão, sem TG, foi o que obteve maior adesividade, portanto conclui-se que quanto maior o teor de umidade menor a adesividade do produto final.

Comparando valores médios de adesividade encontrados na TABELA 5.8 com os valores de adesividade obtidos por RAPACCI (1997), verificou-se que de uma maneira geral, os requeijões obtidos no presente trabalho obtiveram menor adesividade que os obtidos pelo autor acima descrito.

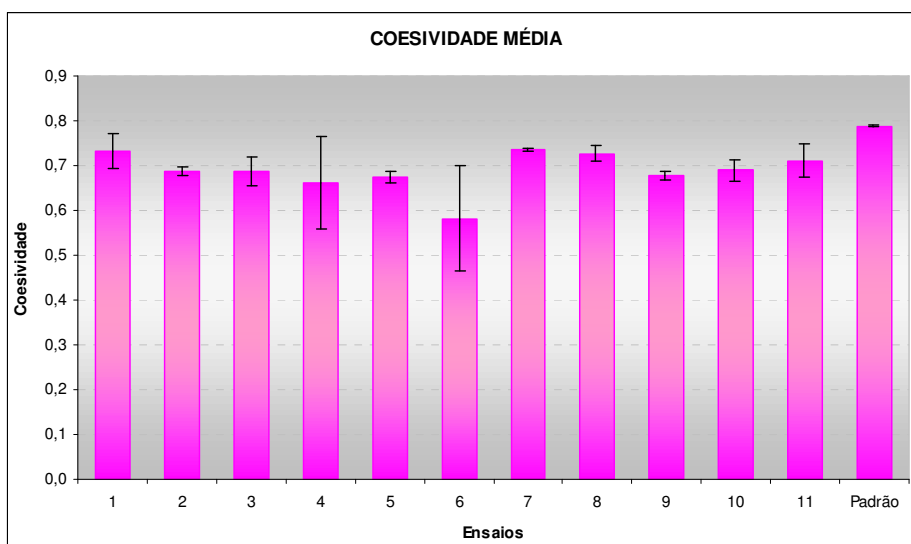


FIGURA 5.10- GRÁFICO COMPARATIVO DOS VALORES MÉDIOS DE COESIVIDADE

No caso do atributo coesividade, verifica-se através da correlação das FIGURAS 5.10 e 5.7, que o teor de umidade não interfere significativamente no valor da coesividade do produto final.

Comparando os valores médios de coesividade encontrados na TABELA 5.8 com os valores de coesividade obtidos por RAPACCI (1997), verificou-se que os produtos obtidos apresentaram valores muito similares entre si.

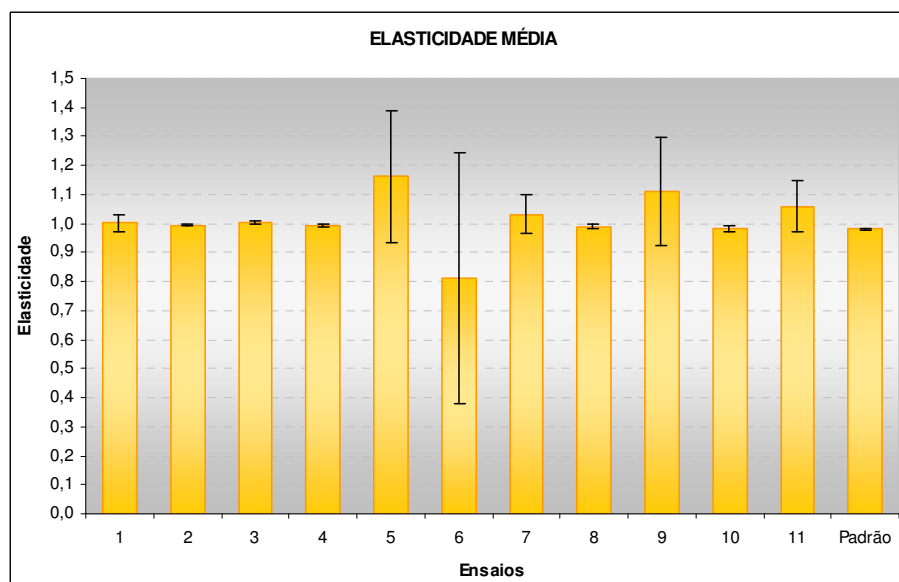


FIGURA 5.11- GRÁFICO COMPARATIVO DOS VALORES MÉDIOS DE ELASTICIDADE

No caso do atributo elasticidade, verifica-se através da correlação das FIGURAS 5.10 e 5.7, que o teor de umidade não interfere significativamente no valor da elasticidade do produto final. Comparando os valores médios de elasticidade encontrados na TABELA 5.8

com os valores de elasticidade obtidos por RAPACCI (1997), verificou-se que os produtos obtidos apresentaram valores muito similares entre si.

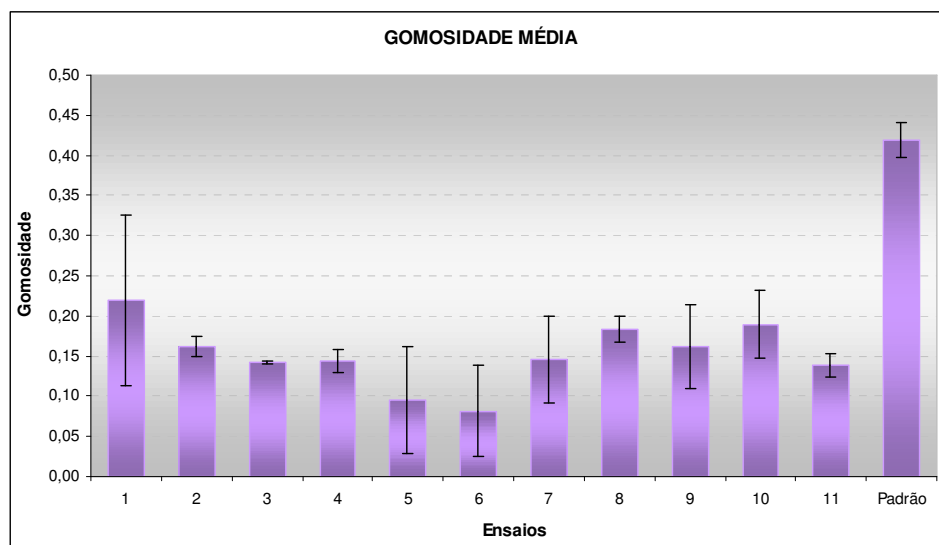


FIGURA 5.12- GRÁFICO COMPARATIVO DOS VALORES MÉDIOS DE GOMOSIDADE

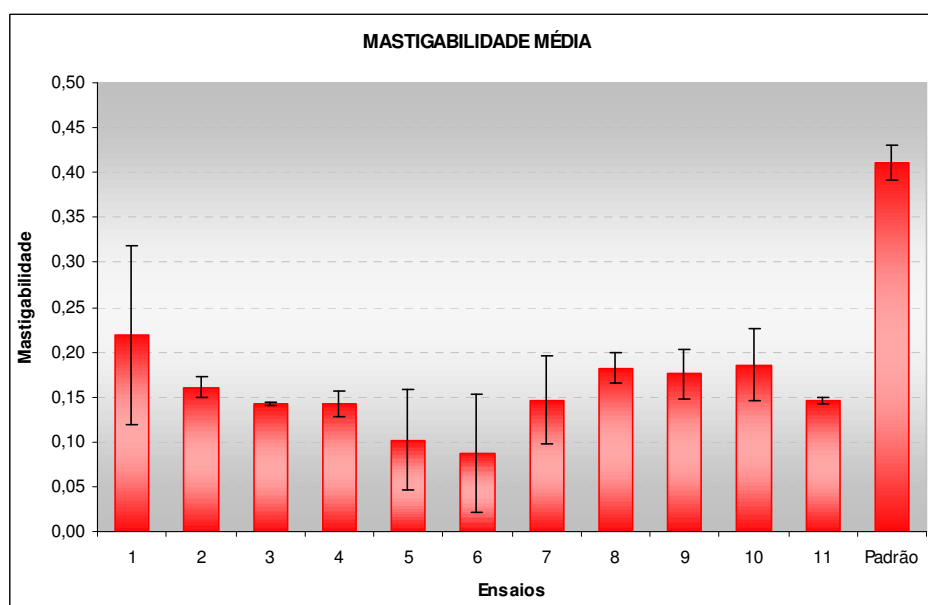


FIGURA 5.13-GRÁFICO COMPARATIVO DOS VALORES MÉDIOS DE MASTIGABILIDADE

Verificam-se nas FIGURAS 5.12 e 5.13 que o ensaio padrão, sem TG, foi o que obteve maior gomosidade e mastigabilidade, portanto conclui-se que quanto maior o teor de umidade menor a gomosidade e mastigabilidade do produto final.

5.2.1.2. Ruptura

Esta análise fornece como resultado os valores de Força de ruptura máxima do produto e qual a distância percorrida pelo probe do equipamento para que ocorresse essa ruptura. A relação entre a Força máxima e a Distância fornece a viscoelasticidade do produto final. Os dados relativos a estas medidas são apresentados na TABELA 5.9.

TABELA 5.9- ANÁLISE DE TEXTURA: RUPTURA – F X D X F/D

Ensaio	Fmax (N)	D (mm)	F/D
1	6.487	3.002	2.161
2	11.215	3.221	3.482
3	9.435	2.941	3.208
4	5.443	2.545	2.139
5	10.040	3.015	3.330
6	11.299	3.383	3.340
7	12.343	3.292	3.750
8	9.022	3.597	2.508
9	9.999	3.247	3.080
10	9.001	3.576	2.517
11	6.067	3.260	1.861
Padrão	20.406	3.120	6.540

Quanto maior for a Força máxima apresentada na TABELA 5.9, mais viscoso será o requeijão e quanto maior a distância percorrida mais elástico será o requeijão. Portanto, a relação F/D fornece a viscoelasticidade do produto. Dessa forma, quanto maior o valor da relação F/D mais viscoso e menos elástico será o produto final e quanto menor for o valor da relação F/D menos viscoso e mais elástico será o produto final. Assim, analisando a TABELA 5.9, conclui-se que os ensaios com a adição de TG resultaram em produtos menos viscosos que o ensaio Padrão, sem TG, e muito similares em relação à elasticidade como pode ser verificado, também, na FIGURA 5.11.

Através da análise estatística (ANOVA) verifica-se que existe diferença significativa ao nível de 5% de significância entre os valores de Força Máxima e entre os valores da relação F/D mas, não existe diferença significativa entre os valores de D. Assim, para a análise destes dados foi realizado o Planejamento Experimental, fatorial 2^2 e, para isto, utilizou-se o programa estatístico, MINITAB, para a obtenção dos coeficientes de regressão (TABELAS 5.10, 5.11 e 5.13), dos modelos equacionais, da análise do modelo através da ANOVA (TABELA 5.12) e cálculo dos desvios e então, verificar qual a melhor relação de adição de TG e tempo de atuação para este dado especificamente. Este Planejamento foi realizado para os resultados compilados da relação entre Força máxima e Distância (F/D) encontrados na TABELA 5.9, que traduz o planejamento de F, incluindo a variável D.

FORÇA MÁXIMA/ DISTÂNCIA (F/D):**MODELO CODIFICADO:**

TABELA 5.10- COEFICIENTES DE REGRESSÃO DO MODELO CODIFICADO DE F/D

	COEFICIENTE DE REGRESSÃO	DESVIO PADRÃO	T	P
MÉDIA	3.4110	0.11217	30.409	0.000
(1) TG (%) (L)	0.0331	0.06869	0.482	0.650
TG (%) (Q)	-0.5032	0.08176	-6.155	0.002
(2) t (hora) (L)	-0.1555	0.06869	-2.264	0.073
t (hora) (Q)	-0.0522	0.08176	-0.639	0.551
1 (L) x 2 (L)	-0.5976	0.09714	-6.151	0.002

Deve-se eliminar os fatores onde $p > 0,05$, pois estes termos do modelo não são estatisticamente significativos. Quanto menor o P melhor o coeficiente de regressão. Dessa forma, se elimina o seguinte fator:

t quadrático (Q)

Na TABELA 5.11 são apresentados os coeficientes de regressão sem os fatores que foram eliminados.

TABELA 5.11- COEFICIENTES DE REGRESSÃO DO MODELO CODIFICADO DE F/D – SEM O FATOR ELIMINADO ($p > 0,05$)

	COEFICIENTE DE REGRESSÃO	DESVIO PADRÃO	T	P
MÉDIA	3.3619	0.07749	43.385	0.000
(1) TG (%) (L)	0.0331	0.06522	0.508	0.630
TG (%) (Q)	-0.4879	0.07419	-6.576	0.001
(2) t (hora) (L)	-0.1555	0.06522	-2.384	0.054
1 (L) x 2 (L)	-0.5976	0.09223	-6.479	0.001

A partir dos valores dos coeficientes de regressão apresentados na TABELA 5.11, obteve-se o seguinte modelo equacional codificado:

$$Y = 3,3619 + 0,0331 X_1 - 0,1555 X_2 - 0,4879 X_1^2 - 0,5976 X_1 * X_2$$

Para se obter a amplitude do modelo foi realizada a análise de variância e os resultados obtidos são apresentados na TABELA 5.12.

TABELA 5.12- ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO MODELO CODIFICADO DE F/D

Fonte de Variação	SQ	gl	MQ	F	p
Regressão	3,10188	4	0,77547	22,79	0,001
Linear	0,20223	2	0,10111	2,97	0,127
Quadrático	1,47127	1	1,47127	43,24	0,001
Interação	1,42838	1	1,42838	41,98	0,001
Erro Residual	0,20415	6	0,03403		
Falta de Ajuste	0,16936	4	0,04234	2,43	0,312
Erro Puro	0,03479	2	0,0174		
Total	3,30603	10			

A partir dos resultados obtidos na ANOVA (TABELA 5.12) obteve-se a seguinte amplitude do modelo:

$$R^2 = \text{SQ}_{\text{regressão}} / \text{SQ}_{\text{Total}}$$

$$R^2 = 0,94$$

$$R = 0,97$$

A amplitude do modelo foi de 0,97, o que mostra que é um modelo muito bom e preciso.

Através dos valores de distribuição de F ao nível de 0,05 juntamente com os graus de liberdade (gl) apresentados na TABELA 5.12, obtêm-se:

$$F_{\text{tabelado } 0,95; 3; 7} = 4,12 \text{ (} F_{\text{tabelado da regressão/resíduo}} \text{)}$$

$$F_{\text{tabelado } 0,95; 4; 2} = 19,25 \text{ (} F_{\text{tabelado da falta de ajuste/ erro puro}} \text{)}$$

O valor de $F_{\text{calculado da falta de ajuste/ erro puro}}$ (2,43) deve ser menor que F_{tabelado} (19,25) e o valor de $F_{\text{calculado da regressão/ resíduos}}$ (22,79) deve ser maior que F_{tabelado} (4,12) para construção da superfície de resposta.

Com a obtenção do modelo equacional, é possível visualizar os pontos do modelo codificado graficamente (FIGURA 5.14).

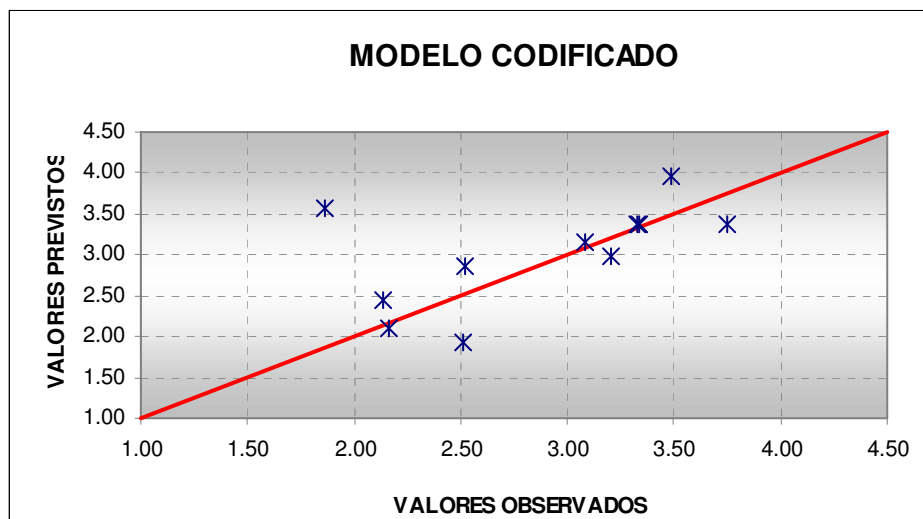


FIGURA 5.14- GRÁFICO COM OS PONTOS OBTIDOS ATRAVÉS DO MODELO EQUACIONAL CODIFICADO DE F/D

Através dos valores de R e F e do gráfico obtido (pontos bem próximos da reta) pode-se verificar que o modelo codificado é satisfatório.

MODELO REAL:

Através do programa estatístico MINITAB obtém-se o modelo equacional real, a partir do coeficiente de regressão apresentado na TABELA 5.13.

TABELA 5.13- COEFICIENTES DE REGRESSÃO DO MODELO REAL DE F/D – SEM O FATOR ELIMINADO ($p > 0,05$) NO MODELO CODIFICADO

	COEFICIENTE DE REGRESSÃO
MÉDIA	3.3619
(1) TG (%) (L)	0.0234
TG (%) (Q)	-0.2439
(2) t (hora) (L)	-0.1100
1 (L) x 2 (L)	-0.2988

A partir dos valores dos coeficientes de regressão apresentados na TABELA 5.13, obteve-se o seguinte modelo equacional:

$$Y = 3,3619 + 0,0234 X_1 - 0,11 X_2 - 0,2439 X_1^2 - 0,2988 X_1 * X_2$$

Com a obtenção do modelo equacional, é possível visualizar os pontos do modelo real graficamente (FIGURA 5.15).

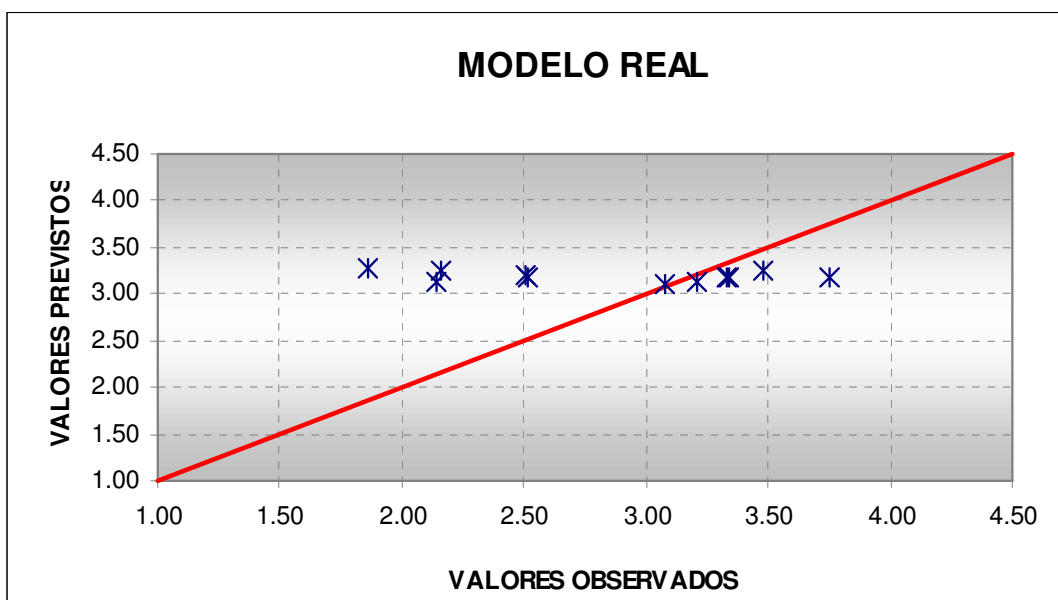


FIGURA 5.15- GRÁFICO COM OS PONTOS OBTIDOS ATRAVÉS DO MODELO EQUACIONAL REAL DE F/D

Através do gráfico obtido (pontos próximos da reta) pode-se verificar que o modelo real é satisfatório, mas que o codificado está mais preciso que o real. Dessa forma o ideal é a utilização do modelo codificado.

Para obter a faixa da concentração de enzima TG e do tempo de atuação que resultará na maior viscoelasticidade do requeijão, ou seja, maior Força / Distância de ruptura, são apresentados os gráficos de superfície de resposta e curvas de contorno nas FIGURAS 5.16 e 5.17. Com estes é possível realizar a otimização do projeto.

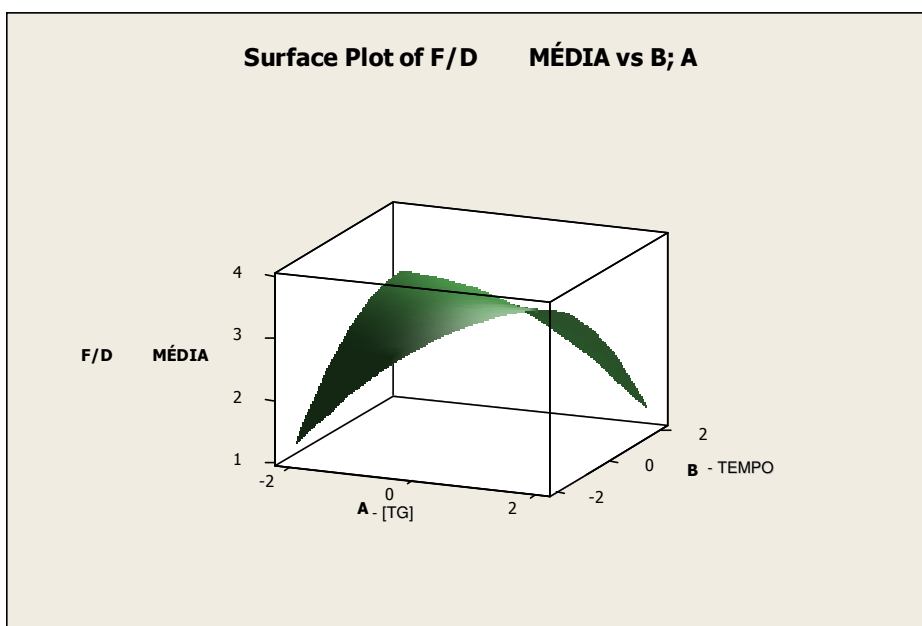


FIGURA 5.16- SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DO MODELO CODIFICADO DE F/D

A figura 5.16 apresenta o gráfico da superfície de resposta da Força máxima/ Distância de ruptura do produto obtido referente à relação entre a concentração de TG e o tempo de atuação da mesma.

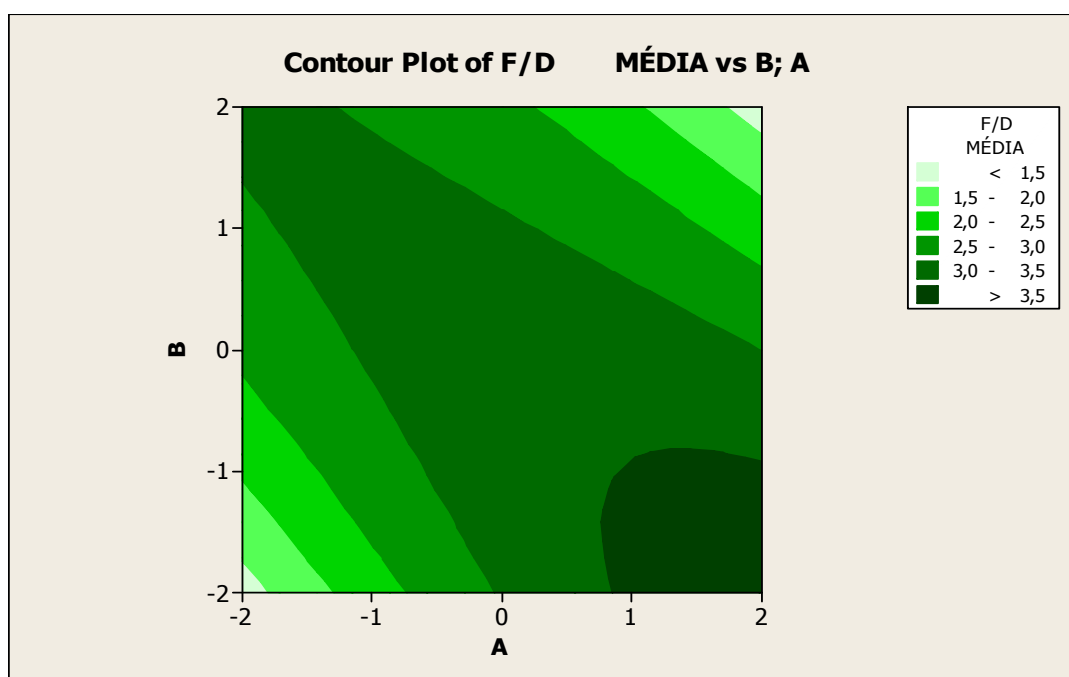


FIGURA 5.17- CURVAS DE GRÁFICO DO CONTOURO DO MODELO CODIFICADO DE F/D

A partir do gráfico de curvas de contorno apresentado na FIGURA 5.17 verifica-se que os valores de TG e tempo para obtenção de maior viscoelasticidade estão dentro a faixa de 0,023 a 0,034% de adição de TG por um tempo de atuação de 50 a 62 minutos, aproximadamente. Verifica-se que a viscoelasticidade, assim como o rendimento, é muito

mais influenciado pela concentração da enzima do que pelo tempo de atuação, nos valores de 3,0 a 3,5 de viscoelasticidade observa-se que o tempo não exerce influencia. Com estes dados, é possível realizar a combinação mais adequada para obtenção do grau de viscoelasticidade desejado por cada fabricante.

Para uma análise complementar de viscoelasticidade, na FIGURA 5.18 é apresentado o comparativo da viscoelasticidade (F/D) dos modelos.

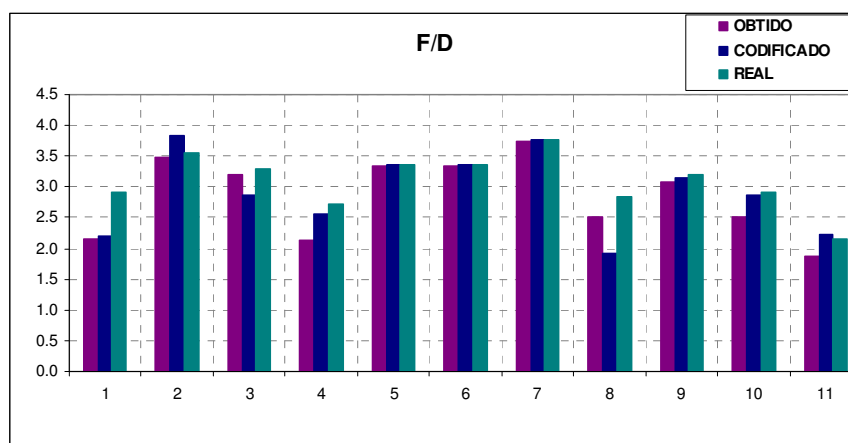


FIGURA 5.18- GRÁFICO COMPARATIVO DOS VALORES DE F/D OBTIDOS EXPERIMENTALMENTE COM AS DOS MODELOS CODIFICADO E REAL

Neste gráfico verifica-se a variação da viscoelasticidade, relação F/D, obtida experimentalmente nos diversos ensaios realizados, com os valores de viscoelasticidade fornecidos pelos modelos codificado e real. Pode-se observar, que nos pontos centrais, ensaios 5 a 7, a variação entre os valores dos modelos é praticamente nula, o que mostra a validade do estudo. Pode-se notar, também, que os pontos centrais 5, 6 e 7 e o ensaio 2 são os que forneceram a maior viscoelasticidade.

Outros fatores de grande importância são os desvios obtidos entre os resultados obtidos experimentalmente e através dos modelos, que é apresentado na FIGURA 5.19.

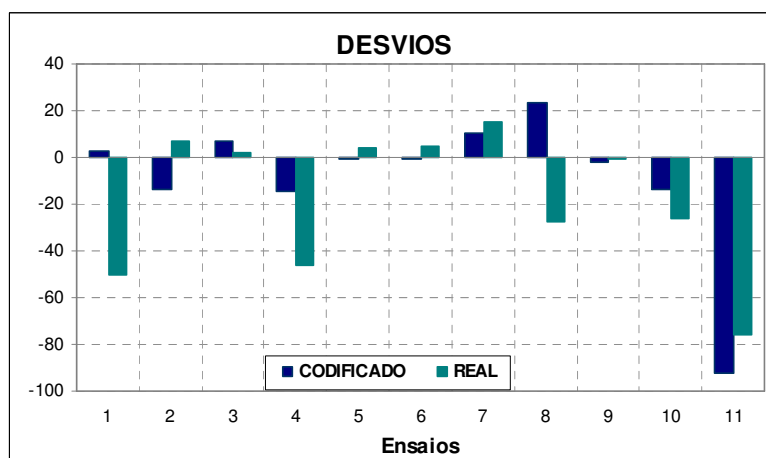


FIGURA 5.19- GRÁFICO COMPARATIVO DOS DESVIOS DOS VALORES DE F/D OBTIDO EXPERIMENTALMENTE COM AS DOS MODELOS CODIFICADO E REAL

Segundo BRUNS et al (1996) o ideal para se obter neste gráfico é um desvio pequeno onde a viscoelasticidade do produto for a desejada. Neste caso, o ideal seria utilizar os ensaios 5, 6, 7 ou 9, pois foram os que obtiveram os menores desvios. Estes ensaios foram os que resultaram em uma maior viscoelasticidade, com exceção do ensaio 9, do requeijão. Importante ressaltar, que o Padrão, sem TG, foi o que obteve maior viscoelasticidade em relação aos demais ensaios (TABELA 5.9).

Comparando com os dados do rendimento (TABELA 5.1), conclui-se que os ensaios 5, 6 e 7 (pontos centrais) são os que obtiveram maior rendimento e maior viscoelasticidade. Mesmo os produtos que possuem maior teor de umidade e teoricamente menor viscosidade, as ligações covalentes entre proteínas formadas pela TG, fortaleceram a estrutura do produto final, resultando em uma maior viscoelasticidade.

Segundo DICKINSON e YAMAMOTO (1996) a combinação do tratamento enzimático e calor é efetivo na formação de géis elásticos e fortes. Esses efeitos podem ser justificados pela união mais intensa e estável das proteínas ligadas pela enzima. IMM et al (2000) observaram que géis tratados com TG apresentam uma rede protéica mais densa e ordenada, com maior dureza.

5.2.2. Viscosidade

Após a obtenção dos requeijões, foram realizadas as análises de viscosidade dos produtos. Abaixo, pode-se observar a avaliação das análises de reometria rotacional, ou seja, o comportamento reológico referente à viscosidade dos requeijões.

Na TABELA 5.14 são apresentados os valores das constantes reológicas obtidas por reometria rotacional convencional. Dentre as constantes reológicas, K indica a viscosidade aparente do produto e n é o coeficiente que indica a intensidade com que o fluido é Newtoniano.

TABELA 5.14- PARÂMETROS REOLÓGICOS DO REQUEIJÃO CREMOSO OBTIDO POR REOMETRIA ROTACIONAL CONVENCIONAL A 60 °C.

Ensaio	60°C	
	K (Pa.s)	n
1	5.368	1.266
2	5.341	1.182
3	6.102	1.189
4	5.672	1.169
5	5.925	1.026
6	5.757	0.977
7	5.997	0.876
8	5.541	1.279
9	6.009	1.118
10	5.572	1.326
11	5.680	0.911
Padrão	5.749	0.867

Comparando os valores médios de K e n obtidos no presente trabalho com os obtidos por BARONI et al (1999), verificou-se que os valores de K e n obtidos neste estudo foram maiores que os obtidos pelo autor para produtos de mercado. Esse comportamento pode ser atribuído a diferenças durante a execução das análises físicas.

Através da análise estatística (ANOVA) verifica-se que existe diferença significativa ao nível de 5% de significância entre os valores do coeficiente n, mas não existe diferença significativa entre os valores de K.

Como não se obteve diferença significativa entre o coeficiente K pode-se afirmar que a adição de diferentes concentrações de TG e a utilização de diferentes tempos de atuação da enzima não afetou a consistência, ou seja, a viscosidade aparente do produto de forma significativa.

Importante ressaltar que o coeficiente n indica o quão Newtoniano é este fluido, através da lei da potência e tem-se que $n < 1$ o fluido é pseudoplástico e $n > 1$ é um fluido dilatante e $n = 1$ o fluido é Newtoniano; quanto mais próximo de 1 maior o *mouthfulness*, ou seja, maior a sensação do produto na boca. Assim, para análise deste dado (n) foi realizado o Planejamento Experimental, fatorial 2^2 e, para isto, utilizou-se o programa estatístico, MINITAB, para a obtenção dos coeficientes de regressão (TABELAS 5.15 e 5.17), dos modelos equacionais, da análise do modelo através da ANOVA (TABELA 5.16) e cálculo dos desvios e então, verificar qual a melhor relação de adição de TG e tempo de atuação para este dado especificamente.

COEFICIENTE n:

MODELO CODIFICADO:

TABELA 5.15- COEFICIENTES DE REGRESSÃO DO MODELO CODIFICADO DE n

	COEFICIENTE DE REGRESSÃO	DESVIO PADRÃO	T	P
MÉDIA	0.9598	0.04992	19.229	0.000
(1) TG (%) (L)	-0.0046	0.03057	-0.151	0.886
TG (%) (Q)	0.1821	0.03638	5.005	0.004
(2) t (hora) (L)	0.0252	0.03057	0.823	0.448
t (hora) (Q)	0.0382	0.03638	1.049	0.342
1 (L) x 2 (L)	0.0158	0.04323	0.366	0.730

Apesar de ser uma regra eliminar os fatores onde $p > 0,05$, neste caso não foi eliminado, pois quando eliminados, ocorre uma queda no valor do ajuste matemático.

A partir dos valores dos coeficientes de regressão apresentados na TABELA 5.15 obteve-se o seguinte modelo equacional codificado:

$$Y = 0,9598 - 0,0046 X_1 + 0,0252 X_2 + 0,1821 X_1^2 + 0,0382 X_2^2 + 0,0158 X_1 * X_2$$

Para se obter a amplitude do modelo foi realizada a análise de variância e os resultados obtidos são apresentados na TABELA 5.16.

TABELA 5.16- ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO MODELO CODIFICADO DE n

Fonte de Variação	SQ	gl	MQ	F	p
Regressão	0,194938	5	0,038988	5,22	0,047
Linear	0,005238	2	0,002619	0,35	0,720
Quadrático	0,1887	2	0,09435	12,62	0,011
Interação	0,000999	1	0,000999	0,13	0,730
Erro Residual	0,037373	5	0,07475		
Falta de Ajuste	0,025652	3	0,008551	1,46	0,431
Erro Puro	0,011721	2	0,005861		
Total	0,232311	10			

A partir dos resultados obtidos na ANOVA (TABELA 5.16) obteve-se amplitude do modelo:

$$R^2 = \frac{SQ_{\text{regressão}}}{SQ_{\text{Total}}}$$

$$R^2 = 0,84$$

$$R = 0,92$$

A amplitude do modelo foi de 0,92, o que mostra que é um modelo muito bom e preciso.

Através dos valores de distribuição de F ao nível de 0,05, juntamente com os graus de liberdade (gl) apresentados na TABELA 5.16, obtêm-se:

$$F_{\text{tabelado } 0,95; 5; 5} = 5,05 \text{ (} F_{\text{tabelado da regressão/resíduo}} \text{)}$$

$$F_{\text{tabelado } 0,95; 5; 2} = 19,16 \text{ (} F_{\text{tabelado da falta de ajuste/ erro puro}} \text{)}$$

O valor de $F_{\text{calculado da falta de ajuste/ erro puro}}$ (1,46) deve ser menor que F_{tabelado} (19,16) e o valor de $F_{\text{calculado da regressão/ resíduos}}$ (5,22) deve ser maior que F_{tabelado} (5,05) para construção da superfície de resposta.

Com a obtenção do modelo equacional, é possível visualizar os pontos do modelo codificado graficamente (FIGURA 5.20).

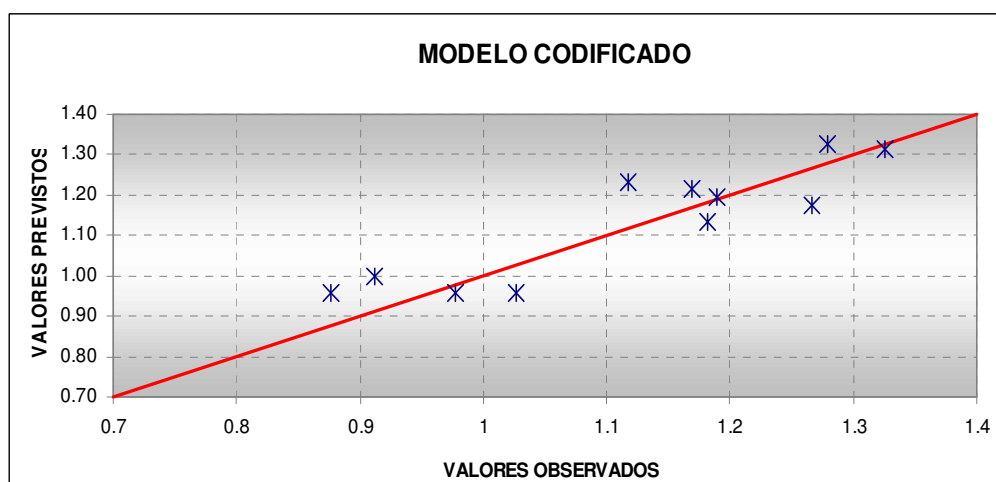


FIGURA 5.20- GRÁFICO COM OS PONTOS OBTIDOS ATRAVÉS DO MODELO EQUACIONAL CODIFICADO DE n

Através dos valores de R e F e do gráfico obtido (pontos bem próximos da reta) pode-se verificar que o modelo codificado é satisfatório.

MODELO REAL:

Através do programa estatístico MINITAB obtém-se o modelo equacional real, a partir do coeficiente de regressão apresentado na TABELA 5.17.

TABELA 5.17- COEFICIENTES DE REGRESSÃO DO MODELO REAL DE n – SEM O FATOR ELIMINADO ($p > 0,05$) NO MODELO CODIFICADO

	COEFICIENTE DE REGRESSÃO
MÉDIA	0.9598
(1) TG (%) (L)	-0.0033
TG (%) (Q)	0.0910
(2) t (hora) (L)	0.0178
t (hora) (Q)	0.0191
1 (L) x 2 (L)	0.0079

A partir dos valores dos coeficientes de regressão apresentados na TABELA 5.17 obteve-se o seguinte modelo equacional codificado:

$$Y = 0,9598 - 0,0033 X_1 + 0,0178 X_2 + 0,0910 X_1^2 + 0,0191 X_2^2 + 0,0079 X_1 * X_2$$

Com a obtenção do modelo equacional, é possível visualizar os pontos do modelo real graficamente (FIGURA 5.21).

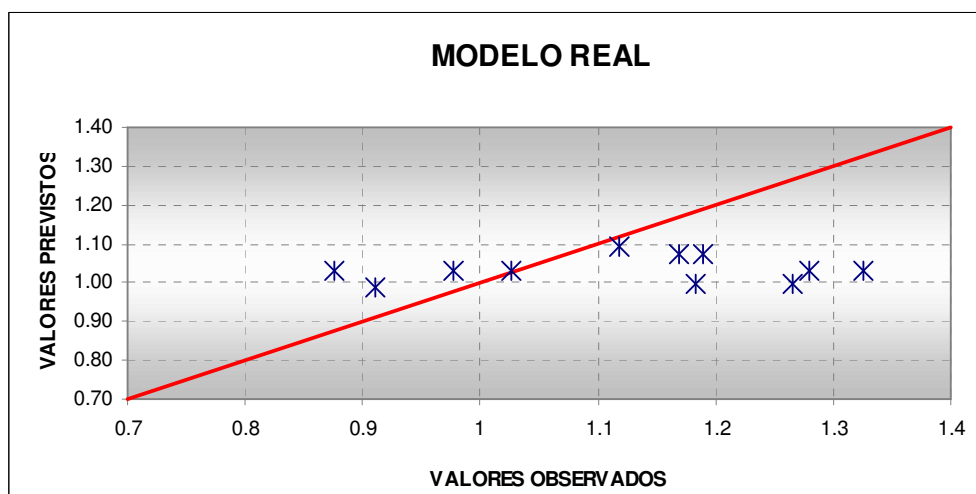


FIGURA 5.21- GRÁFICO COM OS PONTOS OBTIDOS ATRAVÉS DO MODELO EQUACIONAL REAL DE n

Através do gráfico obtido (pontos próximos da reta) pode-se verificar que o modelo real é satisfatório, mas que o codificado está mais preciso que o real. Dessa forma o ideal é a utilização do modelo codificado.

Para obter a faixa da concentração de enzima TG e do tempo de atuação que resultará em um fluido pseudoplástico ou dilatante, ou seja, $n < 1$ ou $n > 1$ respectivamente, são apresentados os gráficos de superfície de resposta e curvas de contorno nas FIGURAS 5.22 e 5.23. Com estes é possível realizar a otimização do projeto.

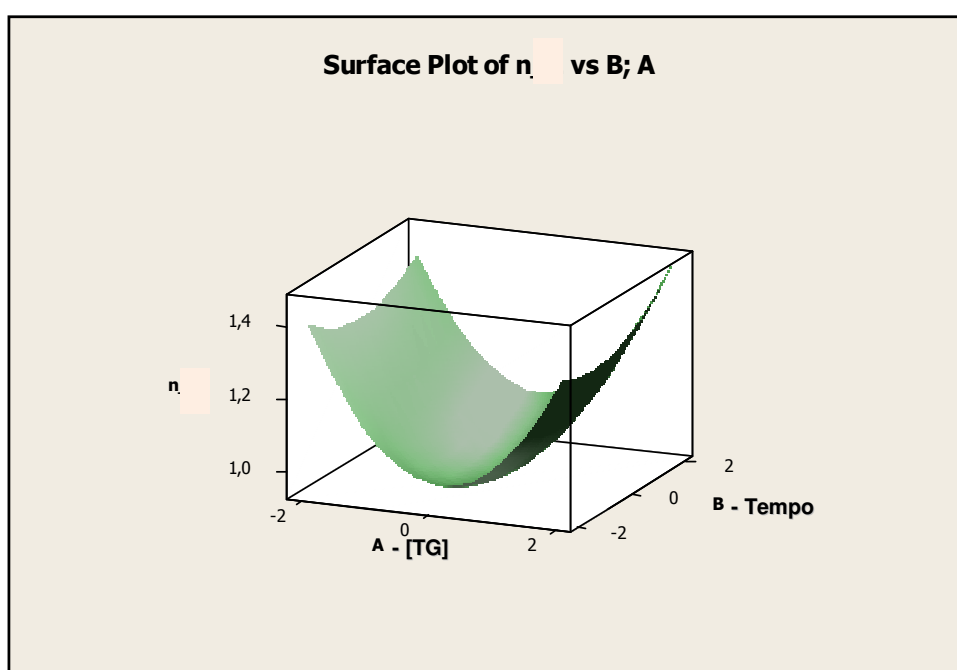
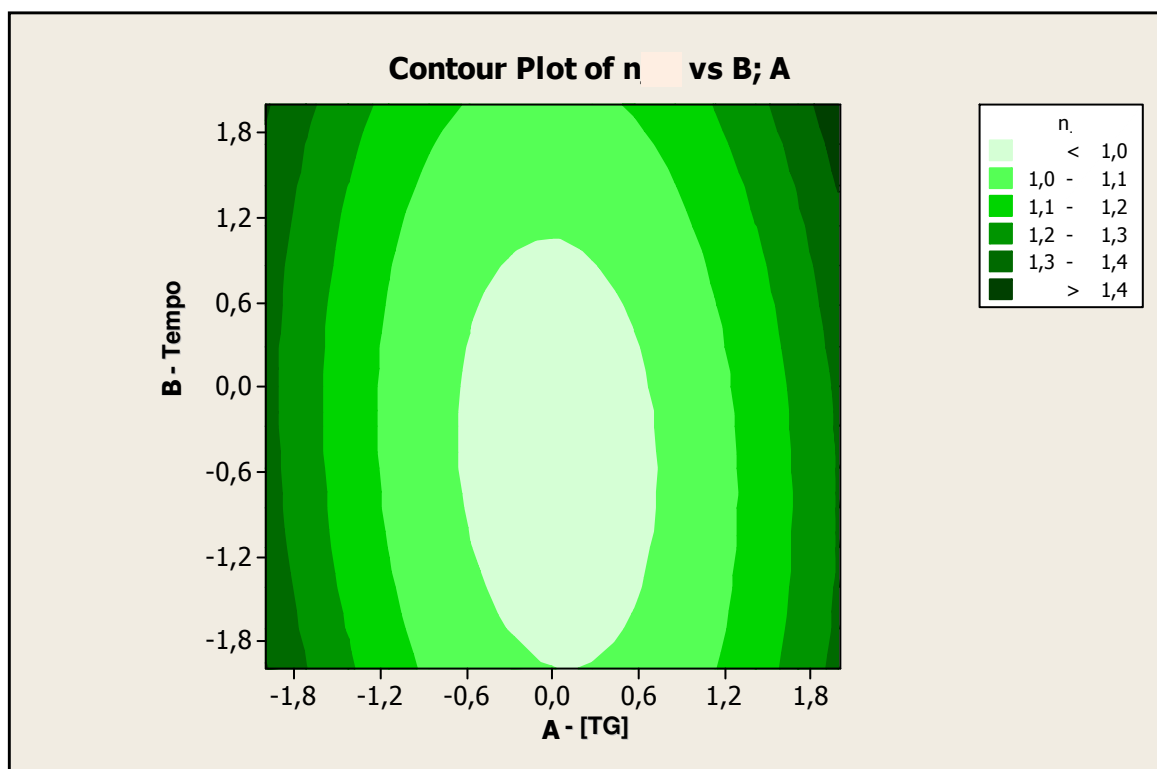


FIGURA 5.22- SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DO MODELO CODIFICADO DE n

A FIGURA 5.22 apresenta o gráfico da superfície de resposta do valor do coeficiente n do produto obtido referente à relação entre a concentração de TG e o tempo de atuação da mesma.

FIGURA 5.23- CURVAS DE CONTORNO DO MODELO CODIFICADO DE n

A partir do gráfico de curvas de contorno apresentado na FIGURA 5.22 verifica-se que para os valores de TG e tempo de atuação mais nas faixas de 0,015 a 0,025% de TG a um tempo de reação de 48 a 120 minutos é obtido um fluido pseudoplástico e fora desta faixa o produto obtido é dilatante. Com estes dados, é possível realizar a combinação mais adequada para obtenção do tipo de fluido desejado por cada fabricante.

Para uma análise complementar do coeficiente n , é apresentado na FIGURA 5.24 o comparativo dos coeficientes n dos modelos.

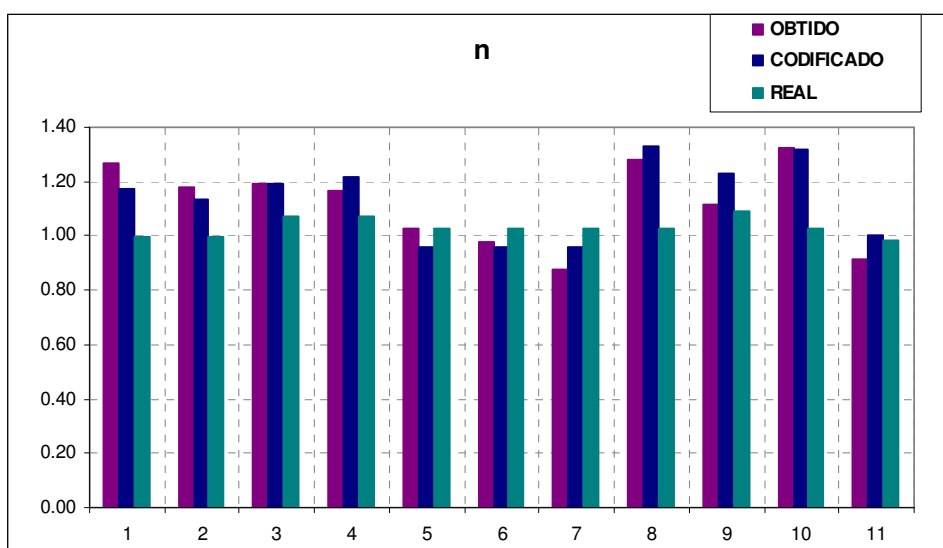


FIGURA 5.24- GRÁFICO COMPARATIVO DOS VALORES DE n OBTIDOS EXPERIMENTALMENTE COM AS DOS MODELOS CODIFICADO E REAL

Neste gráfico verifica-se a variação do coeficiente n , obtida experimentalmente nos diversos ensaios realizados, com os valores de n fornecidos pelos modelos codificado e real. Nota-se, que nos pontos centrais, ensaios 5 a 7, a variação entre os valores dos modelos são mínimas, o que mostra a validade do estudo. Pode-se observar, também, que os pontos centrais 5, 6 e 7 e o ensaio 11 são os que forneceram produtos pseudoplásticos, o restante são produtos dilatantes.

Outros fatores de grande importância são os desvios obtidos entre os resultados obtidos experimentalmente e através dos modelos, que é apresentado na FIGURA 5.25.

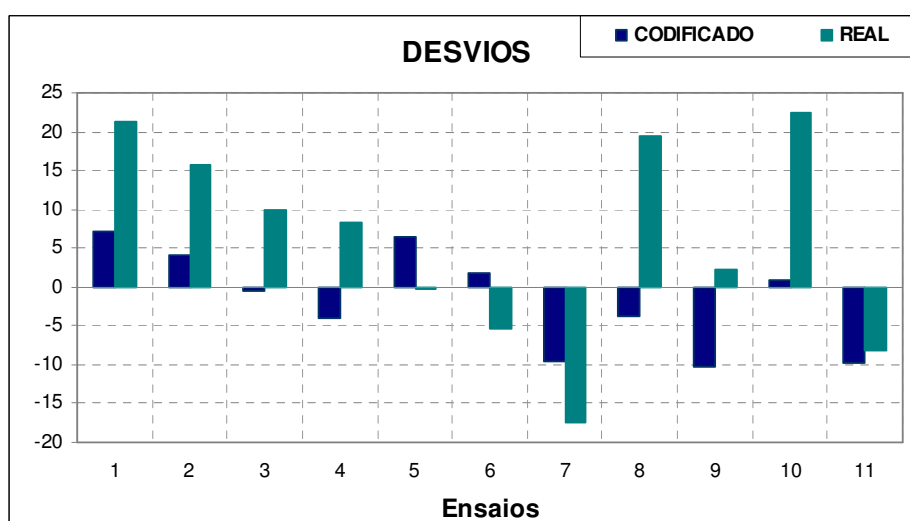


FIGURA 5.25- GRÁFICO COMPARATIVO DOS DESVIOS DOS VALORES DE n OBTIDO EXPERIMENTALMENTE COM AS DOS MODELOS CODIFICADO E REAL

Segundo BRUNS et al (1996) o ideal para se obter neste gráfico é um desvio pequeno onde o coeficiente n do produto for o desejado. Neste caso, o ideal seria utilizar o ensaio 6, pois foi o que obteve o menor desvio.

Segundo BARONI et al (1999) todos os requeijões de mercado possuem $n < 1$ sendo, portanto, fluidos pseudoplásticos, bem como os ensaios dos pontos centrais 5, 6 e 7. Pode-se verificar na TABELA 5.14 que o ensaio 7 também é um ensaio pseudoplástico. Estes ensaios foram os que obtiveram maior rendimento e maior viscoelasticidade.

6. CONCLUSÕES

- ◆ A adição da enzima transglutaminase na concentração de 0,02% e um tempo de atuação de 90 minutos aumentou o rendimento do requeijão em, aproximadamente, 13% com relação ao requeijão produzido pelo processo tradicional (sem TG). Os pontos que proporcionam a obtenção de um máximo rendimento foram 0,019 a 0,025% de TG e tempo de atuação de 104 a 120 minutos. Verifica-se que o rendimento é muito mais influenciado pela concentração da enzima do que pelo tempo de atuação.
- ◆ A adição da enzima transglutaminase não altera o pH, o teor de cinzas, cálcio e carboidrato do requeijão, mas altera o teor de umidade onde na concentração de 0,02% e um tempo de atuação de 90 minutos aumentou a umidade do requeijão em, aproximadamente, 4% com relação ao requeijão produzido pelo processo tradicional (sem TG) e reduzindo em 17% o teor de gordura e em 19% o teor de proteína.
- ◆ Em relação à textura do requeijão, não existe diferença significativa ao nível de 5% de significância entre os atributos Coesividade e Elasticidade, mas quanto à Firmeza, Adesividade, Gomosidade e Mastigabilidade o requeijão produzido pelo processo tradicional (sem TG) obteve um maior teor destes atributos diferindo estatisticamente, ao nível de 5%, dos requeijões que continham a adição de TG. Referente à viscoelasticidade do requeijão, existe uma diferença estatisticamente ao nível de 5% de significância entre os requeijões que continham TG onde os que obtiveram maior viscoelasticidade estão na faixa de 0,023% a 0,034% de TG a um tempo de atuação de 50 a 60 minutos; verifica-se que a viscoelasticidade, assim como o rendimento, é muito mais influenciada pela concentração da enzima do que pelo tempo de atuação. Quando comparado os requeijões que continham TG com o requeijão produzido pelo processo tradicional (sem TG), o requeijão sem TG difere estatisticamente dos demais, ao nível de 5% de significância, sendo o que possui maior viscoelasticidade.
- ◆ Quanto à viscosidade do requeijão, verifica-se que não existe diferença significativa ao nível de 5% de significância em relação à viscosidade aparente dos produtos, mas que existe diferença entre o coeficiente que indica o comportamento do fluido. Pode-se verificar que dentre os requeijões com 0,02% de TG o fluido obtido é um fluido pseudoplástico assim como o requeijão produzido pelo processo tradicional (sem TG).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJINOMOTO. **Propriedades básicas da transglutaminase**. Catálogo.

AJINOMOTO. **Transglutaminasa, una innovación tecnológica**. Reimpreso con el permiso de CarneTec mar./abr. 2000. Folleto.

AJINOMOTO. **TG for milk products**. AJINOMOTO USA, 1997. Material Técnico.

ANDO, H.; et al. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. **Agric. Biol. Chem.**, vol. 53, nº 10, p. 2613 – 2617, 1989.

ANDREWS, A. T. Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. **Journal of Dairy Research**, London, v. 50, n. 1, p. 45-55, 1983.

ANJO, V. D. de A. Reologia de requeijão cremoso e outros queijos fundidos. In: VAN DENDER, A. G. F. et al. **Requeijão Cremoso e Outros Queijos Fundidos: Aspectos de Qualidade, Processamento, Rotulagem, Legislação e Mercado**. Seminário ITAL / TECNOLAT, Campinas, cap. 12, nov. 2000. Apostila.

ANON, Requeijão cremoso – Destaque cada vez maior na mesa do consumidor. **Revista Indústria de Laticínios**, ano 4, n. 21, p. 38-40, mai. / jun. 1999.

ANONYMOUS. Products and applications of transglutaminase. **The world of ingredients**. p. 46, dec.1996.

ASSOCIATION of OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS; CUNNIFF, P. **Official methods of analysis of AOAC international**. Arlington: AOAC, v. 2, 1995.

ATHERTON, H. V.; NEWLANDER, J. A. **Chemistry and testing of dairy products**. 4^a ed. Westport, Avi Publishing Company, Inc., 1977.

BARONI A.; et al. Caracterização reológica de requeijão cremoso tradicional e com teor reduzido de gordura: viscosidade extensional e em cisalhamento. **Brazilian Journal Of Food Technology**, 2(1,2):21-29, 1999.

BARROS, G. A.; et al. **A indústria de laticínios brasileira e mineira em números**. INDI – Instituto de Desenvolvimento Industrial de Minas Gerais, 2002.

BLAKESLEY, R. W.; BOEZI, J. A. A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie Brilliant Blue G250. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 82, n. 4, p. 580-582, 1977.

BRASEC. **Manual de instruções de operação do viscosímetro digital Brookfield modelo DV-I+**, 1997.

BRASEC. **Manual de auxílio do software XY – Texture Analyser**, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Leite e Produtos Lácteos. Portaria nº 359. **Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Requeijão Cremoso ou Requesón**. Brasília, 1997.

BRUNS, R. E.; et. al. **Planejamento e otimização de experimentos**. Editora da Unicamp, ed. 2, 1996.

CAMPOS, W. A.; MUNCK, A. V. **Requeijão: Um produto brasileiro**. Leites & Derivados, São Paulo, n. 15, p. 72, mar. /abr. 1994.

CAMPOS, S. D. Metodologia objetiva para avaliação de parâmetros de textura. In: CAMPOS, S. D. **Reologia e Textura de Alimentos**. Campinas: ITAL, p. 43-59. 1989. Manual Técnico.

CARIC', M.; et. al. Effects of emulsifying agents on the microstructure and other characteristics of process cheese. A review. **Food Microstructure**, Chicago, v. 6, p. 297-312, 1985.

CAVALCANTE, A. B. D. **Desenvolvimento e padronização de formulação para o processamento de requeijão**. Viçosa, UFV, 1971. Tese.

CAVALCANTE, A. B. D. **Desenvolvimento e padronização de formulação para o processamento de requeijão tradicional**. Viçosa, Faculdade de Engenharia de Alimentos, 112p. 1991. Dissertação.

COZZOLINO, A.; et al. Incorporation of whey proteins into cheese curd by using transglutaminase. **Biotechnol. Appl. Biochem.** 38, p. 289-295. Naples, Italy, 2003.

DICKINSON, E.; YAMAMOTO, Y. Rheology of milk protein gels and protein stabilized emulsion gel cross-linked with transglutaminase. **J. Agric Food Chem.**, 1371 – 77, p. 44, 1996.

DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos**. Curitiba, Champagnat, 1996.

EIGEL, W.N., et. al. Nomenclature of proteins of cow's milk: fifth revision. **Journal of Dairy Science**, Champaing, v. 67, p. 1599-1631, 1984.

FAERGEMAND, M.; MURRAY, B. S. Interfacial dilational properties of milk proteins cross-linked by transglutaminase. **J. Agric. Food Chem.**, 884 – 90, p.46, 1998.

FAERGEMAND, M.; QVIST, K. B. Transglutaminase: effect on rheological properties, microstructure and permeability of set style acid skim milk gel. **Food Hidrocolloids**, v. 11 n. 3, p. 287-292, Denmark, 1997.

FARIA, E. V. Técnicas para análise sensorial de requeijão cremoso e outros queijos fundidos. In: VAN DENDER, A. G. F. et al. **Requeijão cremoso e outros queijos fundidos: aspectos de qualidade, processamento, rotulagem, legislação e mercado**. Seminário ITAL / TECNOLAT, Campinas, cap. 9, nov. 2000. Apostila.

FARIÑA, L. O; et al. Estudos das características físico-químicas, reológicas e sensoriais do requeijão cremoso produzido com a adição de transglutaminase. **Anais do XXI Congresso Nacional de Laticínios**, Juiz de Fora, p.163-166, 2004.

FARIÑA, L. O; et al. Estudo da atividade da TG em queijos frescos obtidos por diferentes processos de coagulação nas etapas iniciais da fabricação. **Anais do XXI Congresso Nacional de Laticínios**, Juiz de Fora, p.41-49, 2004.

FERNANDES, A. G. Sais emulsificantes. In: MARTINS, J. F. & FERNANDES, A. G. **Processamento de requeijão cremoso e outros queijos fundidos**. Campinas, ITAL, cap. 4, p. 1-7. 1981a. Apostila.

FERNANDES, A. G. Parâmetros fundamentais para o processamento de queijos fundidos. In: MARTINS, J. F. & FERNANDES, A. G. **Processamento de requeijão cremoso e outros queijos fundidos**. Campinas, ITAL, cap. 5, p. 1-11. 1981 b. Apostila.

FOLK, J.E., COLE, P.W. Transglutaminase: mechanistic features of the active site as determined by kinetic and inhibitor studies. **J. Biol. Chem.**, 241, 5518-5525, 1966.

FOLTRAN, A. L. M.; et al. **Estudo da utilização da enzima transglutaminase na fabricação de requeijão**. Escola de Engenharia Mauá, São Caetano do Sul, Trabalho de Graduação do Departamento de Engenharia Química e de Alimentos do Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, 2001. Apostila.

FOX, P. F.; et. al. Effect of transglutaminase on the heat stability of milk: A possible mechanism. **J. Dairy Sci.** 85:1-7. American Dairy Science Association, 2002.

GIGANTE, M. L. **Requeijão cremoso obtido por ultrafiltração de leite pré-acidificado adicionado de concentrado protéico de soro**. Campinas, UNICAMP, 1998. Tese.

HAN, X.Q.; SPRADLIN, J. E. Process for making cheese using transglutaminase and non-rennet protease. Kraft foods, Inc. **U.S. patent 6.093.424**, July 2000.

HOLTORFF, F.; et. al. A study of process cheese emulsifier. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.34, n. 6, p. 486, 1951.

IMM, J. Y.; et. al. Gelation and water binding properties of transglutaminase-treated skim milk powder. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 2, 2000.

JACOBS, M. B. **The chemical analysis of foods and food products**. Ed. Krieger, n. 3, p. 21-45, 85-88, 182-184, 317-334, 781-782, New York, 1958.

KANAJI, T.; et al. Primary structure of microbial transglutaminase from *Streptovorticillium* sp. strain s-8112. **J. Biol. Chem.**, 268, 11565-11572, 1993.

KINDSTED, P. S.; KOSIKOWSKI, F. V. Improved complexometric determination of calcium in cheese. **Journal of Dairy Science** 68 (-), 806-809, 1985a.

KURAISHI, C.; et. al. Process for producing cheese using transglutaminase. **United States Patent nº 5,681,598**. Oct. 1997.

KURAISHI, C.; et. al. The usefulness of transglutaminase for food processing. **Biotechnology for Improved Foods and Flavor**, s.v., s.p., 1996.

LAUBER, S.; et. al. Relationship between crosslinking of caseins by transglutaminase and the gel strength of yogurt. **Eur. Food Res. Technol.**, v. 210, p. 305-309, 2000.

LORENZEN, P. C.; SCHLIMME, E. **Properties and potencial fields of application of transglutaminase preparations in dairying**. Bulletin of the IDF 332. p. 47-53. 1998.

MADRID, A.; et. al. **Manual de indústria dos alimentos**. ed. Varela, p.147-168. São Paulo, 1996.

MARCHIORI, E. **Queijo: o tesouro que vem do leite**. Revista Indústria de Laticínios, ano 8, n. 50, p. 19-27, mar. / abr. 2004.

MEYER, A. **Process cheese manufacture**. London: Food Trade Press, 360p. 1973.

MOTOKI, M.; SEGURO, K. **Transglutaminase and it use for food processing**. Trends in Food Science & Technology 9, p. 204-210, 1998.

NETO, J. P. M. L. **Textura da massa do queijo: fatores que a influenciam e parâmetros de controle**. Revista Food Ingredients, Tecnologia, p.34-39. 1999.

NIELSEN, P. M. Reactions and potential industrial applications of transglutaminase. review of literature and patents. **Food Biotechnology**. p. 119-156, Denmark, 1995.

NOKATA, M.; et. al. Incorporation of lysine- and lysine dipeptides into α [s1]-casein by Ca[2+]-independent microbial transglutaminase. **Biosci. Biotec. Biochem.**, vol. 60, p. 131 – 133 e 532 – 533, 1996.

OLIVEIRA, J. S. de. **Queijo: fundamentos tecnológicos**. Campinas: UNICAMP, 146p. 1986.

OLIVEIRA, J. S. de. **Queijo: fundamentos tecnológicos**. Campinas: Ícone. ed. 2, cap. 3, p.32-33 e cap. 6, p. 137-144. 1987.

OLIVEIRA, L. L. de. **Utilização da transglutaminase na fabricação de queijos frescos empregando diferentes processos de coagulação**. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2003. Tese.

OLSON, N. F.; PRICE, W. V. Composition and bacterial growth as factors affecting the body of pasteurized process cheese spread. **J. Dairy Sci.** v. 44, n. 8, p. 1394-1404, 1961.

PALMER, H. J.; SLY, W.H. Cheese melting salts and their properties. **Society of Chemistry Industry**, Wembley, v. 63, p. 363-367, 1944.

PRODUÇÃO DE DERIVADOS DE LEITE: **Produção de queijos (queijo fundido e requeijão – Módulo V)**. Direção de José Mauro S. Lima. Viçosa, MG: Centro de Produções Técnicas. 1 fita de vídeo (55 min), VHS, son., color. 1997.

RAPACCI, M. **Estudo comparativo das características físicas e químicas, reológicas e sensoriais do requeijão cremoso obtido por fermentação láctica e acidificação direta**. UNICAMP, Campinas, 1997. Tese.

RIBEIRO, E.P. **Queijos**. Escola de Engenharia Mauá. São Caetano do Sul, cap. 8, 2000. Apostila.

ROBINSON, R. K., WILBEY, R. A. **Cheesemaking practice**. ed. 3, p. 1-29 e 147-164. 1998.

SAKAMOTO, H.; et. al. Strength of protein gels prepared with microbial transglutaminase as related to reaction conditions. **Journal of Food Science**. vol. 59, 866-871, 1994.

SAMPAIO, L. G. A.; BRANDÃO, S. C. C. Desenvolvimento de requeijão cremoso light utilizando Dairy-Lo. **Anais do XIII Congresso Nacional de Laticínios**, Juiz de Fora, p.211-213, 1995.

SCHILIME, J.; et. al. Transglutaminase properties. **Journal Of Food Science**. p. 157 – 161, 1999.

SEGURO K.; et. al. The epsilon-(gamma-glutamyl)lysine moiety in crosslinked casein is an available source of lysine for rats. **J. Of Nutri**. 2557-2562,1996.

SERAVALLI, E. A. G.; IGUTI, A. M. **Análises físico-químicas de alimentos**, 1999. Apostila.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos; propriedades, degradações, modificações**. ed. Varela, Campinas, p. 139-157, 1996.

SHIMP, L. A. Process Cheese Principles. **Food Technology**, Chicago, v. 39, n. 5, p. 63-9, 1985.

SHOEMAKER, C. F.; et. al. Rheological characterization of dairy products. **Food Technology**, Chicago, v. 46, n. 1, p. 98-104, 1992.

SILVA, M. A. A. P. **Métodos de avaliação sensorial dos alimentos**. Curso de Extensão UNICAMP, Campinas, abr. 2004. Apostila.

SILVA, T. A. **Estudo comparativo da fabricação de requeijão cremoso natural e com teor reduzido de gordura produzido com massa obtida por acidificação direta a quente e por ultrafiltração.** UNICAMP, Campinas, 2003. Tese.

STEFFE, J.F. **Rheological methods in food process engineering.** 2 ed., East Lansing, MI: FreemanPress, 418p. 1996.

SZCZESNIAK, A. S. Texture is a sensory property. **Food Quality and Preference**, v. 13, n. 4, p. 215-225, 2002.

SZCZESNIAK, A. S. **Physical properties of food: what they are and their relation to other food properties.** In: PELEG, M.; BAGLEY, E. B. Westport: AVI, Inc., 42p. 1983.

TUNICK, M.H.; NOLAN, E. D. J. **Rheology of chesse. physical chemistry of food processes fundamental aspects.** In: BAIAN, J. C. New York: ed. An AVI Book, p. 273-97, 1992.

U.S. PATENT Nº 5,156,956.

VALLE, J.L.E. Qualidade físico-química da matéria-prima e produto acabado. In: MARTINS, J.P.P.; FERNADES, A.G. (Ed.). **Processamento de requeijão cremoso e outros queijos fundidos.** Campinas: ITAL, cap. 2, p. 1-5. 1981.

VAN DENDER, A.G.F. Princípios básicos da fabricação de queijos processados e de requeijão cremoso. **Boletim Técnico informativo do Centro de Tecnologia de Laticínios.** Ano 2, n. 1:3, jan./fev./mar., 1997.

VAN DENDER, A. G. F. et al. **Requeijão cremoso e outros queijos fundidos: aspectos de qualidade, processamento, rotulagem, legislação e mercado.** Seminário ITAL / TECNOLAT, Campinas, cap. 1 e 7, nov. 2000. Apostila.

VEISSEYRE, R.F. **Lactologia tecnica: composición, recologida, tratamiento y transformación de la leche.** Barcelona: Ed. Acribia, 629p. 1980.

VERMA, B.B.; GUPTA, S. K. Effect of heat processing on the body and texture of milk and milk products. **Indian Diaryman**, New Delhi, v. 33, n. 6, p. 361-5, 1981.

WONG, D.W.S.; et. al. Structures and functionalities of milk proteins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Florida, v. 36, n. 8, p. 807-844, 1996.

ZEHREN, V.L., NUSBAUM, D.D. **Process cheese**. New Holstein: Cheese Reporter, 364p. 1992.

ZHU, Y; et. al. Microbial transglutaminase- a review of its production and application to food processing. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 44, p. 277-282, 1995.

<[http:// www.cienciadoleite.com.br/historiaqueijos.htm](http://www.cienciadoleite.com.br/historiaqueijos.htm)> Acesso em: 14/11/2005

<[http:// www.foodsci.uoguelph.ca/dairyedu/cheese.html](http://www.foodsci.uoguelph.ca/dairyedu/cheese.html)> Acesso em: 14/11/2005

<[http:// www.stablemicrosystems.com](http://www.stablemicrosystems.com)> Acesso em: 14/11/2005

ANEXO I

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO/ GABINETE DO MINISTRO

PORTARIA Nº 359, DE 04 DE SETEMBRO DE 1997

REGULAMENTO TÉCNICO PARA FIXAÇÃO DE IDENTIDADE E QUALIDADE DE REQUEIJÃO OU REQUESÓN

1. ALCANCE

1.1. OBJETIVO: O presente Regulamento fixa a identidade e os requisitos mínimos de qualidade que deverão cumprir o Requeijão ou Requesón destinado ao consumo humano.

1.2. ÂMBITO DE APLICAÇÃO: O presente regulamento se refere ao Requeijão ou Requesón, destinado ao comércio nacional e internacional.

2. DESCRIÇÃO

2.1. DEFINIÇÃO: Entende-se por Requeijão ou Requesón (agora apenas chamado de Requeijão) é o produto obtido pela fusão da massa coalhada, cozida ou não, dessorada e lavada, obtida por coagulação ácida e/ ou enzimática do leite opcionalmente adicionada de creme de leite e/ ou manteiga e/ ou gordura anidra de leite ou *butter oil*. O produto poderá estar adicionado de condimentos, especiarias e/ ou outras substâncias alimentícias.

A denominação Requeijão está reservado ao produto no qual a base láctea não contenha gordura e/ ou proteína de origem não láctea.

2.2. CLASSIFICAÇÃO: Se classificam, de acordo com as matérias primas empregadas no processo de elaboração em:

2.2.1. Requeijão: É aquele, obtido por fusão de uma massa de coalhada dessorada e lavada obtida por coagulação ácida e/ ou enzimática do leite com ou sem adição de creme de leite e/ ou manteiga e/ ou gordura anidra de leite ou *butter oil*.

2.2.2. Requeijão Cremoso: É aquele obtido por fusão de uma massa coalhada dessorada e lavada, obtida por coagulação ácida e/ ou enzimática do leite, com adição de creme de leite e/ ou manteiga e/ ou gordura anidra de leite e/ ou *butter oil*.

2.2.3. Requeijão de Manteiga: É aquele obtido pela fusão prolongada com agitação de uma mistura de manteiga e massa de coalhada de leite integral, semidesnatado ou desnatado.

2.3. DESIGNAÇÃO (denominação de venda): Se designarão "Requeijão" ou "Requeijão Cremoso" e "Requeijão de Manteiga" segundo corresponda a classificação 2.2.1., 2.2.2 e 2.2.3. respectivamente.

O "Requeijão de Manteiga" poderá opcionalmente denominar-se "Requeijão do Norte".

Quando em sua elaboração se utilizem condimentos, especiarias e/ ou outras substâncias alimentícias o produto se denominará: "Requeijão com.....", "Requeijão Cremoso com.....", "Requeijão de Manteiga com....." ou "Requeijão do Norte com.....", segundo corresponda, preenchendo o espaço em branco com o nome das especiarias e/ ou condimentos e/ ou substâncias alimentícias agregadas.

Em todos os casos poderá utilizar-se a designação "Requesón" no lugar de "Requeijão"

3. REFERÊNCIA

- Norma FIL 4A:1982 - Queijos e Queijos Processados. Determinação do conteúdo de sólidos totais (Método de referência).
- Norma FIL 5B: 1986. Queijos e Produtos Processados de Queijos. Conteúdo de matéria gorda.
- Norma FIL 50B: 1985. Leite e Produtos Lácteos-Métodos de Amostragem - CAC / Vol A: 1985

4. COMPOSIÇÃO E REQUISITOS

4.1. COMPOSIÇÃO

4.1.1. Ingredientes obrigatórios.

Requeijão: Leite ou leite reconstituído

Requeijão Cremoso: leite ou leite reconstituído, creme e/ ou manteiga e/ ou gordura anidra de leite ou *butter oil*.

Requeijão de Manteiga: leite ou leite reconstituído, manteiga, cloreto de sódio.

4.1.2. Ingredientes opcionais: Coalho ou coagulantes apropriados, creme, manteiga, gordura anidra de leite ou *butter oil*, sólido de origem láctea, leite em pó, caseína, caseinatos, cloreto de sódio, cloreto de cálcio, fermentos lácteos ou cultivos específicos, condimentos, especiarias, outras substâncias alimentícias.

4.2. REQUISITOS

4.2.1. Características Sensoriais

4.2.1.1. Consistência: untável ou fatiável.

4.2.1.2. Textura: cremosa, fina, lisa ou compacta.

4.2.1.3. Formato: variável.

4.2.1.4. Cor: característico

4.2.1.5. Odor: característico.

4.2.1.6. Sabor: À creme levemente ácido, opcionalmente salgado para o requeijão ou requeijão cremoso, levemente ácido, salgado a ranço para o requeijão de manteiga.

4.2.2. Requisitos Físicos Químicos.

REQUISITO	REQUEIJÃO	REQUEIJÃO CREMOSO	REQUEIJÃO MANTEIGA	MÉTODOS DE ANÁLISES
Matéria gorda no extrato seco g/100g	45,0 a 54,9	Mín. 55,0	Mín. 25,0 a 59,9	Norma FIL 5B: 1986
Umidade g/ 100g	Máx. 60,0	Máx. 65,0	Máx. 58,0	Norma FIL 4A: 1982

4.3. ACONDICIONAMENTO: Deverá ser envasado com materiais adequado para as condições de armazenamento previstas e que confiram ao produto uma proteção adequada.

5. ADITIVOS E COADJUVANTES E DE TECNOLOGIA/ ELABORAÇÃO

5.1. ADITIVOS: Se admitirá o uso dos aditivos que se indicam a continuação nas concentrações máximas indicadas no produto final.

ADITIVOS	FUNÇÃO	CONCENTRAÇÃO MÁX.
Ácido Sórbico ou seus Sais de Na, K ou Ca	Conservador	1000 mg/kg ou combinados, expresso como ácido sórbico.
Natamicina (na superfície)	Conservador	1 mg/ dm ² Máx. 5 mg/kg não detectável a 2mm de profundidade. Ausência na massa.
Nisina	Conservador	12,5 mg/kg
Ácidos láctico, cítrico, acético e málico ou seus sais de Na, K e Ca. Bicarbonato de Sódio Gluconato-delta-lactona	Reguladores de Acidez	b.p.f

Citrato de Na, K e Ca. Lactato de Na ou Ca Tartarato de Na e/ou K Fosfato ou Polifosfatos de Na, K ou Ca.	Emulsificante	40 g/kg só combinados com fosfatos ou polifosfatos calculados como substâncias anidras sempre que os fosfatos não superem 20 g/kg expressos como P ₂ O ₅ .
Citrato de Na, K e Ca. Lactato de Na ou Ca Tartarato de Na e/ou K Fosfato ou Polifosfatos de Na, K ou Ca.	Estabilizante	40 g/kg só combinados com fosfatos ou polifosfatos calculados como substâncias anidras sempre que os fosfatos não superem 20 g/kg expressos como P ₂ O ₅ .
Aromas	Saborizante/ Aromatizante	b.p.f
Carotenóides naturais: Beta Caroteno, Bixina, Norbixina, Urucum, Anato, Rocu.	Corante	10 mg/kg como norbixina
Beta caroteno sintético idêntico ao natural	Corante	600 mg/kg
Clorofila, Clorofilina, Clorofila cúprica, sais de Na e K.	Corante	15 mg/kg em clorofila
Peróxido de benzoilo	Corante	20 mg/l de leite (*)
Riboflavina, Carmin, Vermelho de beterraba, Dióxido de Titânio	Corante	b.p.f

(*) Concentrações máximas de matéria-prima.

6. CONTAMINANTES: Os contaminantes orgânicos e inorgânicos não devem estar presentes em quantidade superiores aos limites estabelecidos pelo Regulamento específico.

7. HIGIENE

7.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS: As práticas de higiene para elaboração dos produtos deverão estar de acordo com o estabelecido no Código Internacional Recomendado de Práticas, Princípios Gerais de Higiene dos Alimentos (CAC/ VOL. A 1985).

7.2. CONSIDERAÇÕES PARTICULARES.

7.2.1. Durante o processo de fusão, o produto deverá ser submetido a aquecimento mínimo de 80 °C durante 15 segundos ou qualquer outra combinação tempo/ temperatura equivalente.

7.2.2. As especiarias, condimentos e/ou substâncias alimentícias que se agreguem ao produto deverá ser tratado convenientemente de forma tal que assegure a aptidão para o consumo humano do produto final.

7.2.3. Condições de conservação e comercialização: o requeijão deverá manter-se a uma temperatura inferior a 10 ° C.

7.3. CRITÉRIOS MACROSCÓPICOS E MICROSCÓPICOS:

O produto não deverá conter substâncias estranhas macro e/ ou microscópicas de qualquer natureza.

7.4. CRITÉRIOS MICROBIOLÓGICOS

O produto deverá cumprir os seguintes requisitos microbiológicos.

MICROORGANISMO	CRITÉRIO DE ACEITAÇÃO	CATEGORIA I.C.M.S.F.	MÉTODO DE ANÁLISE
Coliformes/ g (30 °C)	n = 5 m = 10 c = 2 M = 100	5	FIL A: 1985
Coliformes/ g (45 °C)	n = 5 m < 3 c = 2 M = 10	5	APHA 1992 Cap. 24 (1)
Stafilococcus coag. Pos./g	n = 5 m = 100 c = 2 M = 1000	5	FIL 145:1990

(1). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 3a Edición. Editado por Carl Vanderzant y Don F. Splittstoesser. (1992)

8. PESOS E MEDIDAS.

Se aplicará o Regulamento específico.

9. ROTULAGEM

9.1. Aplica-se o Regulamento específico.

9.2. Denominar-se "Requeijão", Requeijão Cremoso, e "Requeijão de Manteiga" segundo corresponda à classificação 2.2.1, 2.2.2 e 2.2.3, respectivamente.

9.3. O "Requeijão de Manteiga" poderá opcionalmente denominar-se "Requeijão do Norte".

9.4. Quando na sua elaboração se utilizem condimentos, especiarias ou outras substâncias alimentícias o produto se denominará "Requeijão com.....", "Requeijão Cremoso com" "Requeijão de Manteiga com.....", ou "Requeijão do Norte com.....", segundo corresponda, preenchendo o espaço em branco com o nome das especiarias e/ ou condimentos e/ ou substâncias alimentícias adicionadas.

9.5. Em todos os casos poderá denominar-se "Requesón" em lugar de "Requeijão".

10. MÉTODOS DE ANÁLISES

Os métodos de análises especificados são os indicados em 4.2.2.

11. AMOSTRAGEM

Seguem-se os procedimentos recomendados na norma FIL 50 B: 1985

ANEXO II



FOOD INGREDIENTS DEPARTMENT
AJINOMOTO CO., INC.

15-1, KYOBASHI 1-CHOME CHUO-KU, TOKYO 104-8315 JAPAN
TEL : +81-3-5250-8146 FAX : +81-3-5250-8287

PRODUCT INFORMATION

ACTIVA®MP

Specifications

Item	Specification	Method*
Description	White powder	AJI TEST [Sensory analysis]
Loss on drying	Not more than 2.0 %	Japanese Standards for Food Additive (Loss on drying test [3 g, 80 °C for 2 hours])
Transglutaminase activity	78 – 126 U/g	AJI TEST [Hydroxamate method]
Arsenic (as As ₂ O ₃)	Not more than 2 µg/g	AJI TEST [Atomic absorption spectrophotometry]
Heavy metals (as Pb)	Not more than 20 µg/g	AJI TEST [Sodium Sulfide colorimetry]
Aerobic plate count	Not more than 3,000 /g	Standard Methods of Analysis in Japanese Food Safety Regulation [Standard agar medium]
Thermotolerant bacteria (mesophilic)	Not more than 500 /g	Standard Methods of Analysis in Japanese Food Safety Regulation [Standard agar medium]
Coliform bacteria	Negative/g	Standard Methods of Analysis in Japanese Food Safety Regulation [BGLB medium]

* All the methods are available on request to AJINOMOTO

Ingredients

Transglutaminase, Lactose and Maltodextrin

Shelf-life

Eighteen months from manufacturing date in the original unopened package in cool dry place.

7th April, 2003

AJINOMOTO

 FOOD INGREDIENTS DEPARTMENT
 AJINOMOTO CO., INC.

 15-1, KYOBASHI 1-CHOME CHUO-KU, TOKYO 104-8315 JAPAN
 TEL : +81-3-5250-8146 FAX : +81-3-5250-8287

PRODUCT INFORMATION

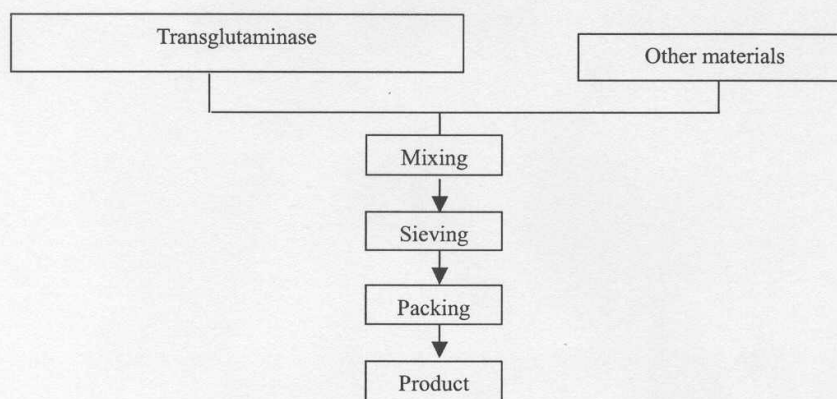
ACTIVA®MP

Packaging Specifications

Packaging items		Outer dimensions	Packaging material compositions
<Individual packaging>	Pouches*	350 mm x 225 mm	PET/PE/AL/PE/L-LDPE
			Center partition: L-LDPE
<Outer packaging>	Carton box	440 mm x 310 mm x 225 mm	Corrugated fiberboard
	Partition	300 mm x 210 mm	Card board
	Pad (top)	425 mm x 295 mm	Card board
	Pad (bottom)	425 mm x 295 mm	Card board
<Weight>	Gross weight	11.1 kg	
	Net weight	10 kg (1 kg x 10 bags)	

*Pouches contain oxygen absorbers to maintain product functionality

Production Process


 7th April, 2003

ANEXO III



JOHA® S9

Sal fundente para produção de queijo processado e preparação a base de queijo

Composição	Polifosfato de sódio e fosfato dissódico.	
Especificação	Conteúdo em P_2O_5 (%)	59.7 +/- 1.0
	pH (solução 1%)	9.0 +/- 0.3
Propriedades específicas	Deslocamento de pH	+ 0.1 /+ 0.3
	Capacidade de troca iônica	xx
	Ação de cremosidade	xx
	(o =nenhuma, x = leve, xx = média, xxx = forte)	
Aplicação	JOHA S 9 é usado para a produção de queijo processado untável, queijo processado firme e preparação a base de queijo. A taxa de adição recomendada é de aproximadamente 2% calculada sobre a matéria prima a ser processada, ou 10% sobre a quantidade de proteína.	
Armazenamento	O produto deve ser armazenado em local seco e fresco; proteger da umidade ambiente.	
Embalagem	Sacos multifolhados costurados de 25 Kg.	