

**DOUGLAS DOS SANTOS FARIA**

**ESTUDO DOS EFEITOS DA APLICAÇÃO DE  
TRANSGLUTAMINASE EM BEBIDA LÁCTEA  
FERMENTADA COM ALTO CONTEÚDO DE SORO**

**SÃO CAETANO DO SUL**

**2010**

**DOUGLAS DOS SANTOS FARIA**

**ESTUDO DOS EFEITOS DA APLICAÇÃO DE  
TRANSGLUTAMINASE EM BEBIDA LÁCTEA  
FERMENTADA COM ALTO CONTEÚDO DE SORO**

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

Linha de Pesquisa: Análise e Otimização de Processos Industriais e Engenharia de Embalagem.

Orientador: Profa. Dra. Eliana Paula Ribeiro

**SÃO CAETANO DO SUL**

**2010**

Faria, Douglas dos Santos

Estudo dos efeitos da aplicação de transglutaminase em bebida láctea fermentada com alto conteúdo de soro - Douglas dos Santos Faria - São Caetano do Sul, SP: CEUM-EEM, 2010. 116p.

Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação. Linha de Pesquisa: Análise e Otimização de Processos Industriais e Engenharia de Embalagem - Escola de Engenharia Mauá do Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, SP, 2010.

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Paula Ribeiro

1. Bebida láctea fermentada. 2. Transglutaminase. I. Instituto Mauá de Tecnologia. Centro Universitário. Escola de Engenharia Mauá. II. Título.

## **DEDICO**

**À minha esposa Mirela e  
Ao meu filho Lucas**

## **OFEREÇO**

**À Profa. Dra. Eliana Paula Ribeiro pela orientação,  
apoio, motivação e confiança**

## **AGRADECIMENTOS**

À minha esposa Mirela Aparecida Rodrigues Santinho pelo apoio incrível e por sempre me motivar, ao meu filho Lucas Santinho Faria pela compreensão.

À Profa. Dra. Eliana Paula Ribeiro pela orientação, paciência, motivação e dedicação.

Às professoras, Dra. Elisena e Dra. Mirna Lucia Gigante pela análise e valiosas sugestões para a realização do trabalho.

À Ines Santana, por toda a ajuda durante a realização do trabalho.

À Natasha Amanda, Rubia, Douglas Dalla e Maria Inês também pela ajuda durante a realização do trabalho.

Ao Instituto Mauá de Tecnologia que viabilizou a realização deste trabalho.

À Ajinomoto pelo fornecimento da transglutaminase e apoio bibliográfico utilizados para a realização deste trabalho

À Fonterra pelo fornecimento do leite em pó utilizado na preparação das bebidas.

À Tangará pelo fornecimento do soro de leite em pó também utilizado na preparação das bebidas.

À IFF – International Fragrances and Flavors pelo apoio incrível na realização da análise sensorial.

## RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos da aplicação da enzima transglutaminase microbiana (MTG) em diferentes concentrações e diferentes temperaturas de incubação na produção de bebida láctea fermentada reconstituída e otimização das condições de atuação da enzima. Para a produção da bebida foi utilizado leite em pó e soro de leite em pó, com o equivalente a 40% de soro líquido. Foi utilizada uma preparação enzimática com glutatona (MTG+G), a qual melhora a atividade da MTG evitando um tratamento térmico adicional no processo de produção de leites fermentados com MTG, tanto para inativar um inibidor natural da MTG presente no leite cru ou pasteurizado, como para inativar a enzima, esta é adicionada antes do tratamento térmico usual para esses produtos e inativada por ele. As bebidas elaboradas com e sem tratamento enzimático, segundo o planejamento experimental, foram comparadas por meio de análises físico-químicas e análise sensorial. Foram realizados, em duplicata, 11 ensaios mais o controle sem tratamento enzimático, com diferentes concentrações enzimáticas e diferentes temperaturas de tratamento enzimático. Foram realizadas medidas de viscosidade, de sinérese por 2 métodos: centrifugação e espontânea, composição centesimal, pH e análise sensorial. Foi utilizado o delineamento experimental, planejamento composto central, para verificar as melhores concentrações e temperaturas de incubação para se obter as maiores viscosidades e menores índices de sinérese sem descaracterizar a bebida. Em relação à viscosidade as bebidas com concentrações enzimáticas maiores ou iguais a 0,006% (m/m) incubadas a temperaturas iguais ou maiores do que 30 °C produziram aumento de viscosidade em relação ao controle, sendo que a melhor combinação foi de 0,034% (m/m) de preparação enzimática incubada a 40 °C, essa bebida apresentou uma viscosidade 81,3% maior do que a do controle. Em relação à sinérese, pelo método da centrifugação após 14 dias de armazenagem as bebidas com concentrações enzimáticas iguais ou acima de 0,03% e ou incubadas em temperaturas iguais ou maiores do que 50 °C apresentaram redução de sinérese em relação ao controle, no mesmo período a sinérese espontânea das bebidas com concentrações enzimáticas iguais ou maiores a 0,01% incubadas em temperaturas iguais ou maiores a 30 °C apresentou redução em relação ao controle, após 21 e 28 dias em ambos os métodos todas as bebidas apresentaram redução de sinérese em relação ao controle e não foi mais observada diferença entre elas. Quanto à análise sensorial foram realizados testes de aceitação e preferência no controle e na bebida do ponto ótimo da viscosidade e da sinérese e os resultados mostraram uma preferência de 77% da bebida tratada com enzima.

Palavras-chave: Bebida láctea fermentada. Transglutaminase. Viscosidade. Sinérese.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effects of the application of microbial transglutaminase enzyme (MTG) with different concentrations and incubation temperatures in the production of reconstituted fermented dairy beverage and optimization of the enzyme usage conditions. For the beverage production was used whole milk powder and whey powder with the equivalent to 40% of liquid whey. It was used an enzyme preparation containing glutathione (MTG+G), which improves the MTG activity avoiding one more heating step in the production process of fermented dairy products with MTG, either to inactivate a natural MTG inhibitor present in raw or pasteurized milk or either to inactivate the enzyme. The enzyme is added and incubated before the usual heating step for these products and inactivated by it. The dairy beverages elaborated with and without enzyme treatment, according to the experimental design, were compared through physical-chemical analyses and sensory evaluation. In duplicate, 11 trials plus de control with no enzyme treatment were run with different MTG+G concentrations and with different temperatures of enzyme treatment. In the obtained beverages, measures of viscosity and syneresis by 2 methods: centrifugation and spontaneous, were carried out as well as centesimal composition determinations, pH and sensory evaluation. It was used the central composite design to verify the best concentrations and incubation temperatures to have the highest viscosities and the lowest syneresis indexes keeping the beverage characteristics. With respect to the viscosity the results showed that beverages with enzyme concentrations equal or higher than 0.006% (w/w) with incubation temperatures equal or higher than 30 °C produced significant viscosity increase compared to the control, being the best combination 0.034% (w/w) of enzyme preparation incubated at 40 °C that presented a viscosity 81.3% higher than the control beverage. For syneresis by centrifugation after 14 days of storage beverages with enzyme concentrations equal or higher than 0.03% and or incubated at temperatures equal or higher than 50 °C presented lower syneresis indexes compared to the control beverage. For the same period, spontaneous syneresis of beverages with enzyme concentrations equal or higher than 0.01% incubated at temperatures equal or higher than 30 °C presented lower syneresis indexes than the control. After 21 and 28 days of storage, in both methods, all beverages presented syneresis indexes lower than the control and no difference between the treated samples. With respect to the sensory evaluation, acceptability and preference tests were conducted in the control and in the beverage of the optimum point for viscosity and syneresis and the results showed a preference 77% for the enzyme treated beverage.

Keywords: Fermented dairy beverage. Transglutaminase. Viscosity. Syneresis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Micrografia eletrônica de uma micela de caseína, barra de escala = 200 nm	20
Figura 2	Imagem tridimensional da estrutura da $\beta$ -lactoglobulina	21
Figura 3	Representação esquemática da desnaturação e agregação da $\beta$ -lactoglobulina no soro sob a influência de calor e agitação	22
Figura 4	Curva de desnaturação da $\beta$ -lactoglobulina	22
Figura 5	Efeito do tratamento térmico do leite na viscosidade do gel versus o tempo de incubação (43 °C)	23
Figura 6	Reações catalisadas pela TG - (A) acil-transferência, (B) ligação cruzada e (C) deamidação	32
Figura 7	Representação tridimensional da transglutaminase microbiana	34
Figura 8	Estrutura primária da MTG; (*) Indica o possível resíduo ativo de cisteína	35
Figura 9	Atividade relativa da MTG em relação ao pH	36
Figura 10	Atividade relativa da MTG em relação à temperatura	36
Figura 11	Reação de ligação cruzada entre lisina e ácido glutâmico induzida por MTG	39
Figura 12	Efeito da MTG na força do gel de uma solução de caseinato incubada a 37 °C em pH 6,5 por 1 h. Concentração protéica: 10% (m/m)	40
Figura 13	Viscosidade de caseinato de sódio tratado com MTG	41
Figura 14	Imagens de iogurte desnatado batido com ou sem fortificação de proteína com caseinato de sódio, com ou sem ligações cruzadas por MTG adicionada simultaneamente durante a fermentação. Produto após 6 semanas de armazenagem a 4 °C; (A), (C) e (E) sem MTG; (B), (D) e (F) com MTG	46
Figura 15	Fluxograma do processo de produção das bebidas lácteas fermentadas	60
Figura 16	Curvas de fermentação das amostras	67
Figura 17	Curvas de viscosidades de todas as amostras durante a vida de prateleira	69
Figura 18	Gráfico da distribuição dos resíduos ao longo da curva normal – viscosidade	73



Figura 19	Superfície de resposta do modelo – viscosidade dos ensaios descritos na tabela 14 após 4 dias de armazenagem	74
Figura 20	Curvas de contorno do modelo – viscosidade dos ensaios descritos na tabela 14 após 4 dias de armazenagem	75
Figura 21	Comportamentos reológicos das amostras controle, T1, T2, T6, T7, T9	77
Figura 22	Curvas do percentual de sinérese por centrifugação de todas as amostras durante a vida de prateleira	78
Figura 23	Gráfico da distribuição dos resíduos ao longo da curva normal – sinérese pelo método da centrifugação após 14 dias	81
Figura 24	Superfície de resposta do modelo – sinérese por centrifugação dos ensaios descritos na tabela 15 após 14 dias de armazenagem	82
Figura 25	Curvas de contorno do modelo – sinérese por centrifugação dos ensaios descritos na tabela 15 após 14 dias de armazenagem	82
Figura 26	Curvas do percentual de sinérese espontânea de todas as amostras durante a vida de prateleira	84
Figura 27	Variação do pH das amostras durante a armazenagem	89
Figura 28	Resultados para aceitação geral	90
Figura 29	Resultados para aceitação de sabor	91
Figura 30	Comparação da preferência de sabor e acidez do controle (padrão) com a bebida tratada com enzima (enzima)	92
Figura 31	Comparação da preferência de consistência entre o controle (padrão) com a bebida tratada com enzima (enzima)	92
Figura 32	Resultados para intenção de compra entre o controle (padrão) com a bebida tratada com enzima (enzima)	93
Figura 33	Resultados para preferência	94

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Evolução do mercado de bebidas lácteas e iogurtes líquidos em toneladas	15
Tabela 2	Frações das proteínas do leite	19
Tabela 3	Composição média de soro de queijos mussarela e minas-padrão e composição típica do soro em pó	28
Tabela 4	Atividade da TG: relação entre temperatura e tempo de reação	37
Tabela 5	Reatividade da MTG para várias proteínas	37
Tabela 6	Planejamento experimental: ensaios com as respectivas variáveis codificadas e reais	62
Tabela 7	Formulação da base da bebida láctea fermentada	62
Tabela 8	Formulações das amostras	63
Tabela 9	Composição dos ingredientes utilizados	63
Tabela 10	Composição estimada para as amostras	64
Tabela 11	Resultados físico-químicos do controle e do ensaio T9 (0,02% de MTG+G incubada a 40 °C)	66
Tabela 12	Equivalência: concentração de preparação enzimática com unidades de enzima (U) por grama de proteína	67
Tabela 13	Aumento percentual das viscosidades das amostras em relação ao controle	70
Tabela 14	Planejamento experimental x resultados obtidos de viscosidade	73
Tabela 15	Planejamento experimental x resultados obtidos de sinérese após 14, 21 e 28 dias pelo método da centrifugação	80
Tabela 16	Planejamento experimental x resultados obtidos de sinérese espontânea após 14, 21 e 28 dias	86
Tabela 17	Comparação da redução da sinérese dos dois métodos em relação ao controle durante a vida de prateleira	87
Tabela 18	Redução percentual da sinérese das amostras em relação ao controle dos dois métodos durante a vida de prateleira	88
Tabela 19	Resultados para aceitação geral e sabor	91
Tabela 20	Resultados para intensidade de sabor, acidez, consistência e cremosidade	91
Tabela 21	Resultados para intenção de compra	93

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	12
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	15
2.1 BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA	15
<b>2.1.1 Histórico e produção no Brasil</b>	15
<b>2.1.2 Classificação e características</b>	15
<b>2.1.3 Processo de fabricação</b>	16
<b>2.1.4 Ingredientes utilizados</b>	26
2.1.4.1 Leite e leite em pó	26
2.1.4.2 Soro de leite e soro de leite em pó	27
2.1.4.3 Fermento lácteo	28
2.1.4.4 Outros ingredientes	30
2.2 ENZIMA TRANSGLUTAMINASE (TG)	30
<b>2.2.1 Mecanismos e características da TG</b>	31
<b>2.2.2 Transglutaminase de origem microbiana (MTG)</b>	33
2.2.2.1 Processo de fabricação da MTG	33
2.2.2.2 Propriedades da MTG	34
2.2.2.3 Propriedades funcionais da MTG	38
2.2.2.4 Aplicações em derivados lácteos	42
2.2.2.4.1 Aplicação em iogurtes	43
2.3 VISCOSIDADE E SINÉRESE	48
<b>2.3.1 Viscosidade</b>	48
<b>2.3.2 Sinérese</b>	50
2.4 ANÁLISE SENSORIAL	51
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	54
3.1 MATERIAIS	54
<b>3.1.1 Materiais de consumo</b>	54

3.1.1.1 Leite em pó integral	54
3.1.1.2 Soro de leite em pó	54
3.1.1.3 Fermento lácteo	54
3.1.1.4 Enzima transglutaminase ACTIVA <sup>®</sup> MP e ACTIVA <sup>®</sup> YG	55
3.1.1.6 Outros	55
<b>3.1.2 Equipamentos</b>	56
3.1.2.1 Recipiente de aço inoxidável com agitação	56
3.1.2.2 Estufa com renovação e circulação de ar <i>Marconi mod. MA037</i>	56
3.1.2.3 Potenciômetro <i>Micronal mod. B-474</i>	56
3.1.2.4 Bloco digestor <i>Tecnal mod. 40/25</i>	56
3.1.2.5 Destilador de Nitrogênio <i>Tecnal mod. TE-036/1</i>	56
3.1.2.6 Centrifugador <i>Beloinox – para análise de gordura</i>	57
3.1.2.7 Centrifugador <i>Fanem - Excelsa 2</i>	57
3.1.2.8 Bomba de vácuo <i>Tecnal mod. TE 058</i>	57
3.1.2.9 Reômetro digital <i>Brookfield modelo DV-III</i> com banho termostático	57
3.1.2.10 Agitador mecânico <i>Fisatom mod. 713</i>	57
3.1.2.11 Outros	58
<b>3.2 MÉTODOS</b>	58
<b>3.2.1 Desenvolvimento do trabalho</b>	58
<b>3.2.2 Processo de fabricação de bebida láctea fermentada</b>	60
<b>3.2.3 Otimização das condições de aplicação da enzima transglutaminase</b>	61
<b>3.2.4 Fórmulas testadas e composição estimada das amostras</b>	62
<b>3.2.5 Análises físico-químicas</b>	64
<b>3.2.6 Análise sensorial das amostras</b>	65
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	66
4.1 COMPOSIÇÃO DO CONTROLE E DA BEBIDA TRATADA COM 0,02% DE MTG+G A 40 °C	66
4.2 CURVAS DE FERMENTAÇÃO DAS AMOSTRAS OBTIDAS NOS ENSAIOS	67

4.3 VISCOSIDADE APARENTE	68
4.3.1 Otimização das condições de atuação da enzima – resultados de viscosidade	72
4.3.2 Comportamento reológico das bebidas	76
4.4 SINÉRESE	77
4.4.1 Comparação do índice de sinérese das amostras em relação ao controle e durante a vida de prateleira – método da centrifugação	77
4.4.2 Otimização das condições de atuação da enzima – resultados de sinérese por centrifugação	80
4.4.3 Comparação do percentual de sinérese espontânea das amostras em relação ao controle e durante a vida de prateleira	84
4.4.4 Otimização das condições de atuação da enzima – resultados de sinérese espontânea	86
4.4.5 Comparação dos métodos – centrifugação x espontânea	87
4.5 VARIAÇÃO DO pH DURANTE A VIDA DE PRATELEIRA	89
4.6 RESULTADOS DA ANÁLISE SENSORIAL	90
4.6.1 Aceitação geral e sabor	90
4.6.2 Intensidade de sabor, acidez, cremosidade e consistência	91
4.6.3 Intenção de compra	93
4.6.4 Preferência	93
5 CONCLUSÕES	95
REFERÊNCIAS	96
ANEXO I - Especificação e certificado de análises - ACTIVA <sup>®</sup> MP	105
ANEXO II - Especificação e certificado de análises - ACTIVA <sup>®</sup> YG	107
ANEXO III - Especificação e certificado de análises - leite em pó integral	109
ANEXO IV - Certificado de análises - soro de leite em pó	111
ANEXO V - Ficha técnica - fermento lácteo	112
ANEXO VI - Questionário da análise sensorial	114

## 1 INTRODUÇÃO

O soro de queijo ainda representa um importante agente poluidor devido ao seu alto conteúdo de matéria orgânica e aos altos volumes gerados que são descartados como efluente no ambiente. Para se produzir 1 kg de queijo, 9 kg de soro são gerados (SISO, 1996) restando ao redor de 55% dos nutrientes do leite (ALMEIDA, BONASSI & ROÇA, 2001). Uma indústria que processa 100.000 litros de leite/dia gera aproximadamente a mesma quantidade de matéria orgânica no seu efluente que geraria uma cidade de 55.000 habitantes.

Apesar de várias possibilidades de utilização do soro terem sido estudadas nos últimos 50 anos, aproximadamente metade da produção mundial não é tratada e descartada como efluente, a outra metade aproximadamente 50% é utilizada diretamente na forma líquida e o resto transformada em produtos alimentícios como: soro em pó, lactose e concentrados protéicos (SISO, 1996).

A utilização de soro de queijo na elaboração de bebidas lácteas constitui-se em uma forma racional de aproveitamento deste produto secundário que apresenta excelente valor nutritivo. O consumo dessas bebidas fermentadas que se caracterizam por apresentar baixa viscosidade tem aumentado de maneira notável (ALMEIDA, BONASSI & ROÇA, 2001). Segundo a DATAMARK (2009) o consumo de bebidas lácteas fermentadas no Brasil apresentou um crescimento de 78% de 2002 a 2009.

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea, bebida láctea é o produto resultante da mistura do leite e soro de leite adicionado ou não de produtos ou substâncias alimentícias, gordura vegetal, leite fermentado, fermentos lácteos selecionados e outros produtos lácteos, onde a base láctea representa pelo menos 51% (m/m) do total de ingredientes do produto. Sendo que a fermentada deve ser adicionada de microorganismos específicos e ou de leite fermentado. Para bebidas lácteas fermentadas o teor mínimo de proteínas lácteas no produto final é de 1,0% (m/m) para o produto com adições e de 1,7% (m/m) para o sem adições (BRASIL, 2005).

Foi observado que o aumento da quantidade de soro na produção de bebida láctea fermentada diminui a viscosidade da bebida decorrente da diminuição de sólidos (ALMEIDA, BONASSI & ROÇA, 2001), e que o aumento da adição de soro em pó desmineralizado em substituição parcial do leite em pó para a produção de iogurte diminui a sua consistência (PENNA, BARUFFALDI & OLIVEIRA, 1997), e ainda que a substituição parcial do leite em pó usado para fortificação de iogurte por soro em pó aumenta a sinérese do iogurte a medida que o nível de substituição é aumentado (GONZÁLEZ-MARTÍNEZ et al., 2002).

O uso de enzimas para modificar as propriedades funcionais de alimentos é uma área que tem atraído interesse considerável porque os consumidores percebem as enzimas

como mais “naturais” do que as substâncias químicas. Enzimas também são favorecidas porque requerem condições mais brandas, tem alta especificidade, requerem somente quantidades catalíticas e tem menor probabilidade de gerar produtos tóxicos. Dessa forma o uso de enzimas está se tornando comum em várias indústrias para melhorar as propriedades funcionais de seus alimentos (GERRARD, 2002).

A enzima transglutaminase (TG, EC 2.3.2.13), está naturalmente presente na maioria dos tecidos animais e fluidos corpóreos, e está envolvida em vários processos biológicos, incluindo a coagulação sanguínea (Fator XIIIa), a cicatrização de ferimentos, a queratinização da epiderme e o endurecimento da membrana eritrócita. (YOKOYAMA, NIO & KIKUCHI, 2004).

Basicamente em alimentos que contém proteínas, a TG catalisa reações de acil-transferência, deamidações e ligações cruzadas intermoleculares entre as proteínas, sendo essas últimas as responsáveis pela formação de polímeros, que parece ser a reação mais interessante para o processamento de alimentos (LORENZEN, 2007).

Comercialmente a TG é produzida por fermentação microbológica (cepas de *Streptovorticillium mobaraense*), separada, purificada e estabilizada para a utilização em alimentos, sendo denominada transglutaminase microbiana (MTG) (ZHU et al., 1995). Com a disponibilidade da enzima de uma fonte microbiana, suas aplicações na indústria de alimentos estão sendo amplamente investigadas (HINZ et al., 2007). A habilidade da TG de modificar as propriedades técnicas-funcionais dos alimentos protéicos parece ser uma das mais inovadoras utilizações de enzimas em tecnologia de alimentos da última década (LORENZEN, 2007).

Dentre as proteínas lácteas, as frações de caseína representam substratos favoráveis para a TG, principalmente porque as suas cadeias abertas são altamente acessíveis e flexíveis (BÖNISCH, TOLKACH & KULOSIK, 2006), sendo que há um aumento dessa suscetibilidade no leite tratado termicamente, devido à inativação de um inibidor natural da MTG presente em leite cru ou pasteurizado (BÖNISCH, LUBER & KULOZIK, 2004). Proteínas de soro na sua estrutura globular nativa, por comparação, são menos suscetíveis às reações de ligação cruzada, principalmente devido à estabilização da conformação globular pelas ligações dissulfídicas limitando a suscetibilidade dos sítios para a ligação cruzada. Entretanto, as ligações cruzadas de proteínas de soro podem ser intensificadas através de sua desnaturação prévia, tanto por tratamento térmico (SHARMA, LORENZEN & QVIST, 2001) como por adição de um agente redutor (ABOUMAHMOUD & SAVELLO, 1990).

Devido às ligações intra e intermoleculares que ocorrem nas frações de caseína e nas proteínas do soro, a aplicação da TG em bebidas lácteas fermentadas pode ser uma opção para aumentar a viscosidade e a cremosidade, melhorar o corpo e diminuir a sinérese nesses produtos. Gauche et al., (2009) verificaram que iogurtes adicionados de 20% e 30%

de soro e tratados com MTG, tiveram aumento de viscosidade e consistência e redução da sinérese quando comparados com os mesmos iogurtes sem o tratamento enzimático.

A adição de glutathione, um agente redutor, melhora a atividade da MTG, permitindo o seu uso em leite cru ou pasteurizado, evitando a necessidade de um tratamento térmico adicional no processo de produção de leites fermentados, tanto para inativar o inibidor da MTG como para inativar a própria enzima, o que poderia não ser técnica ou economicamente viável (MIWA, 2007). A preparação enzimática utilizada nesse trabalho contém glutathione e é referida como MTG+G.

O uso da TG como coadjuvante opcional de tecnologia/elaboração e “quantum satis” em bebidas lácteas foi aprovado no Brasil (BRASIL, 2005).

O objetivo desse trabalho foi a avaliação dos efeitos da aplicação da MTG+G em diferentes concentrações e diferentes temperaturas de incubação na produção de bebida láctea fermentada com alta concentração de soro, sem mudanças significativas no processo tradicional de produção de iogurtes. Esses efeitos foram avaliados por meio de determinações de viscosidade e sinérese, do acompanhamento da pós-acidificação durante o armazenamento por 30 dias, análise sensorial e análises físico-químicas, realizadas no controle e nas bebidas tratadas enzimaticamente produzidas segundo um delineamento composto central.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA

#### 2.1.1 Histórico e produção no Brasil

A primeira regulamentação no Brasil para bebida láctea foi feita pela Instrução Normativa nº 36, de 31 de outubro de 2000 (BRASIL, 2000). Atualmente, é regulamentada pela instrução normativa nº 16, de 23 de agosto de 2005, que aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea (BRASIL, 2005).

No Brasil, a produção de bebidas lácteas é uma das principais opções de aproveitamento do soro de leite, e as mais comercializadas são as bebidas fermentadas com características semelhantes ao iogurte (CAPITANI et al., 2005). A produção de bebidas lácteas no Brasil em 2008 foi de aproximadamente 267.000 toneladas, 11,6% maior do que a produção de iogurte líquido. O consumo de bebidas lácteas de 1999 a 2008 aumentou 164% (DATAMARK, 2009).

A tabela 1 mostra a evolução do mercado de bebidas lácteas comparado ao do iogurte líquido desde 1999 até 2008.

Tabela 1 – Evolução do mercado de bebidas lácteas e iogurtes líquidos em toneladas

	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Bebida láctea:	101.147	104.311	110.288	116.104	147.933	179.323	174.137	232.893	243.152	266.727
Iogurte líquido:	92.759	91.495	91.008	72.652	50.901	92.593	104.898	118.369	214.486	238.926

FONTE: Adaptada de DATAMARK, 2009.

#### 2.1.2 Classificação e características

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea, bebida láctea é o produto resultante da mistura do leite e soro de leite adicionado ou não de produtos ou substâncias alimentícias, gordura vegetal, leite fermentado, fermentos lácteos selecionados e outros produtos lácteos, onde a base láctea representa pelo menos 51% (m/m) do total de ingredientes do produto. No caso específico para bebida láctea fermentada

o produto deve obedecer à descrição acima e deve ser fermentado mediante a ação de cultivo de microorganismos específicos e ou adicionado de leite fermentado e que não poderá ser submetido a tratamento térmico após a fermentação. A contagem total de bactérias lácticas viáveis deve ser no mínimo de  $10^6$  UFC/g, no produto final, durante todo o prazo de validade. Para bebidas lácteas fermentadas o teor mínimo de proteínas lácteas no produto final é de 1,0% (m/m) para o produto com adições e de 1,7% (m/m) para o sem adições (BRASIL, 2005).

A bebida láctea fermentada é caracterizada por apresentar baixa viscosidade e por ter uma relação leite-soro um pouco aleatória e não bem definida (ALMEIDA, BONASSI & ROÇA, 2001).

Adições de 30, 40 e 50% de soro líquido foram usadas no trabalho de Almeida, Bonassi & Roça, (2001) e foi observado que a viscosidade da bebida láctea fermentada diminui a medida que se diminui o teor de sólidos decorrente do aumento da quantidade de soro.

Penna, Baruffaldi & Oliveira, (1997) observaram que o aumento da adição de soro de leite em pó desmineralizado no leite para a produção de iogurte diminui a sua consistência. Nesse trabalho foram utilizados níveis de adição de 0,0; 1,5 e 3,0% de soro de leite desmineralizado em pó, correspondendo à aproximadamente a adição de 0,0; 24,0 e 48,0% de soro líquido, considerando o extrato seco médio do soro líquido de aproximadamente 6,3% (TEIXEIRA & FONSECA, 2008). Em iogurte produzido com leite em pó e com substituição parcial por soro em pó, González-Martínez et al., (2002) observaram um aumento maior de sinérese à medida que o nível de substituição de leite em pó por soro em pó foi aumentado.

### **2.1.3 Processo de fabricação**

A bebida láctea deve ser fermentada com adição de cultivos de bactérias lácticas, cultivos de bactérias lácticas específicas e ou adicionada de leite fermentado, sendo que os microorganismos dos cultivos utilizados e ou do leite fermentado adicionado devem estar ativos e viáveis e em concentração igual ou superior a  $10^6$  UFC/g desde a produção até o final do prazo de validade (BRASIL, 2005).

Nos trabalhos de Almeida, Bonassi & Roça, (2001), Thamer & Penna, (2005) e (2006), Cunha et al., (2008) e Gauche et al., (2009) o soro foi adicionado ao leite antes do tratamento térmico, a mistura em seguida foi submetida à fermentação, resfriamento, envase e armazenagem. Enquanto que nos trabalhos de Sivieri & Oliveira, (2002) e Penna, Oliveira & Tamine, (2003), primeiro obteve-se um iogurte a partir de leite que foi resfriado, pa-

ralelamente o soro foi tratado termicamente resfriado e adicionado ao iogurte antes do envase e armazenagem.

Para os cinco primeiros trabalhos citados os processos de fabricação foram similares aos utilizados em iogurtes de acordo com Tamine & Robinson, (1999), e nos outros foi primeiro obtido um iogurte para depois ser misturado ao soro. Segundo Tamine & Robinson, (1999), os leites fermentados diferem apenas em relação ao tipo de microorganismo utilizado.

Industrialmente o leite chega à planta em caminhões-tanque, após análises físico-químicas e microbiológicas o leite é aceito e então geralmente o leite é filtrado para remover contaminantes (palha, pêlos e outras partículas), normalmente são usados filtros de aço inoxidável, também a remoção dessas partículas pode ser feita por uma separadora (centrífuga). Após a filtração o leite é resfriado a menos de 5 °C utilizando-se um trocador de calor a placas e armazenado em silos (TAMINE & ROBINSON, 1999).

Após a armazenagem é feita a padronização da gordura, normalmente utiliza-se uma separadora onde é possível determinar o percentual de gordura desejado no leite que será utilizado na fabricação do iogurte e obtendo-se creme por outra saída da separadora (TAMINE & ROBINSON, 1999).

Dependendo do tipo de leite fermentado é feita a fortificação de sólidos lácteos, normalmente é adicionado um dos seguintes produtos: leite em pó, soro em pó, concentrado protéico de soro de leite, leitelho em pó e caseinatos. A fortificação é feita com o objetivo de modificar as propriedades físicas e ou sensoriais do iogurte (TAMINE & ROBINSON, 1999). Bhullar, Uddin & Shah, (2002) fortificaram iogurtes com 2% de soro em pó, leite em pó desnatado e concentrado protéico de soro e compararam com o iogurte sem fortificação, foi observado um aumento de firmeza em todos os iogurtes fortificados sendo que o iogurte adicionado de concentrado protéico apresentou a maior firmeza, em relação à viscosidade todos os fortificados apresentaram maior viscosidade. Em iogurtes firmes desnatados Isleten & Karagul-Yuceer, (2006) observaram que os iogurtes adicionados de isolado protéico de soro ou de caseinato de sódio apresentaram maior viscosidade e menor sinérese do que o iogurte adicionado de leite em pó desnatado. Saint-Eve et al., (2006) observaram que a intensidade de sabor e a intensidade de notas frutais eram menores em iogurtes com maior quantidade de caseinato de sódio. Soukolis et al., (2007) em seu trabalho relataram que o iogurte fortificado com concentrado protéico de leite apresentou maior firmeza do que os fortificados com leite em pó desnatado e soro de leite, sendo esse último o que apresentou menor viscosidade e menor aceitação na avaliação sensorial. Outra maneira de fazer essa fortificação é através da concentração do leite padronizado por evaporação ou por membrana. No caso do iogurte líquido normalmente essa fortificação não ocorre (TAMINE & ROBINSON, 1999).

A próxima etapa geralmente é a homogeneização, os principais motivos para realizá-la é prevenir a formação de uma camada de gordura na superfície durante o período de incubação e para garantir uma distribuição uniforme da gordura do leite (TETRA PAK, 1995). O diâmetro dos glóbulos de gordura no leite varia de 1 a 10  $\mu\text{m}$  com uma média de 3,5  $\mu\text{m}$ , o objetivo da homogeneização é reduzir o diâmetro médio dos glóbulos para  $< 2 \mu\text{m}$  e com isso prevenir a formação de aglomeração, a tendência da gordura de subir para a superfície e reduzir a aglutinação devido à adsorção das micelas e submicelas de caseína (TAMINE & ROBINSON, 1999).

A homogeneização também melhora a estabilidade e a consistência de produtos fermentados mesmo daqueles com baixos teores de gordura (TETRA PAK, 1995). Devido à redução do tamanho do glóbulo de gordura e o aumento da adsorção sobre a micela de caseína, ocorre um aumento do volume efetivo da matéria suspensa o que ocasiona um aumento da viscosidade (TAMINE & ROBINSON, 1999; WALSTRA, WOUTERS & GEURTS, 2006). A homogeneização pode ocasionar algumas mudanças nas proteínas do leite. Pode ocorrer alguma desnaturação das soroproteínas, interações entre a caseína e as soroproteínas podem acontecer como resultado da desnaturação dessas últimas e ou a uma mudança no balanço de sais e pode ser observada a produção de compostos sulfidrílicos. Os efeitos desejados que melhoram a estabilidade do produto final somente podem ser alcançados se forem utilizadas pressões e temperaturas corretas de homogeneização. Observa-se também um aumento da capacidade de se ligar à água do coágulo e consequente redução da sinérese que pode ser devido à desnaturação das soroproteínas e do aumento da quantidade do material que compõe a membrana do glóbulo na fase aquosa, por exemplo: fosfolípidos. A combinação homogeneização e tratamento térmico aumenta as interações mencionadas anteriormente (TAMINE & ROBINSON, 1999).

Como uma recomendação geral o leite deve ser homogeneizado a 20 – 25 MPa e a 65 – 70  $^{\circ}\text{C}$  para se obter o máximo de funcionalidade no produto. A questão sobre o uso de um ou dois estágios é discutida, de um modo geral depende do desenho do sistema de homogeneização (TETRA PAK, 1995).

A próxima etapa é o tratamento térmico e os seus efeitos no iogurte podem ser resumidos, como:

- destruição ou eliminação de patógenos e outros microorganismos indesejados;
- produção de fatores estimuladores/inibidores para o fermento do iogurte
- mudanças nas propriedades físico-químicas dos constituintes do leite, as quais são relevantes na produção de iogurte.

O binômio tempo-temperatura aplicado varia de  $\leq 65\text{ }^{\circ}\text{C}$  por alguns segundos (termização) até  $150\text{ }^{\circ}\text{C}$  por alguns segundos (ultrapasteurização), mas as combinações mais utilizadas na indústria são:  $85\text{ }^{\circ}\text{C}/30$  minutos e  $90 - 95\text{ }^{\circ}\text{C}/5$  minutos (TAMINE & ROBINSON, 1999).

Apesar dos seus constituintes serem principalmente água, carboidratos, gordura, proteínas e minerais, o leite tem uma estrutura muito complexa, estes diferentes componentes mostram-se dispersos entre dois sistemas coloidais, os glóbulos de gordura e suas membranas e as micelas de caseína, em geral esses dois sistemas são estáveis termicamente, mas muitas mudanças ocorrem durante o tratamento térmico (FOX & McSWEENEY, 1998; TAMINE & ROBINSON, 1999).

O sistema protéico do leite é composto por caseínas e proteínas de soro (TABELA 2). As caseínas formam o grupo principal de proteínas do leite, elas têm um papel importante na produção de iogurte (TAMINE & ROBINSON, 1999). Elas constituem aproximadamente 80% das proteínas do leite bovino, com 4 tipos principais:  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ -caseína em combinação com fosfato de cálcio coloidal formando agregados chamados de micelas de caseína.

Pelo menos 3 modelos para a estrutura da micela de caseína foram propostos; um modelo propõe que o interior da micela é dividido em sub-unidades (submicelas) com propriedades bem diferentes da camada externa filamentosa; outro sugere que a sub-estrutura interna assemelha-se à uma rede de cadeias de moléculas de caseína com ligações cruzadas, formando um emaranhado de moléculas e minerais; e o mais recente propõe uma polimerização que considera 2 rotas de ligação cruzada para a formação da micela, que são as ligações cruzadas entre as caseínas por meio de suas regiões hidrofóbicas e pontes envolvendo o fosfato de cálcio coloidal, sendo a  $\kappa$ -caseína um terminador da cadeia, já que não se liga muito ao cálcio (LUCEY, 2002).

Tabela 2 – Frações das proteínas do leite

<b>Caseínas</b>	76-88% do total de proteínas	
$\alpha_{s1}$	45-55%	das caseínas
$\beta$	25-35%	
$\kappa$	8-15%	
$\gamma$	3-7%	
<b>Soroproteínas</b>	15-22% do total de proteínas	
Serum albumina	0,7-1,3%	das soroproteínas
$\beta$ -lactoglobulina	7-12%	
$\alpha$ -lactalbumina	2-5%	
Imunoglobulina	1,9-3,3%	
<b>Proteose/peptonas</b>	2-6% do total de proteínas	

FONTE: Adaptado de TAMINE & ROBINSON, 1999

Dalgleish, Spagnuolo & Goff, (2004) utilizando um microscópio eletrônico de varredura de campo, realizaram micrografias de micelas individuais de caseína (FIGURA 1), e comentam que as micrografias sugerem que a superfície de uma micela de caseína é muito mais complexa do que uma simples compacta esfera coberta por filamentos relativamente curtos e apresenta muita mais “superfície” do que a implícita superfície sugerida pelo modelo esférico. As micrografias parecem mostrar que as micelas são constituídas de túbulos, os quais saem de uma estrutura mais volumosa, presumivelmente de caseínas. Os túbulos têm um diâmetro aproximado de 20 nm, o qual é consistente com as dimensões dos nanoaglomerados de fosfato de cálcio/caseína. Apesar da área da superfície ser muito grande, ainda assim a micela é protegida da aproximação de partículas grandes (como outras micelas) pelos túbulos. Por outro lado é possível notar que existe muito espaço para a aproximação de moléculas individuais de proteínas ou mesmo para pequenos agregados de proteínas. Vendo pela perspectiva de outra micela ela é impenetrável, mas pela perspectiva de uma molécula de proteína de soro ou de quimosina a camada de filamentos mostra grandes lacunas. Essas lacunas podem ser grandes o suficiente para permitir o encaixe de moléculas tão grandes como as  $\kappa$ -carragenas, as quais acredita-se que se ligam as  $\kappa$ -caseínas das micelas. É possível supor que as  $\kappa$ -caseínas estejam localizadas no final dos túbulos. Com base nas micrografias é impossível localizar individualmente as caseínas, mas está claro que a definição de “superfície” e “interior” deve ser reavaliada devido à complexidade da estrutura.

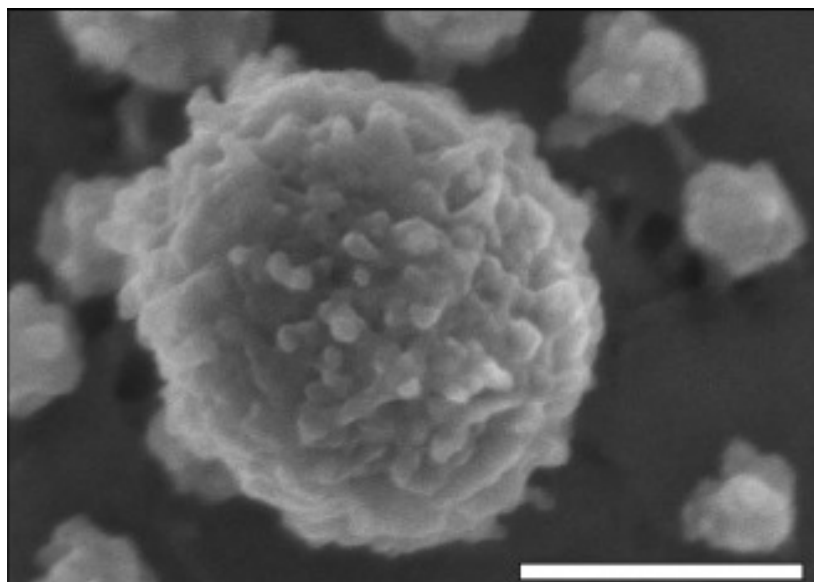


Figura 1 - Micrografia eletrônica de uma micela de caseína, barra de escala = 200 nm (DALGLEISH, SPAGNUOLO & GOFF, 2004)

As proteínas do soro estão na solução e têm forma globular e uma estrutura mais definida e compacta do que as caseínas. Essa estrutura é devida: às ligações dissulfídicas, à

falta de grupos fosfatos e ao fato de que elas não reagem com cálcio e não se agregam no seu estado nativo (TAMINE & ROBINSON, 1999). A figura 2 mostra uma imagem tridimensional da estrutura da  $\beta$ -lactoglobulina.

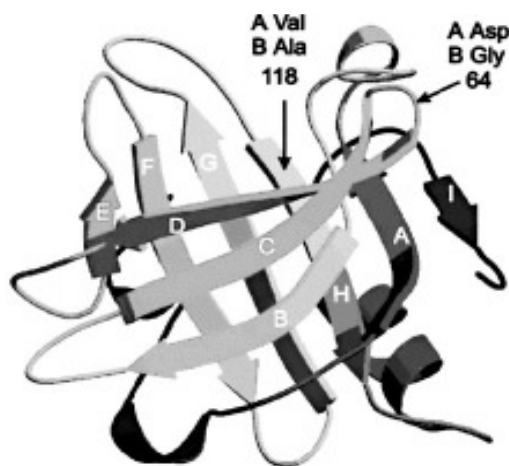


Figura 2 - Imagem tridimensional da estrutura da  $\beta$ -lactoglobulina (SGARBIERI, 2005)

Em tratamentos térmicos com temperaturas mais altas do que 70 °C as principais proteínas do soro:  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) e  $\alpha$ -lactalbumina ( $\alpha$ -lac), desnaturam. A mudança conformacional da  $\beta$ -lg induzida pela temperatura expõe as partes hidrofóbicas dos polipeptídeos e dos grupos tióis reativos. Esses grupos podem formar ligações dissulfídicas com outros grupos tióis ou pontes dissulfídicas. Durante o aquecimento do leite principalmente a  $\beta$ -lg interage de forma covalente com a  $\kappa$ -caseína presente no exterior das micelas de caseína. Entretanto, quantidades significativas de  $\alpha$ -lac e outras proteínas de soro também podem interagir com as micelas de caseína. Adicionalmente, agregados de proteínas de soro ligados dissulfidicamente são formados. Dessa forma, o leite tratado termicamente é uma complexa mistura de proteínas de soro nativas e desnaturadas e micelas de caseína, sendo que as proteínas de soro desnaturadas aparecem como agregados de proteína de soro ou associadas às micelas de caseína. As proteínas de soro formam apêndices nas micelas de caseína, formando um tipo de cobertura nas micelas que evita a aglomeração das micelas e aumenta o número de pontos de contato entre elas. Estas interações, que ocorrem no leite tratado termicamente provocam o aumento da firmeza e a menor suscetibilidade a sinérese nos géis obtidos por acidificação (FAERGEMAND & QVIST, 1997; VASBINDER et al., 2003a).

A figura 3 mostra esquematicamente a desnaturação e a agregação da  $\beta$ -lactoglobulina sob a ação do calor e agitação e a figura 4 mostra a curva de desnaturação da  $\beta$ -lactoglobulina (temperatura x tempo).

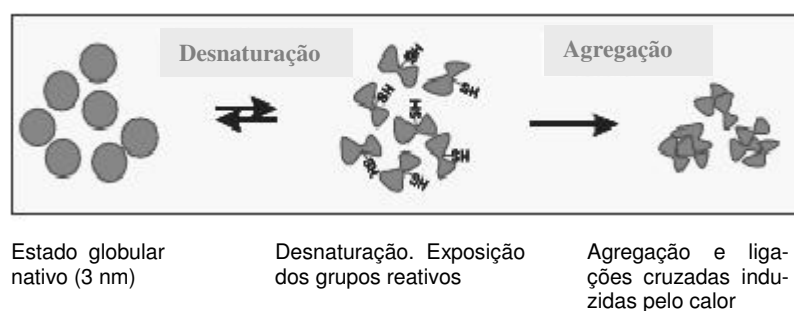


Figura 3 – Representação esquemática da desnaturação e agregação da  $\beta$ -lactoglobulina no soro sob a influência de calor e agitação (KULOSIK et al., 2003)

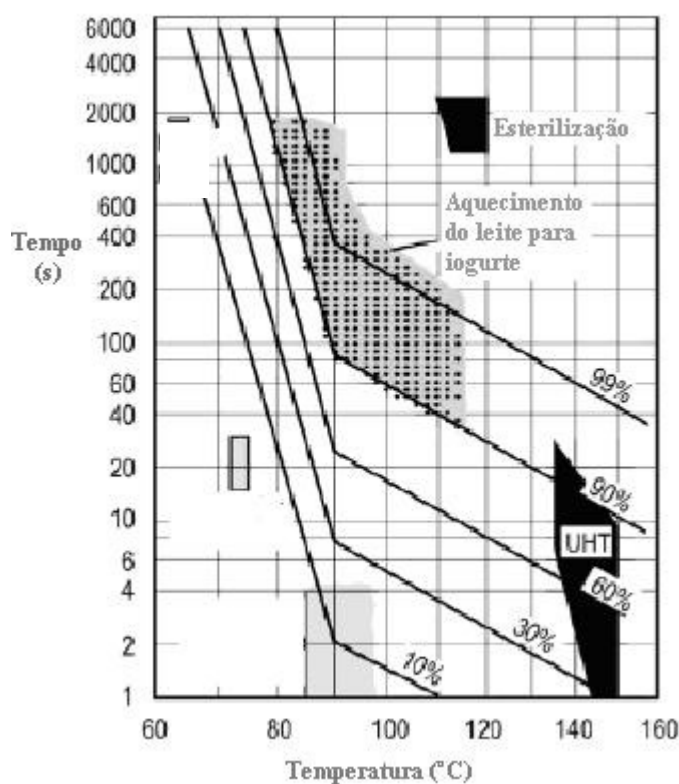


Figura 4 - Curva de desnaturação da  $\beta$ -lactoglobulina (KULOSIK et al., 2003)

Quanto maior o grau de desnaturação das proteínas do soro maior será a firmeza do gel e menor será a separação de soro, devido à ligação das proteínas de soro na superfície das micelas de caseína. Isso pode ser explorado para otimizar a textura de iogurtes (KULOSIK et al., 2003; BÖNISCH et al., 2007a).

Segundo Tamine & Robinson, (1999), as propriedades funcionais das proteínas de soro se tornam mais aparentes quando o leite é aquecido a temperaturas acima de 80 °C, elas são desnaturadas e ligam-se a  $\kappa$ -caseína para formar uma micela mais estável.



Parnell-Clunies et al., (1988) mediram a viscosidade durante a fermentação dos géis de leites tratados termicamente e sem tratamento. Como se pode observar na figura 5 as amostras tratadas apresentaram viscosidades muito maiores do que o controle (identificada como “control”) sem tratamento, indicando que há interações entre as proteínas de soro e as micelas de caseína no tratamento térmico. Na figura, V-10 corresponde a um tratamento de 85 °C/10 minutos amostra que apresentou a maior viscosidade, seguida da HTST-1,87 com tratamento térmico de 98 °C/1,87 minuto e depois pela amostra UHT-6 com 140 °C/6 segundos, indicando também que as condições do tratamento térmico influenciam na viscosidade do gel. O ponto no qual a curva começa a subir coincide com o ponto de dissociação micelar (também medido nesse trabalho) e o subsequente aumento da viscosidade. Os autores atribuíram esse comportamento às reações de agregações.

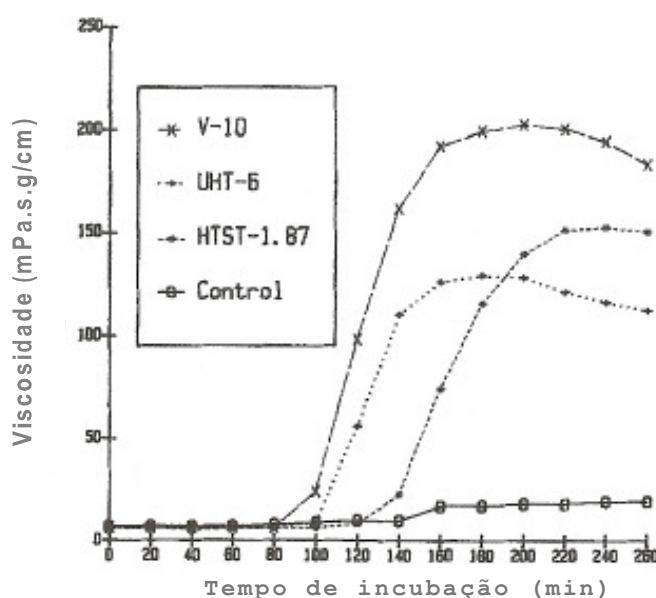


Figura 5 - Efeito do tratamento térmico do leite na viscosidade do gel versus o tempo de incubação (43 °C) (PARNELL-CLUNIES et al.,1988)

Vasbinder et al., (2003b) submeteram ao mesmo tratamento térmico (90 °C/10 minutos) leite normal e leite sem proteínas de soro (obtido por ultra e microfiltração). Esses leites foram acidificados e a elasticidade dos géis foram medidas. Eles concluíram que claramente a maior elasticidade obtida com o leite normal foi devido à presença das proteínas de soro, especificamente pela formação de apêndices de proteínas de soro sobre as micelas de caseína (observados por microscopia eletrônica) durante o tratamento térmico.

Após o tratamento térmico o leite é resfriado na temperatura ótima de fermentação da cultura utilizada, geralmente é usada uma cultura mista de *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* subesp. *bulgaricus*, sendo 40 - 45 °C a faixa de temperatura ótima de crescimento para

essa cultura. O tempo de fermentação varia com a quantidade e a concentração da cultura adicionada ao leite e a temperatura, pode ser rápido como 2,5 horas quando se usa 3% de cultura ou até 18 horas utilizando-se temperatura de incubação de 30 °C. O iogurte é formado pela fermentação lenta da lactose. Outros produtos fermentados utilizam diferentes culturas (TAMINE & ROBINSON, 1999).

Lee & Lucey, (2004) estudaram o efeito da quantidade de inóculo e da temperatura de fermentação nas propriedades físicas e na estrutura do iogurte e observaram que quanto maior a quantidade de inóculo menor o tempo para atingir o pH de 4,60, e que o pH de gelificação não se altera com o aumento de inóculo. Os autores concluíram que o uso de uma combinação de uma quantidade de inóculo de intermediária para alta (por exemplo: 2%) e uma temperatura de incubação de aproximadamente 40 °C pode conferir ao iogurte uma menor separação de soro e menos defeitos de textura.

Entretanto, o tempo de incubação, a quantidade de inóculo e a temperatura de incubação têm influência na proporção das 2 bactérias e essa proporção tem influência na qualidade do produto final, principalmente em relação ao sabor, aroma e viscosidade. Por exemplo, a proporção ideal de 1:1 entre as bactérias na temperatura de incubação de 45 °C é atingida após 2,5 horas com 2,5% de inóculo (WALSTRA, WOUTERS & GEURTS, 2006). Detalhes e fatores que influenciam a simbiose, a proporção entre o *S. thermophilus* e o *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e as conseqüências no iogurte são apresentados no item 2.1.4.3. De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados, o produto chamado de iogurte deve conter obrigatoriamente *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, e outras bactérias ácido-láticas podem ser adicionadas de forma complementar (BRASIL, 2007).

Durante a fermentação ocorre a formação do gel. Os géis lácteos têm uma enorme importância econômica, porque a gelificação é a primeira etapa crítica tanto na fabricação de queijos como de iogurte, e a aparência, microestrutura e as propriedades reológicas são características que contribuem de um modo geral para a percepção sensorial e a funcionalidade desses produtos (LUCEY, 2002).

A formação de géis durante a fabricação de certos produtos lácteos ocorre basicamente devido à desestabilização do complexo de caseína. Esses géis são irreversíveis e são classificados em diferentes grupos:

- géis formados por ação enzimática, como resultado da ação coagulante que desestabiliza a  $\kappa$ -caseína permitindo a agregação da caseína na presença de íons de cálcio;
- géis induzidos pelo calor, ocorrem em leites UHT ou evaporados quando a fração protéica não foi bem estabilizada;

- géis formados por indução ácida durante o processo de fermentação do leite, por exemplo o iogurte;
- géis induzidos pelo sal/calor, normalmente formado durante o processo de fabricação da ricota (TAMINE & ROBINSON, 1999).

As micelas de caseína são estáveis no pH natural do leite, aproximadamente 6,7; devido à presença de  $\kappa$ -caseína e sua formação filamentosa na superfície da micela. As micelas de caseína tendem a agregar-se quando a estabilidade desses filamentos é alterada por fatores, como: diminuição do pH, ação enzimática ou pela adição de álcool. O ponto isoelétrico da caseína, pH no qual a molécula tem sua carga elétrica neutralizada é de aproximadamente pH 4,60 a 20 °C, nesse ponto a solubilidade é mínima, não há mais repulsão entre as moléculas e a caseína coagula. Chegando nesse ponto através do abaixamento gradual do pH significa que a solubilidade desses filamentos diminui. A estabilidade dos filamentos permanece inalterada até pH 5,0 (a 20 °C). Então com uma pequena mudança no pH os filamentos colapsam e as micelas de caseína se agregam e formam o gel (VASBINDER et al, 2003b).

A formação do gel depende da temperatura porque o ponto isoelétrico depende da temperatura. Acidificação a baixas temperaturas diminui consideravelmente o pH no qual o gel é formado comparado a condições de temperatura ambiente. Resultados obtidos com caseinato de sódio demonstraram que aumentando a temperatura de acidificação de 20 para 40 °C aumenta o pH de gelificação (VASBINDER et al, 2003b).

Parnell-Clunies et al.,(1988) estudaram perfis de gelificação do iogurte e observaram que na temperatura de fermentação do experimento (43 °C) em pH 5,4 as micelas de caseína estão intactas (diâmetros de 100 a 250 nm são predominantes), em pH 5,1 as micelas parecem passar por um processo parcial de desintegração em sub-partículas (diâmetros de 30 a 40 nm), em pH 4,8 é evidente a formação de uma estrutura completamente diferente, consistindo de grandes agregados de caseína de forma e tamanho não especificados. Essas mudanças correlacionaram-se perfeitamente com a quantidade de cálcio iônico no meio. Quanto menor o pH, maior a quantidade de cálcio iônico até o pico quando ocorreu a dissociação das micelas em pH 5,1, depois a quantidade de cálcio iônico manteve-se constante.

A acidificação do leite diminui a estabilidade da  $\kappa$ -caseína na superfície das micelas de caseína, estas últimas têm a sua estabilização estérica diminuída e as forças de Van der Waals causam floculação (VASBINDER et al, 2003a). Estudos da dissociação das micelas de caseína e agregação durante a gelificação por indução ácida sugerem que os mecanismos envolvidos são dependentes do pH e da temperatura. Diminuindo o pH diminuem as forças repulsivas e permitem interações hidrofóbicas causando a coagulação das micelas de caseína (TAMINE & ROBINSON, 1999). Em pH mais baixos a carga negativa da caseína

diminui, o que diminui a repulsão eletrostática entre as moléculas de caseína aumentando a interação caseína-caseína, através de interações hidrofóbicas (LUCEY, 2002).

Lee & Lucey, (2006) observaram no seu trabalho com iogurte batido que houve uma diminuição do tempo de gelificação e um aumento do pH de gelificação com o aumento da temperatura do tratamento térmico e da temperatura de fermentação. Mounsey, O'Kennedy & Kelly, (2005) preparam uma solução contendo apenas caseína micelar e observaram que o ponto de gelificação dessa dispersão ocorreu em pH 4,9 a 40 °C.

No estágio final da incubação quando o pH desejado é atingido o iogurte deve ser resfriado a 15 – 22 °C para diminuir sensivelmente a atividade das bactérias. O tratamento mecânico deve ser suave para que o produto final tenha a consistência correta. O resfriamento acontece em um trocador de calor a placas, com um desenho de placas especial para garantir um tratamento mecânico mais brando. Após o resfriamento o produto é bombeado para tanques-pulmão (TETRA PAK, 1995).

No caso da adição de preparado de fruta, normalmente ela é feita em linha utilizando-se um misturador estático durante o bombeamento do iogurte para as máquinas de envase, em seguida o iogurte é armazenado em câmara fria (TETRA PAK, 1995).

Quando é usado leite reconstituído, o leite em pó deve ser misturado na água a 35-45 °C, utilizando-se um sistema de funil e bomba ou “tri-blender” para mistura e recirculação, após a adição do leite em pó a recirculação é parada e a mistura é deixada em repouso até que o leite em pó seja completamente dissolvido, isso leva aproximadamente 20 minutos (TAMINE & ROBINSON, 1999).

Como comentado anteriormente, na produção de bebida láctea fermentada o soro também pode ser adicionado no final do processo, nesse caso se obtém primeiro o leite fermentado ou o iogurte que é resfriado, o soro previamente pasteurizado é resfriado e misturado ao iogurte antes do envase, como realizado por Sivieri & Oliveira, (2002) e Penna, Oliveira & Tamine, (2003).

## **2.1.4 Ingredientes utilizados**

### **2.1.4.1 Leite e leite em pó**

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, entende-se por leite o produto oriundo da ordenha completa ininterrupta em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outras es-

pécies deve denominar-se segundo a espécie da qual proceda (BRASIL, 2002). Leite é um ingrediente obrigatório para produção de bebida láctea fermentada, e pode ser: in natura, pasteurizado, esterilizado, UHT, reconstituído, em pó, concentrado, integral, parcialmente desnatado e desnatado (BRASIL, 2005). Leite em pó é definido como o produto obtido por desidratação do leite de vaca integral, parcialmente desnatado ou desnatado e apto para a alimentação humana, mediante processos tecnologicamente adequados. O integral deve ter no mínimo 26% de gordura e o máximo de 3,5% de umidade e o desnatado no máximo 1,5% de gordura e 4,0% de umidade (BRASIL, 1997).

O leite apresenta-se como uma emulsão líquida em que a fase contínua é formada de água e substâncias hidrossolúveis ao passo que a fase interna ou descontínua é formada, principalmente, de micelas de caseína e de glóbulos de gordura. O leite de vaca, o mais importante do ponto de vista comercial e industrial, é composto de água, 87,3%, e sólidos totais, 12,7%, assim distribuídos: proteínas totais, 3,3 a 3,5%; gordura, 3,5 a 3,8%; lactose, 4,9%; além de minerais, 0,7% (SGARBIERI, 2005). A composição do leite varia com a raça do animal, tipo de alimentação, estágio da lactação e com o clima (WALSTRA, WOUTERS & GEURTS, 2006).

As proteínas do leite constituem ingredientes dos mais valorizados pelas suas excelentes propriedades nutritivas, tecnológicas e funcionais. Essas propriedades derivam da composição em aminoácidos que atendem à maioria das exigências fisiológicas do ser humano e de suas propriedades físico-químicas, que proporcionam propriedades funcionais de grande interesse tecnológico como: solubilidade, absorção e retenção de água e de gordura, capacidade emulsificante e estabilidade das emulsões, capacidade espumante e estabilidade de espuma, gelificação, formação de filmes comestíveis e biodegradáveis, formação de micropartículas, melhoria nas propriedades sensoriais e na aceitação dos produtos (SGARBIERI, 2005).

A importância, o papel, os mecanismos e as interações dessas proteínas durante o processamento do leite até a formação do gel de produtos obtidos por fermentação ácida foram comentados em detalhes no item 2.1.3.

#### 2.1.4.2 Soro de leite e soro de leite em pó

O soro de leite é definido como o produto derivado do leite, obtido durante a fabricação de queijo, caseína ou produtos similares pela separação da coalhada após a coagulação do leite e ou de produtos obtidos do leite, enquanto que o soro em pó é definido como o produto obtido pela desidratação do soro. (CODEX, 1995).

A composição e o tipo de soro obtido na indústria leiteira variam em função dos processos tecnológicos empregados, do leite utilizado e do tipo de queijo fabricado. Os principais tipos são os obtidos por coagulação enzimática, soro doce, e o por coagulação ácida, o soro ácido. Várias opções para o aproveitamento de soro podem ser utilizadas, desde o uso como matéria-prima para a obtenção de bebidas lácteas até a utilização de modernas tecnologias para a obtenção de produtos específicos, como: soros em pó desmineralizados e concentrados protéicos (TEIXEIRA & FONSECA, 2008).

O soro de leite (líquido, concentrado ou em pó) também é um ingrediente obrigatório para a fabricação de bebida láctea (BRASIL, 2005). A tabela 3 mostra as composições médias de soros provenientes da fabricação de queijos mussarela e minas-padrão e a composição típica do soro em pó.

Tabela 3 – Composição média de soro de queijos mussarela e minas-padrão e composição típica do soro em pó

%	Soro de queijo mussarela	Soro de queijo minas-padrão	Soro em pó
Proteínas	0,84	0,80	mín. 10,0
Gordura,	0,77	0,68	2,0
Lactose,	4,42	4,12	61,0
Cinzas	0,47	0,49	9,5
Sólidos totais	6,33	6,28	mín. 95,0

FONTE: Adaptado de CODEX, 1995 e TEIXEIRA & FONSECA, 2008

#### 2.1.4.3 Fermento lácteo

Iogurte é um leite fermentado produzido pela adição de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ao leite. A relação simbiótica entre essas duas bactérias ácido-láticas termofílicas tem sido utilizada durante muitos anos pelos fabricantes de iogurte (RADKE-MITCHEL & SANDINE, 1986).

Os bacilos, mais proteolíticos, aumentam o crescimento dos estreptococos através da formação de pequenos peptídeos e aminoácidos, sendo a valina o aminoácido principal. O leite contém muito pouco desses aminoácidos e os cocos que são muito pouco proteolíticos e formam os aminoácidos muito lentamente. Os cocos aumentam o crescimento dos bacilos através da formação de ácido fórmico e por uma rápida produção de dióxido de carbono. As duas bactérias decompõem a lactose em glicose e galactose. A maioria da glicose é decomposta e transformada em ácido láctico, devido à estimulação mútua durante o crescimento dessas bactérias no leite, o ácido láctico é produzido muito mais rápido do que seria

produzido por uma das culturas puras individuais. Tanto o estreptococo como o lactobacilo contribuem significativamente para a qualidade do iogurte, ambas as espécies devem estar presentes em grande número no iogurte e no inóculo. A proporção ideal entre as bactérias é de 1:1 e é afetada basicamente por 3 fatores: tempo de incubação, percentual de inóculo e temperatura de incubação. Tempos de incubação curtos normalmente levam a uma baixa acidez que ocasionará uma maior proporção de cocos, enquanto que longos tempos de incubação geram uma maior acidez e os bacilos que são menos suscetíveis a acidez, vão crescer mais do que os cocos e vão estar em maior número. O aumento da quantidade de inóculo aumenta a taxa de produção de ácido que favorece o crescimento dos bacilos e retarda o crescimento dos cocos. Os bacilos têm uma temperatura ótima de crescimento maior do que dos cocos. Uma temperatura de incubação um pouco maior do que 45 °C mudará a proporção em favor dos bacilos e temperaturas mais baixas em favor dos cocos. Na temperatura de 45 °C, a proporção ideal de 1:1 entre as bactérias é atingida após 2,5 horas com 2,5% de inóculo (WALSTRA, WOUTERS & GEURTS, 2006).

Ainda que a atividade das bactérias seja ótima a 45 °C se recomenda para alcançar a relação de 1:1 entre as bactérias incubar a 42 °C utilizando-se 2% de inóculo (TAMINE & ROBINSON, 1991). De um modo geral temperaturas entre 40 °C e 45 °C são ótimas para a produção de iogurte (TAMINE & ROBINSON, 1991 e 1999). Kurmann, Rasic & Kroger, (1992) recomendam para a produção de iogurte 2% de inóculo e temperatura de 41 ou 42 °C.

*S. thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* formam substâncias que contribuem para o sabor do iogurte e também para sua estrutura e consistência. Os principais compostos são: o ácido láctico que além de propiciar a formação do gel do iogurte pelo abaixamento do pH é um componente muito importante do sabor, é produzido em igual quantidade pelas 2 bactérias; o acetaldeído, que é um componente essencial do aroma característico do iogurte, é principalmente formado pelos bacilos; o diacetil, também importante no aroma do iogurte é produzido pelo *S. thermophilus* e em menor grau pelo *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; e os polissacarídeos produzidos pelas 2 bactérias que têm um papel importante na consistência do iogurte, principalmente do iogurte batido (WALSTRA, WOUTERS & GEURTS, 2006).

A incorporação de microorganismos probióticos como adjuntos dietéticos em diferentes produtos lácteos tem reforçado suas propriedades funcionais resultando em aumento no consumo, além de excelentes características sensoriais. Os probióticos são descritos como microorganismos vivos que quando administrado em quantidade adequada conferem benefícios a seus consumidores. Em derivados lácteos as bactérias probióticas mais utilizadas são *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* (CUNHA et al., 2008).

O cultivo de bactérias lácticas, de bactérias lácticas específicas ou leite fermentado é um ingrediente obrigatório para a produção de bebida láctea fermentada, sendo que a contagem de microorganismos viáveis no produto final deve ser  $\geq 10^6$  UFC/g (BRASIL, 2005). Dessa forma a presença de bactérias lácticas, caracteriza a bebida láctea fermentada.

#### 2.1.4.4 Outros ingredientes

Uma série de outros ingredientes opcionais lácteos e não lácteos podem ser adicionados à bebida láctea fermentada, como: creme, sólidos de origem láctea, manteiga, gordura anidra do leite, caseinatos, proteínas lácteas, leiteiro, açúcares, edulcorantes, pedaços e ou polpa e ou suco de frutas, mel, cereais, vegetais, gordura vegetal, chocolate, café, frutas secas, especiarias e outros alimentos aromatizantes naturais e inócuos e ou sabores, amidos ou amidos modificados, gelatina e outras substâncias alimentícias; desde que o produto final tenha consistência líquida (com diferentes graus de viscosidade) e mínimo de 1% (m/m) de proteínas de origem láctea para o produto com adições. Uma série de aditivos e coadjuvantes de tecnologia/elaboração também é permitida, como: acidulantes, reguladores de acidez, corantes, aromatizantes, espessantes, estabilizantes, emulsificantes, conservadores e enzimas (BRASIL, 2005).

## 2.2 ENZIMA TRANSGLUTAMINASE (TG)

As transglutaminases estão largamente distribuídas na maioria dos tecidos animais e fluidos corpóreos e estão envolvidas em vários fenômenos biológicos, como coagulação do sangue, cicatrização de ferimentos, queratinização epidérmica e endurecimento da membrana eritrócita. TGs são relatadas por serem responsáveis pela regulação do crescimento, diferenciação e proliferação celular. TGs também são encontradas em plantas, peixes e microorganismos (MOTOKI & SEGURO, 1998). Uma das TGs mais conhecidas é o fator XIII no sangue humano. Esse fator ajuda a estancar a hemorragia através da formação de ligações cruzadas de moléculas de fibrina e estabilização dos polímeros de fibrina (KURAISHI, YAMAZAKI & SUSAKI, 2001)

TGs foram primeiramente introduzidas em 1959 para descrever enzimas responsáveis pela atividade de transaminação em fígados de porquinhos-da-índia. Pesquisas sobre a aplicação de TG começaram pelo isolamento de enzimas de tecidos de mamíferos e de flui-



dos corpóreos. TG do fígado de porquinho-da-índia era a única TG comercialmente disponível até o final dos anos 80. Ainda que o uso como melhorador de textura em alimentos estivesse sendo discutido, sua fonte escassa e o complicado processo de purificação impunham um preço extremamente alto para a enzima, resultando em um baixo interesse para potenciais aplicações industriais. Adicionalmente TG requeria íon cálcio para sua ativação, o que levava a precipitação de proteínas em alguns alimentos que contém caseína, globulina de soja ou miosina (JAROS et al., 2006).

Ando et al. (1989) após selecionarem aproximadamente 5.000 cepas de microorganismos do solo, conseguiram isolar a TG do *Streptoverticillium* S-8112 e ainda a TG obtida não era dependente de íons cálcio. Como a bactéria excreta a enzima no meio o rompimento da célula não é necessário e a purificação é mais fácil (MOTOKI & SEGURO, 1998).

Devido a essas vantagens e a possibilidade de uma produção em larga escala com custos bem mais baixos pela tecnologia tradicional de fermentação, a TG microbiana (MTG) é agora amplamente difundida como uma enzima funcional em vários segmentos da indústria alimentícia (JAROS et al. 2006).

### **2.2.1 Mecanismos e características da transglutaminase (TG)**

A enzima transglutaminase (TG, EC 2.3.2.13) é uma enzima capaz de catalisar reações de acil-transferência introduzindo ligações cruzadas entre proteínas, peptídeos e várias aminas primárias. Quando os grupos  $\epsilon$ -amino de resíduos de lisina em proteínas atuam como acil-receptores, ligações  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)-Lys inter e intramoleculares são formadas. Sem as aminas primárias no sistema de reação, água se torna o acil-receptor e os grupos  $\gamma$ -carboxiamida de resíduos de glutamina são deamidados, se tornando resíduos de ácido glutâmico (ANDO et al, 1989; ZHU et al., 1995; MOTOKI & SEGURO, 1998; KURAISHI, YAMAZAKI & SUSA, 2001; YOKOYAMA, NIO & KIKUCHI, 2004). A figura 6 mostra as reações catalisadas pela TG.

Como resultado da ligação cruzada dos resíduos de glutamina e lisina de ligações peptídicas, ligações isopeptídicas  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamil)lisina e polímeros de alto peso molecular são formados (HINZ et al, 2007).

As ligações cruzadas dentro e entre proteínas catalisadas pela TG permitem então uma modificação de sua estrutura em nível molecular, o que afeta as propriedades funcionais dessas proteínas e possibilita novas maneiras de formações estruturais (MOTOKI &

SEGURO, 1998). A estrutura molecular original das proteínas determina se a ligação cruzada por TG é possível e em que extensão (HAN & DAMODARAN, 1996).

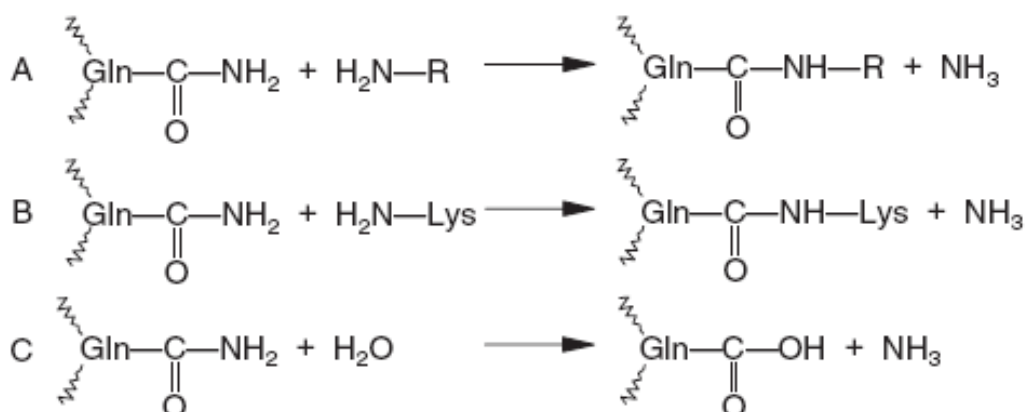


Figura 6 - Reações catalisadas pela TG - (A) acil-TRANSFERÊNCIA, (B) ligação cruzada e (C) deamidação (JAROS et al., 2006)

Em sistemas alimentícios que contém proteínas a reação de ligação cruzada (B) (FIGURA 6) ocorre antes das outras reações. As ligações  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)-Lys (inter e intramoleculares) são covalentes, portanto mais estáveis que as ligações iônicas ou hidrofóbicas. Essas ligações causam mudanças significativas nas propriedades dos alimentos que contém proteínas, mesmo pequenas quantidades dessas ligações têm um efeito significativo nas propriedades dos alimentos (KURAISHI, SAKAMOTO & SOEDA, 1996; KURAISHI, YAMAZAKI & SUSA, 2001). Essas ligações alteram drasticamente a funcionalidade das proteínas (MOTOKI & SEGURO, 1998). As ligações cruzadas covalentes de proteínas catalisadas por TG podem causar mudanças dramáticas no tamanho, conformação, estabilidade e outras propriedades das proteínas (TRUONG et al, 2004).

Devido à sua grande habilidade de induzir a formação de géis em soluções protéicas, as aplicações da TG têm sido investigadas em diversos alimentos (GERRARD, 2002). A TG tem sido usada para modificar a funcionalidade de várias proteínas, incluindo as de soja, miosina, glúten, globulina, caseína e proteínas do soro (TRUONG et al, 2004). A habilidade da TG de modificar as propriedades técnicas-funcionais dos alimentos protéicos parece ser uma das mais inovadoras utilizações de enzimas em tecnologia de alimentos da última década (LORENZEN, 2007).

## 2.2.2 Transglutaminase de origem microbiana (MTG)

### 2.2.2.1 Processo de fabricação da MTG

Ando et al., (1989) exploraram a possibilidade de produzir transglutaminase de microorganismos e após uma seleção de 5.000 cepas, foram encontrados vários microorganismos que mostraram atividade de transglutaminase, dentre esses o *Streptoverticillium* S-8112 foi o que mostrou maior atividade e praticamente somente no caldo de fermentação dessa cepa foi observada a atividade de transglutaminase. Esse microorganismo é derivado de uma variante de *Streptomyces mobaraensis*, formalmente classificado como *Streptoverticillium mobaraense* (YOKOYAMA, NIO & KIKUCHI, 2004).

No processo de fermentação para a produção de transglutaminase o microorganismo é adicionado no meio contendo glicose, sacarose, amido, glicerina e dextrina como fonte de carbono. As fontes de nitrogênio podem ser orgânicas ou inorgânicas, nitrato de amônio, sulfato de amônio, uréia, nitrato de sódio, cloreto de amônio, soja, arroz, milho, trigo, peptona, extrato de carne, caseína, aminoácidos e extrato de levedura podem ser usados. Minerais e outros elementos necessários são: fosfato, magnésio, potássio, ferro, cobre, zinco e vitaminas; surfactantes não iônicos e antiespumante podem ser adicionados se necessário (ZHU et al., 1995). Utilizando-se um meio racionalmente otimizado com base na necessidade de nutrientes para a síntese celular e produção de MTG, a produção da enzima pode ser aumentada em 4 vezes. A falta de certos aminoácidos limita a síntese de MTG, mas esses aminoácidos ainda não foram identificados, entretanto analisando a distribuição do fluxo metabólico é possível identificar o que impacta no crescimento celular e determinar os nutrientes necessários para a síntese da MTG (ZHU et al., 1998).

A fermentação é aeróbica e requer aeração e agitação. A faixa ótima de temperatura de fermentação é de 25 a 35 °C e o tempo depende das condições do meio de cultura e é determinado pela mais alta atividade de transglutaminase que pode ser conseguida, normalmente varia de 2 a 4 dias. A MTG obtida está dissolvida no caldo da fermentação e pode ser recuperada através da separação do material sólido do caldo. Os métodos normalmente usados para a purificação de enzimas podem ser usados para a MTG, por exemplo: extração por etanol, acetona, álcool isopropílico e outros solventes orgânicos. Efeito “salting-out” com sulfato de amônio e cloreto de sódio, diálise, ultrafiltração, cromatografia de troca iônica, cromatografia de absorção e outros métodos podem ser usados para purificar a enzima. Uma combinação de métodos pode ser usada para aumentar a eficiência e a recuperação. A enzima obtida pode então ser misturada com estabilizantes, como: vários sais, açúcares,

proteínas, lipídeos e surfactantes (ZHU et al., 1995). A figura 7 mostra uma representação tridimensional da transglutaminase microbiana.

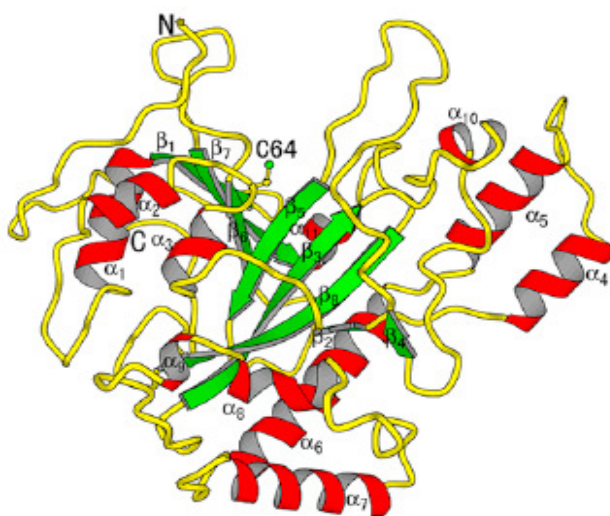


Figura 7 – Representação tridimensional da MTG (YOKOYAMA, NIO & KIKUCHI, 2004)

A Ajinomoto teve sucesso em criar um método de produção em massa de transglutaminase por fermentação (AJINOMOTOa) como descrito acima, e comercializa esse produto no Brasil como a marca ACTIVA® (AJINOMOTO b). A transglutaminase comercializada pela Ajinomoto possui vários tipos de preparações, 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. Abaixo são mostrados os ingredientes que compõem as 2 preparações enzimáticas utilizadas nesse trabalho.

- ACTIVA®MP: consiste na mistura de lactose, maltodextrina e enzima MTG (ANEXO I). Esta preparação é utilizada em derivados lácteos (AJINOMOTO c);
- ACTIVA®YG: consiste na mistura de lactose, extrato de levedura, maltodextrina, enzima MTG e óleos de cártamo (ANEXO II). Esta preparação é utilizada em iogurtes e produtos similares (AJINOMOTO d).

#### 2.2.2.2 Propriedades da MTG

Diferentemente da TG obtida de fígado de porquinho-da-índia, a MTG é totalmente  $\text{Ca}^{2+}$  independente. Essa propriedade é muito útil na modificação de várias proteínas presentes nos alimentos, como as caseínas, globulinas de soja e miosinas que são sensíveis

ao cálcio e facilmente precipitam na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  (YOKOYAMA, NIO & KIKUCHI, 2004).

O seu peso molecular é de aproximadamente 38 kDa (ANDO et al., 1989; KANAJI et al., 1993), aproximadamente a metade do da TG derivada de fígado de porquinho-da-índia que tem um ponto isolétrico de 4,5 contra 9,0 da MTG (ANDO et al., 1989). É uma enzima monomérica formada por uma única cadeia de polipeptídeo (ANDO et al., 1989; KANAJI et al., 1993). Entretanto ela tem 2 sítios potenciais de glicosilação (KANAJI et al., 1993; YOKOYAMA, NIO & KIKUCHI, 2004).

A MTG possui 331 aminoácidos e com uma seqüência muito diferente da derivada de tecido de mamífero. Contém um único resíduo de cisteína com um grupo tiol livre que é essencial para sua atividade catalítica, indicando que a MTG faz parte da família das tiol-proteases. A sua análise estrutural sugere que ela tenha uma conformação globular como é típica de proteínas secretórias, e sua hidropatia indica que a enzima é hidrofílica, mas com muitas regiões hidrofóbicas distribuídas em intervalos específicos ao longo da cadeia (KANAJI et al., 1993). A figura 8 mostra a estrutura primária da MTG com o possível resíduo ativo de cisteína.



Figura 8 - Estrutura primária da MTG; (\*) Indica o possível resíduo ativo de cisteína (MOTOKI & SEGURO, 1998)

Em relação a inibidores,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  e  $\text{Li}^{+}$  têm um forte efeito inibidor. Como metais pesados são esperados a se ligar ao único grupo tiol do resíduo de cisteína, isso está fortemente de acordo com a idéia de que esse resíduo faz parte do sítio ativo da MTG (YOKOYAMA, NIO & KIKUCHI, 2004). Ela também é inibida por substâncias orgânicas específicas indicando que há um grupo SH participando da reação (ANDO et al, 1989).

O pH ótimo para a atividade da MTG está entre 5 e 8 (FIGURA 9), entretanto a MTG mostra alguma atividade em pH 4 e 9. Assim é estável em uma larga faixa de pH. (ANDO et al, 1989).

A temperatura ótima da MTG é 50 °C (por 10 minutos a pH 6,0) e mantém atividade total por 10 minutos a 40 °C, mas perde a sua atividade a 70 °C em poucos minutos (FIGU-

RA 10). É ativada a 10 °C e retém alguma atividade perto do ponto de congelamento (YOKOYAMA, NIO & KIKUCHI, 2004).

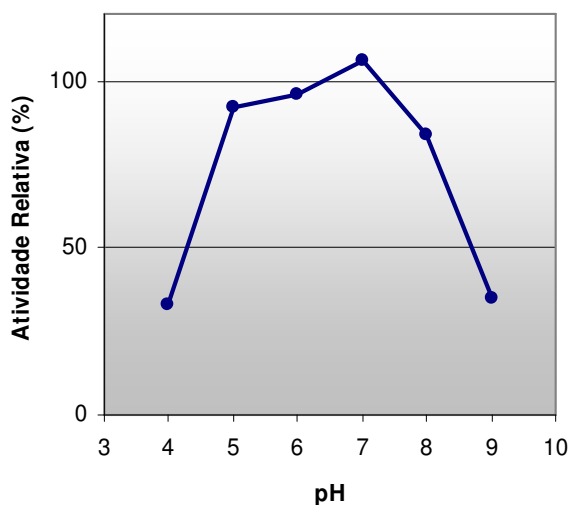


Figura 9 - Atividade relativa da MTG em relação ao pH (ANDO et al, 1989)

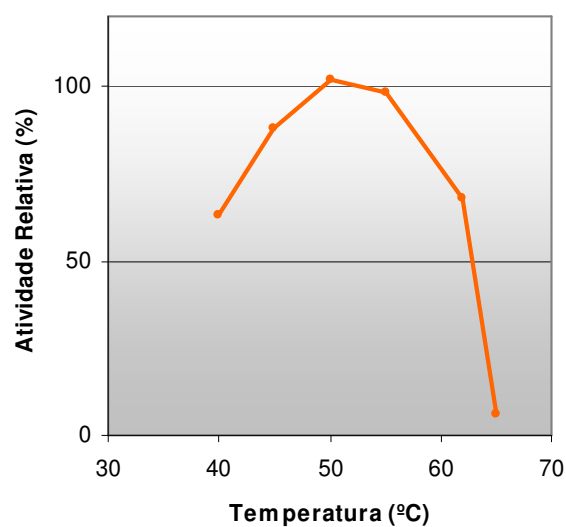


Figura 10 - Atividade relativa da MTG em relação à temperatura (ANDO et al, 1989)

A tabela 4 mostra os tempos necessários para as reações em temperaturas diferentes para se obter o mesmo resultado de uma reação a 50 °C por 10 minutos em pH 6,0 e a tabela 5 mostra a reatividade da MTG para vários substratos.

A MTG possui especificidade de substrato mais baixa do que a obtida de animais (ANDO et al, 1989). A maioria dos alimentos que contém proteínas, como as globulinas de leguminosas, glúten de trigo, gema e clara de ovo, albuminas, miosinas, fibrinas, caseínas,

$\alpha$ -lactalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina podem formar ligações cruzadas (NONAKA et al., 1989; YOKOYAMA, NIO & KIKUCHI, 2004).

Tabela 4 - Atividade da MTG: relação entre temperatura e tempo de reação

Temperatura (°C)	Tempo (min)
5	240
15	105
20	70
30	35
40	20

FONTE: Adaptado de ANDO et al, 1989

Tabela 5 - Reatividade da MTG para várias proteínas

Alimento	Proteína	Reatividade
Leite	caseína	⊙
	caseinato de sódio	⊙
	$\alpha$ -lactoalbumina	○
	$\beta$ -lactoglobulina	△
Ovos	proteína da clara	△
	proteína da gema	○
Carnes	mioglobina	△
	colágeno	○
	gelatina	⊙
	miosina	⊙
	actina	×
Soja	globulina 11S	⊙
	globulina 7S	⊙
Trigo	gliadina	○
	gluteína	○

⊙: reage muito bem    ○: reage bem    △: reage dependendo das condições    ×: em geral não reage

FONTE: Adaptado de SAKAMOTO, KUMAZAWA & MOTOKI, 1994 e SHARMA, LORENZEN & QVIST, 2001

Proteínas contendo muitas estruturas aleatórias como a caseína e a gelatina são bons substratos para a MTG. Proteínas contendo muitos resíduos de lisina e glutamina, como as proteínas de soja e de trigo são também bons substratos. A reatividade das proteínas pode muitas vezes ser otimizada por aquecimento ou mudança de pH para desnaturar parcialmente a conformação do substrato. Os diferentes substratos também apresentam dife-

rentes temperaturas, concentração enzimática, pH e tempos de incubação ótimos (SAKAMOTO, KUMAZAWA & MOTOKI, 1994).

Bönisch, Lauber & Kulosik, (2004), Bönisch, Tolkachi & Kulosik, (2006) e De Jong, Boumans & Wijngaards, (2009) demonstraram a presença de um inibidor natural da MTG em leite cru que é inativado por tratamento térmico. Esse inibidor também é encontrado em leite que sofreu um tratamento térmico mais brando, como a pasteurização ou qualquer outro tratamento térmico equivalente a 62 - 65 °C por 30 minutos (MIWA et al., 2007). O inibidor ainda não foi identificado, está presente no soro do leite, não é um íon metálico livre, seu peso molecular é de aproximadamente 200 Da, e acredita-se que se ligue aos resíduos de cisteína da TG reduzindo a sua atividade (DE JONG, BOUMANS & WIJNGAARDS, 2009).

Condições como 80 °C / 30 minutos, 85 °C / 15 minutos e 140 °C / 40 segundos aplicadas ao leite cru ou pasteurizado foram identificadas por aumentar significativamente a atividade enzimática (BONISCH, TOLKACHI & KULOSIK, 2006).

Adicionando um agente redutor junto com a MTG no leite a atividade da enzima é significativamente melhorada, um desses agentes é a glutatona (MIWA et al., 2007). Os inventores também estudaram um extrato de levedura com alta concentração de glutatona e observaram que 0,007% de extrato em relação à base láctea desengordurada é suficiente para melhorar significativamente a atividade da MTG e o efeito dessa concentração no sabor do produto é desprezível.

A preparação enzimática ACTIVA® YG contém extrato de levedura que por sua vez contém glutatona (MIWA et al., 2007), essa preparação é denominada no presente trabalho como MTG+G.

#### 2.2.2.3 Propriedades funcionais da MTG

A reação mais eficiente da MTG é a de ligação cruzada através da ligação  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lis (FIGURA 11). Quando  $\epsilon$ -amino grupos de resíduos de lisina atuam como acil receptores, a ligação mencionada acima é formada. A reação de ligação cruzada pode ser tanto intermolecular como intramolecular e causa mudanças significativas nas propriedades físicas dos alimentos que contém proteínas e produz efeitos únicos sobre essas últimas. Esses efeitos são muito úteis para vários tipos de alimentos e ajuda a aumentar o valor comercial desses alimentos. Dentre esses efeitos os principais são: capacidade de gelificação, viscosidade, estabilidade térmica e capacidade de se ligar à água (KURAISHI, SAKAMOTO & SOEDA, 1996). MTG pode formar ligações  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lis (G-L) em várias proteínas e essas



ligações cruzadas alteram drasticamente o comportamento da proteína. A aplicação da ligação cruzada G-L deve levar ao desenvolvimento de produtos e processos inovadores (YOKOYAMA, NIO & KIKUCHI, 2004).

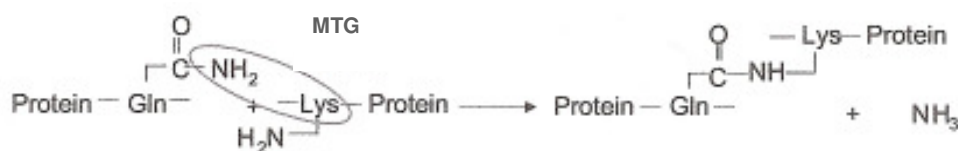


Figura 11 - Reação de ligação cruzada entre lisina e ácido glutâmico induzida por MTG (KULOSIK et al., 2003)

Com respeito à capacidade de gelificação, mesmo uma solução de proteína que não forma gel, formará gel se MTG for usada para formar ligações cruzadas nessas proteínas, por exemplo: uma solução de caseinato não formará gel, mas se tratada com MTG ocorrerá à formação de gel. No caso de uma proteína que tem capacidade de gelificação, o gel protéico se torna mais firme através do tratamento com MTG. É conhecido que proteínas de soja e miosina gelificam com o tratamento térmico, se MTG for adicionada, soluções dessas proteínas gelificarão sem tratamento térmico (NONAKA et al., 1989). Essas mudanças na capacidade de gelificação são devidas à formação de ligações  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lis.

A firmeza do gel está relacionada com o aumento de ligações cruzadas, maior será a força necessária para romper o gel quanto maior o número de ligações cruzadas existentes no gel. 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 sinérese, quanto maior a quantidade de enzima, maior será o número de ligações  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lis e o excesso dessas ligações pode inibir o desenvolvimento uniforme da rede protéica (KURAISHI, SAKAMOTO & SOEDA, 1996).

Na figura 12 é possível observar o aumento da força do gel de uma solução de caseinato com o aumento da concentração enzimática e posterior decréscimo da força do gel com concentrações enzimáticas acima de  $15 \text{ U g}^{-1}$  de proteína.

Kulosik et al., (2003) observaram o aumento da força do gel de leite desnatado previamente tratado com MTG obtido por indução ácida. Nesse trabalho o gel obtido por indução ácida do leite sem tratamento algum foi usado como controle, em seguida foi medida a força do gel do leite submetido a um pré-tratamento térmico de  $80^\circ\text{C}$  / 2 minutos e foi observado um aumento de aproximadamente 2 vezes na força do gel. No terceiro gel o pré-tratamento aplicado foi uma alta pressão de 400 MPa e a força do gel foi quase 3 vezes maior do que o controle. No quarto gel o leite foi tratado com MTG e a força do gel foi um pouco mais do que 3 vezes a do controle. No último foi feita uma combinação de 2 pré-

tratamentos, alta pressão e MTG e a força do gel foi quase 7 vezes maior do que a do controle e mais do que 2 vezes maior do que as dos géis pré-tratados com alta pressão ou MTG. Segundo os autores esse comportamento sinérgico pode ser explicado devido a uma estrutura mais aberta das micelas de caseína que foram expostas à alta pressão, oferecendo assim mais grupos reativos para as reações de transferência de grupos acil.

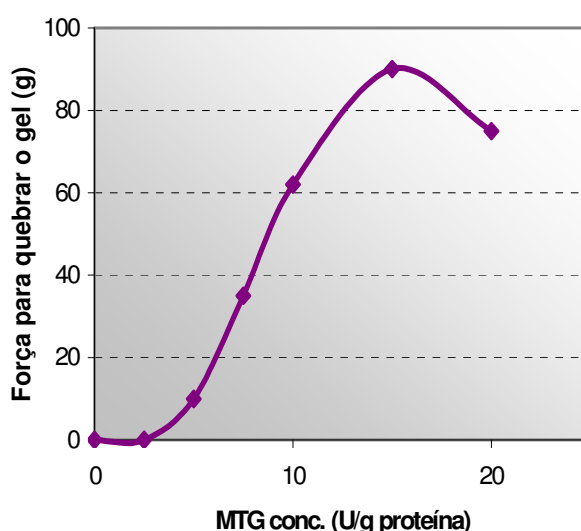


Figura 12 - Efeito da MTG na força do gel de uma solução de caseinato incubada a 37 °C em pH 6,5 por 1 h. Concentração protéica: 10% (m/m) (KURAISHI, SAKAMOTO & SOEDA, 1996)

Em relação à viscosidade, quando a proteína é polimerizada e ocorre um aumento do peso molecular, normalmente ocorre um aumento da viscosidade da solução dessa proteína. Consequentemente uma solução de proteína tratada com MTG apresenta aumento de viscosidade. Soluções de caseinato tratadas com diferentes concentrações de MTG apresentaram aumento de viscosidade à medida que a concentração de MTG foi aumentada (FIGURA 13). Foi confirmada a formação de ligações cruzadas e as frações monoméricas de caseinato diminuíram ou desapareceram e frações poliméricas (dímeros e trímeros) aumentaram (KURAISHI, SAKAMOTO & SOEDA, 1996).

Truong et al. (2004) observaram que o aumento da relação enzima/substrato em uma solução de isolado protéico de soro resultou em uma extensão das ligações cruzadas nessa proteína, a qual foi manifestada pelo aumento da viscosidade aparente e mudanças nas propriedades de gelificação. Gauche et al., (2008) observaram que a formação de polímeros em uma solução preparada com soro de leite em pó aumentou proporcionalmente com o aumento da MTG até o ponto máximo de exaustão do substrato. Eles também observaram que o aumento do conteúdo de polímeros de alto peso molecular na solução de soro de leite resultou em um aumento da viscosidade da solução.

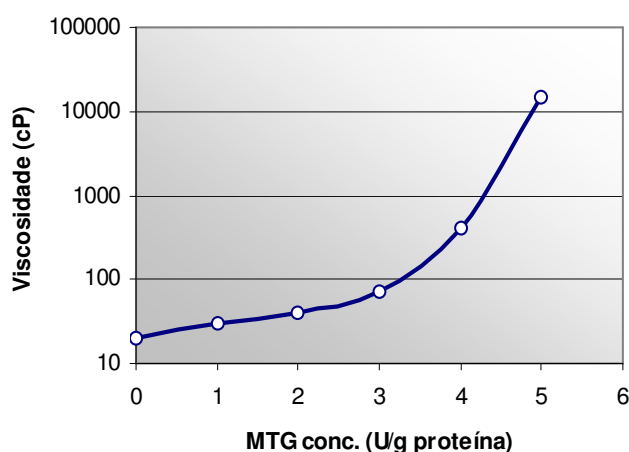


Figura 13 - Viscosidade de caseinato de sódio tratado com MTG (KURASHI, SAKAMOTO & SOEDA, 1996)

As ligações  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lis são covalentes e estáveis, a estabilidade térmica é aumentada com o aumento do número dessas ligações. Gel de gelatina é termoreversível, é estabilizado por ligações hidrofóbicas, então se aquecido a certas temperaturas, o gel se transforma em uma solução. Quando a solução de gelatina é tratada com MTG, ligações  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lis são introduzidas na sua estrutura e sua estabilidade térmica é significativamente melhorada. Dependendo da concentração de gelatina e das condições de reações enzimáticas, um gel de gelatina pode ser difícil de se liquefazer mesmo a 120 °C. Com essa propriedade produtos gelificados estáveis a altas temperaturas podem ser produzidos (KURAISHI, SAKAMOTO & SOEDA, 1996).

Leites UHT que foram previamente tratados com MTG tiveram a sua estabilidade térmica melhorada. Parece que as ligações cruzadas entre caseínas individuais são as responsáveis pela prevenção da dissociação micelar da  $\kappa$ -caseína em valores de pH nas quais as caseínas apresentam mínima estabilidade. Os resultados desse estudo indicam que a MTG tem potencial para aplicações comerciais como aditivo alimentar capaz de melhorar a estabilidade térmica do leite (O'SULLIVAN, KELLY & FOX, 2002).

Essas mesmas ligações cruzadas aumentam a capacidade de se ligar à água. Géis de alimentos tratados com MTG são capazes de reter mais água, mesmo com mudanças na temperatura e choques físicos. O iogurte tem problemas de separação de soro com mudanças de temperatura ou impactos físicos. Se o leite utilizado na fabricação de iogurte for tratado com MTG, obtém-se um produto com uma maior capacidade de reter a água e menor suscetibilidade a sinérese (KURAISHI, SAKAMOTO & SOEDA, 1996).

Diferentes proteínas (2 ou mais) podem ser covalentemente ligadas por MTG para produzir novas proteínas com funcionalidades inovadoras. Por exemplo, conjugação de caseínas ou globulinas de soja com ovomucina melhora a atividade emulsificante se compara-

da com as proteínas isoladas; a conjugação de caseína e gelatina por MTG produz proteínas inovadoras que são altamente solúveis em pH ácidos (MOTOKI & SEGURO, 1998).

MTG é capaz de incorporar covalentemente aminoácidos ou peptídeos dentro de substratos protéicos, e essa reação pode melhorar o valor nutricional de alimentos para seres humanos e animais, porque aminoácidos ou peptídeos incorporados por ligações covalentes se comportam como se fosse um aminoácido endógeno. Por exemplo, caseínas e proteínas de soja, as quais são limitadas em metionina e lisina podem ser nutricionalmente melhoradas por esse tipo de reação (YOKOYAMA, NIO & KIKUCHI, 2004).

#### 2.2.2.4 Aplicações em derivados lácteos

A transglutaminase pode ser aplicada em iogurtes, queijos, sorvetes (MOTOKI & SEGURO, 1998 e MOTOKI & KUMAZAWA, 2000), sobremesas, “dairy spreads”, molhos, queijos processados e sobremesas congeladas (KURAISHI, YAMAZAKI & SUSA, 2001).

Cozzolino et al., (2003) preparam queijos a partir de leite tratado com MTG para investigar a possibilidade de reter as proteínas de soro dentro da massa através da formação de homo e/ou hetero-polímeros. O experimento foi feito de 3 maneiras diferentes: (a) o leite foi tratado com MTG antes de ser adicionado o coagulante; (b) o coagulante e a MTG foram adicionados ao mesmo tempo; e (c) o coagulante foi adicionado antes da MTG. O primeiro procedimento não permitiu a coagulação do leite, provavelmente devido à formação de ligações cruzadas entre as  $\kappa$ -caseínas. É bem conhecido que a coagulação do leite por ação enzimática inclui a proteólise da  $\kappa$ -caseína sobre a superfície da micela e uma reação bimolecular de agregação lenta das micelas reativas. MTG provavelmente diminui a quantidade de  $\kappa$ -caseína na forma monomérica, as quais são altamente suscetíveis à ligação cruzada devido à sua posição periférica na micela de caseína. Consequentemente a tendência de coagulação das micelas, fenômeno altamente relacionado com o grau de hidrólise da  $\kappa$ -caseína, diminui. Essa explicação pode ser usada também para a extensão do tempo de coagulação observada no segundo procedimento, onde o coagulante e a MTG foram adicionados ao mesmo tempo. As massas e os soros obtidos nos procedimentos (b) e (c) foram analisados e foram encontrados resultados semelhantes. A quantidade de proteínas do soro no soro obtido diminuiu com o aumento da quantidade de MTG adicionada e o rendimento da massa aumentou com o aumento da quantidade de MTG. As análises mostraram um aumento do teor de proteína na massa indicando que houve incorporação da  $\beta$ -

lactoglobulina e da  $\alpha$ -lactalbumina na massa. E ainda a adição da MTG resultou em uma maior dureza e deformabilidade do queijo.

Piccolo, (2006) estudou o efeito da adição da MTG na massa utilizada para a fabricação de requeijão, observou um aumento de rendimento de 13% no requeijão utilizando 0,02% de MTG e um tempo de incubação de 90 minutos. Também foi observado que o rendimento é mais influenciado pela concentração da enzima do que pelo tempo de incubação. Não foram observadas diferenças de viscosidade, coesividade e elasticidade quando comparado ao requeijão sem tratamento enzimático, mas foram observadas diferenças em outros atributos de textura. Em relação à firmeza, adesividade, gomosidade e mastigabilidade o requeijão sem MTG apresentou teores maiores.

Xiao-Qing, et al., (2003) patentearam um método de fabricação de queijos (principalmente “cream cheese” e “cottage cheese”) onde a MTG é adicionada ao leite junto com um agente acidulante que pode ser um fermento lácteo ou um ácido (não pode ser usada na produção de queijos onde é utilizado um coagulante enzimático), após a obtenção do pH desejado, o soro é separado e a massa é aquecida para inativar a MTG. Com a massa obtida é preparado o queijo, principalmente os macios. O objetivo da patente é incorporar mais proteínas na massa e diminuir a sinérese, defeito que ocorre nos queijos macios. Os resultados obtidos provaram um aumento do teor de proteína na massa e consequentes aumento de rendimento e diminuição de proteínas do soro no soro. Também foi observado que quanto maior a concentração enzimática maior a incorporação de proteína na massa. Análise da microestrutura da massa indicou a presença de partículas menores e menos espaços vazios entre as mesmas. Essa redução dos espaços vazios provavelmente contribuiu para a redução da taxa de sinérese no queijo obtido com a massa tratada por MTG.

#### 2.2.2.4.1 Aplicação em iogurtes

A área mais avançada no processamento de derivados lácteos usando transglutaminase é na fabricação de iogurte (LORENZEN, 2002). A textura do iogurte é altamente dependente da funcionalidade dos componentes individuais, das interações entre os componentes e também das etapas do processo de produção. Por exemplo, aumentando o nível de proteína aumenta a força do gel do iogurte; a presença de gordura também aumenta a força de géis ácidos; uma outra forma de modificar a textura de iogurte, a qual tem sido especialmente usada para iogurtes com baixos teores de gordura é através do uso de gomas. Aumentando o teor de sólidos e adicionando gomas pode ser caro e por isso é de interesse

investigar métodos alternativos para melhorar a textura de iogurtes (FAERGEMAND et al., 1999).

A idéia básica atrás do uso da TG na produção de iogurte é que as ligações cruzadas das proteínas do leite podem representar uma importante alternativa para melhorar a textura e as propriedades funcionais de um produto final sem ou reduzindo a fortificação com sólidos lácteos. Estudos apresentam benefícios promissores para produtos lácteos fermentados, como: aumento da força do gel, redução da sinérese em iogurte firme e aumento da viscosidade e cremosidade em iogurte batido (JAROS et al., 2006).

Em géis ácidos obtidos por acidificação com glucono-delta-lactona, previamente tratados com MTG foi observada uma força de gel muito maior em comparação àqueles sem tratamento. E ainda apresentaram uma permeabilidade muito menor (FAERGEMAND & QVIST, 1997).

Iogurtes firmes tratados com MTG apresentaram maior força de gel quando comparados com aqueles sem tratamento. Aumentando a dosagem de enzima aumentou a força de gel tanto dos iogurtes com alto teor de gordura como nos de baixo teor de gordura. O aumento da força do gel chegou a ser 15 vezes maior, e foi particularmente maior nos iogurtes com maior teor de proteína e gordura. Em alto teor de proteína o maior efeito foi provavelmente devido ao aumento do número de potenciais sítios de ligação cruzada levando a mais ligações desse tipo. Foi observado que 0,02% MTG pode substituir 30% de proteína extra para se obter o mesmo perfil de textura de um iogurte enriquecido com o mesmo nível. Em relação à separação do soro, a suscetibilidade de géis ácidos a esse fenômeno pode ser reduzida criando uma malha mais fina que imobiliza uma grande quantidade de água. Permeabilidade é uma medida das características da malha do gel e depende principalmente da distribuição uniforme das partículas e do tamanho dos poros na malha do gel. A permeabilidade dos iogurtes foram medidas e diminuiu significativamente com o aumento da dose de enzima e conseqüentemente esses iogurtes apresentaram efetivamente menos sinérese do que os iogurtes sem tratamento enzimático. A análise sensorial mostrou que através do tratamento com MTG foi possível reduzir a gordura e o teor de proteína e obter iogurtes similares em textura àqueles com alto teor de gordura e com aumento de sólidos (FAERGEMAND et al., 1999).

O uso de MTG para estabilizar iogurte foi examinado por Lorenzen, (2002), e adição simultânea de cultura láctea e transglutaminase resultou em um tempo de fermentação mais longo e uma pós-acidificação mais baixa durante a armazenagem. Os iogurtes tratados com MTG apresentaram maior força de gel e menor índice de sinérese, as razões para essa última são devido a uma malha de proteína mais fina e uma distribuição mais regular das proteínas no produto. Ainda, Lauber, Henle & Klostermeyer, (2000) observaram um aumento da força necessária para quebrar o gel de iogurte e essa força foi maior com o aumento do

tempo de incubação da MTG de 20 para 60 minutos, além desse tempo não foi observado aumento na força para quebrar o gel. Foi usada uma concentração de 10,5 U de MTG / 100 mL de leite desnatado e a temperatura de incubação foi de 40 °C. Nesse trabalho a oligomerização da caseína foi medida e surpreendentemente somente uma pequena quantidade de oligomerização é necessária para um significativo aumento da força de ruptura do gel do iogurte e que os isopeptídeos são quase que exclusivamente formados intramolecularmente nas micelas de caseína.

Em iogurte firme desnatado, foi observado que quanto maior a quantidade de MTG adicionada maior a viscosidade do iogurte e menor a sinérese. As ligações cruzadas das proteínas lácteas parecem ser uma alternativa aceitável ao invés da adição de proteína extra ou estabilizante em iogurte desnatado. Entretanto para uma boa qualidade física e sensorial a concentração de MTG adicionada ao leite deve ser selecionada corretamente. Nesse caso a concentração de 0,3 g / litro de leite pareceu ser ótima (OZER et al., 2007).

Iogurtes produzidos com leite tratado com MTG apresentaram menor índice de sinérese e maior viscosidade e índice de consistência (EL-NOUR, EL-KHOLY & EL-SALAM, 2004). Ainda em iogurte firme, Kuraishi, Yamazaki & Susa, (2001) observaram um aumento da força do gel do iogurte até o máximo de 5 U de MTG g<sup>-1</sup> de proteína, em concentrações mais altas foi observada uma diminuição da força do gel. Foi observado também redução da separação de soro.

Bönisch et al., (2007a) produziram iogurtes batidos adicionando a MTG junto com a cultura láctea para avaliar os efeitos durante a armazenagem. Esse processo tem a vantagem de evitar uma etapa a mais de aquecimento para inativar a enzima. Nesse caso a inativação da enzima depende da acidificação sem nenhum tratamento térmico. Como o pH diminui durante a fermentação do leite as condições para a enzima se afastam da faixa ótima de pH. Com isso surgem duas questões: Se o tempo disponível é suficiente para a MTG formar ligações cruzadas suficientes enquanto o pH diminui e se a enzima retém alguma de sua atividade durante a armazenagem, mesmo fora da faixa ideal de pH? Os resultados mostraram um aumento significativo da viscosidade nos iogurtes tratados com MTG. Quanto à atividade enzimática residual, foi observado um aumento da viscosidade durante a armazenagem, mas não houve aumento no grau de polimerização das amostras, a possível explicação seria um efeito secundário do tratamento com MTG ocasionando uma aglomeração das proteínas de interações não covalentes, como não é possível medir a atividade enzimática no iogurte, não foi possível provar que não houve atividade enzimática residual. Nesse trabalho não foi observado um tempo maior de fermentação nos iogurtes adicionados de MTG.

A adição da MTG simultaneamente com o fermento lácteo na produção de iogurtes pode resultar em um produto com textura áspera e tendência a aglomeração, essas caracte-

rísticas são intensificadas com o aumento de proteína no iogurte (BÖNISCH et al., 2007a). A figura 14 mostra as diferentes texturas dos iogurtes tratados com MTG durante a fermentação e sem tratamento com diferentes níveis de proteína.

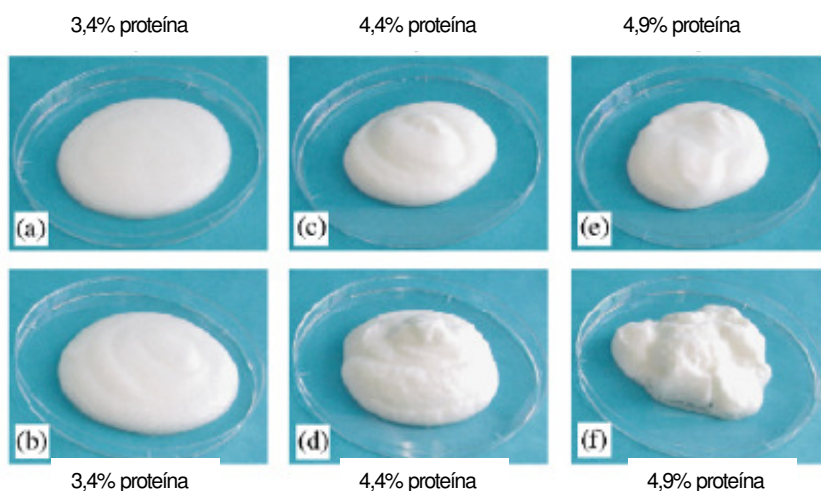


Figura 14 - Imagens de iogurte desnatado batido com ou sem fortificação de proteína com caseinato de sódio, com ou sem ligações cruzadas por MTG adicionada simultaneamente durante a fermentação. Produto após 6 semanas de armazenagem A 4 °C; (A), (C) E (E) SEM MTG; (B), (D) E (F) com MTG (BÖNISCH et al., 2007a).

Lorenzen et al., (2002) mediram o grau de polimerização de iogurtes tratados com MTG ( $0,6 \text{ U g}^{-1}$  de proteína) e sem tratamento enzimático (controle), e observaram no controle um grau de polimerização entre 7 e 11% devido ao tratamento térmico enquanto que no iogurte tratado o grau de polimerização foi de 22% resultando em uma maior viscosidade aparente. Lauber, Henle & Klostermeyer, (2000) observaram que um grau de polimerização de 15% é suficiente para se obter um aumento significativo na força de gel de iogurte firme. No trabalho de Bönisch et al., (2007a) as amostras atingiram 16% de polimerização após 150 minutos de incubação (pH 6,6 até 6,0 durante a fermentação a 42 °C). Segundo os autores seria possível reduzir em 1,2% o teor de proteína para se ter o mesmo valor de viscosidade desejado para um iogurte batido com 3,4% de proteína.

Conforme comentado no item 2.2.2.2 existe um inibidor natural da MTG no leite cru e leite pasteurizado que é inativado por tratamento térmico (BONISCH, LAUBER & KULOSIK, 2004; BONISCH, TOLKACHI & KULOSIK, 2006; MIWA et al., 2007). No processo de fabricação de leites fermentados já há uma etapa de tratamento térmico no leite com o objetivo de eliminar os microorganismos patogênicos, produzir fatores estimulantes para a cultura láctea e promover mudanças físico-químicas nos constituintes do leite (TAMINE & ROBINSON, 1999). Uma etapa adicional de tratamento térmico no processo, tanto para inativar o



inibidor da enzima ou a própria enzima pode não ser técnica ou economicamente viável e pode também trazer efeitos adversos para o sabor e a textura do iogurte (MIWA et al., 2007).

A preparação enzimática ACTIVA®YG contém extrato de levedura com alta concentração de glutatona, um agente redutor que aumenta a atividade enzimática da MTG em leite cru ou pasteurizado, possibilitando assim que o tratamento térmico usado no iogurte sirva também para inativar a enzima previamente incubada (MIWA et al., 2007).

Bönisch et al., (2007b) testaram 2 preparações enzimáticas a ACTIVA®MP sem glutatona e a ACTIVA®YG com glutatona, ambas da Ajinomoto, na fabricação de iogurte batido com leite desnatado pasteurizado. No trabalho várias concentrações das 2 enzimas foram adicionadas ao leite e incubadas a 42 °C por 180 minutos em seguida seguiu-se o processo de produção de iogurte com homogeneização, tratamento térmico que também serviu para a inativação das enzimas, fermentação, resfriamento e armazenagem.

Os iogurtes preparados com as 2 enzimas apresentaram aumento de viscosidade em relação ao iogurte sem tratamento enzimático, sendo que a amostra com ACTIVA®YG apresentou maior viscosidade e grau de polimerização para todas as concentrações enzimáticas utilizadas. As amostras tratadas com enzimas não apresentaram sinérese. Foi concluído, entre outras observações, que para aplicações industriais as ligações cruzadas das proteínas através da ACTIVA®YG antes da fermentação oferecem a possibilidade de se obter iogurtes batidos com melhoramento das propriedades reológicas sem sinérese, mesmo com reduzido conteúdo de proteína sem a etapa de tratamento térmico adicional. Esse processo tem a vantagem de se trabalhar com pH constante durante as reações de ligação cruzada e oferece várias possibilidades de condições de incubação (BÖNISCH et al., (2007B).

Jaros, Heidig & Rohm, (2007) produziram iogurte batido a partir de leite reconstituído e estudaram a influência do tratamento enzimático com MTG, o conteúdo de sólidos totais e o tipo de cultura láctea nas propriedades reológicas do iogurte batido. Foi utilizada uma quantidade de 1,2 U de MTG g<sup>-1</sup> de proteína para o iogurte tratado com a enzima. Todos os iogurtes foram submetidos a um tratamento térmico de 90 °C / 30 minutos, resfriados a 30 °C para adição da MTG e incubação por 105 minutos (mesmo o controle sem MTG, permaneceu nessa temperatura e tempo) em seguida a enzima foi inativada por tratamento térmico a 80 °C por 10 minutos e os iogurtes foram resfriados a 43 °C para a fermentação. Foi observado que as ligações cruzadas formadas tiveram um impacto significativo nas propriedades reológicas do iogurte batido. Na avaliação reológica foi observada a necessidade de uma força de cisalhamento maior no iogurte tratado com MTG indicando uma maior resistência mecânica desse iogurte.

Gauche et al., (2009) produziram iogurtes com 100% de leite, com 80% de leite e 20% de soro e 70% de leite e 30% de soro, todos com e sem MTG e estudaram os perfis de fluidez e textura e mediram a sinérese desses iogurtes. Nesse trabalho foi utilizada MTG a  $0,5 \text{ U g}^{-1}$  de proteína, os produtos foram submetidos a um tratamento térmico de  $95^\circ\text{C}$  / 5 minutos, resfriados a  $40^\circ\text{C}$ , incubados com MTG por 2 horas, em seguida aquecidos a  $80^\circ\text{C}$  / 2 minutos para inativar as enzimas, resfriados a  $42^\circ\text{C}$  e fermentados. Os produtos sem MTG foram submetidos aos mesmos tratamentos térmicos e tempos.

Em relação à sinérese, comparando sempre com o controle com a mesma combinação de leite e soro, foi observada uma redução de 31% no iogurte produzido com 100% de leite e de 21% e 16% nos iogurtes com 30% e 20% de soro respectivamente. Ainda foi observado que o iogurte com 20% de soro tratado com MTG apresentou o mesmo nível de sinérese do iogurte com 100% leite sem MTG, sugerindo que em relação à sinérese é possível produzir um iogurte similar tratado com MTG com 20% de soro (GAUCHE et al., 2009).

As viscosidades aparentes dos iogurtes tratados com MTG foram maiores do que os correspondentes sem MTG. A presença de transglutaminase também contribuiu para o aumento do índice de consistência dos iogurtes, o iogurte com 20% de soro e MTG apresentou índice de consistência similar ao iogurte com 100% leite sem MTG. Parâmetros de textura, como: fraturabilidade, firmeza e gomosidade foram aumentados com a MTG, e no iogurte com 20% de soro foram similares ao do iogurte com 100% de leite sem MTG (GAUCHE et al., 2009).

De Paula, et al. (2000) estudaram a aplicação da enzima transglutaminase em iogurtes naturais batidos, os resultados mostraram que a adição da enzima aumentou a firmeza e a viscosidade do iogurte em relação ao controle e que quanto maior a concentração utilizada maiores foram os valores de viscosidade e firmeza. Ainda nesse trabalho foi observado que 0,04% de MTG pode substituir 2% de leite em pó desnatado no iogurte. O iogurte tratado com enzima apresentou melhores resultados para viscosidade, firmeza e sinérese do que o iogurte adicionado de leite em pó.

## 2.3 VISCOSIDADE E SINÉRESE

### 2.3.1 Viscosidade

Viscosidade é um termo comumente conhecido que descreve as propriedades de escoamento de um fluido, ou seja, os atritos das camadas internas dentro do fluido que im-

põe resistência a fluir (BOURNE, 1982; BRASEQ, 1998a). Existem vários instrumentos disponíveis para a realização das medidas de viscosidade com princípio de funcionamento rotacional ou tubular. Os instrumentos rotacionais podem operar em cisalhamento estacionário (velocidade angular constante) ou dinâmico (oscilatório). Alguns fluídos apresentam mudança de viscosidade em função do tempo sob condições constantes de taxa de cisalhamento. Fluídos tixotrópicos decrescem a viscosidade com o tempo enquanto são submetidos a um cisalhamento constante e fluidos reopéticos aumentam a viscosidade com o tempo a um cisalhamento constante (BRASEQ, 1998a).

A viscosidade é afetada pela temperatura, concentração de soluto, peso molecular do soluto, pressão e matéria suspensa. É usualmente representada por  $\eta$  e é definida pela equação:

$$\eta = \sigma / \gamma$$

onde,  $\eta$  é a viscosidade;  $\sigma$ , a tensão de cisalhamento; e  $\gamma$ , a taxa de cisalhamento.

Viscosidade aparente é a viscosidade de um fluido não newtoniano expressa como se fosse um fluido newtoniano, denominada pelo símbolo  $\eta_a$ . É um coeficiente calculado de dados empíricos como se o fluido obedecesse à lei de Newton (BOURNE, 1982).

Nos reômetros rotacionais, a velocidade não varia com o tempo de 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. Os dados obtidos em estado estacionário são úteis na elaboração das curvas de escoamento (tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação) e de modelos de escoamento, além de possibilitar a avaliação da influência de fatores como temperatura, concentração, presença e tamanho de partículas em suspensão sobre as propriedades reológicas (BARONI et al., 1999).

Isleten & Karagul-Yuceer, (2006) mediram a viscosidade dos iogurtes produzidos em seu trabalho utilizando um viscosímetro *Brookfield*, modelo DV II+, e o programa *Rheocalc*. A velocidade de 4 rpm e o probe LV-SC4-34 foram escolhidos de modo a obter um torque entre 10 e 90%. As viscosidades foram medidas após 1, 6 e 12 dias de armazenagem. Telles & Flôres, (2007) utilizaram um viscosímetro *Brookfield*, modelo DV I+ com adaptador para amostras de pequeno volume, probe número 21 e a velocidade angular foi variada de 0,5 a 100 rpm, as amostras permaneceram 40 segundos em cada velocidade a 10 °C.

Ozer et al., (2007) utilizaram um viscosímetro rotacional *Brookfield*, modelo RVDV II + P, sonda cilíndrica número SC4-21 para medir a viscosidade aparente de iogurtes desnatados. Antes das medições, as amostras de iogurte foram agitadas gentilmente por 10 segundos. Todas as medidas foram realizadas a 10 °C, temperatura mantida por um banho com circulação de água. As leituras foram registradas após 15 segundos do início do cisalhamento com uma taxa de 55 s<sup>-1</sup>. Três leituras foram tomadas de cada amostra. Gauche et al., (2009) mediram a viscosidade aparente de iogurte batido com um viscosímetro rotacional *Brookfield*, modelo DV III ultra, cilindro concêntrico número SC4-27, e os dados coletados pelo programa *Rheocalc 32*, versão 2.5. O reômetro foi termostaticamente controlado por circulação de água a 5 °C e para a viscosidade aparente foi utilizada uma taxa de cisalhamento constante de 7,0 s<sup>-1</sup> por 30 minutos a 5 °C.

### 2.3.2 Sinérese

A sinérese em iogurtes e leites fermentados é a liberação de soro, é um defeito comum nestes produtos. Fabricantes tentam prevenir a separação de soro aumentando o conteúdo de sólidos totais, submetendo o leite a severos tratamentos térmicos e/ou adicionando estabilizantes. A sinérese espontânea é o produto da contração de um gel sem a aplicação de uma força externa e está relacionada com a instabilidade da rede do gel (por exemplo, rearranjos em grande escala) resultando na perda da habilidade de reter a fase aquosa. A sinérese por centrifugação mede o soro expelido do iogurte como resultado da força aplicada e está relacionada com a capacidade do gel de reter água. Em iogurtes batidos uma combinação de alto conteúdo de sólidos e adição de frutas e estabilizantes fornece ao fabricante várias opções para controlar a textura e as propriedades físicas do iogurte, entretanto a separação de soro permanece um problema (LUCHEY, 2002).

Uma das dificuldades em estudar o defeito de separação de soro é a falta de um método publicado ou aceito para quantificar ou medir a sinérese (LUCHEY, 2002). O método de centrifugação pode ser aplicado em iogurte firme e em iogurte batido, o valor de “g”, o tempo e a temperatura de centrifugação variam consideravelmente (McKENNA, 2003). Gauche et al., (2009) determinaram a sinérese de iogurtes batido, após as amostras ficarem 3 dias armazenadas a 6 ± 1 °C, 15 g de amostra foram centrifugadas em duplicata, sob refrigeração a 350 g por 10 minutos. O percentual de sinérese foi calculado dividindo-se a massa de soro separada durante a centrifugação pela massa inicial da amostra de iogurte, multiplicado por 100. Keogh & O’Kennedy, (2003) pesaram entre 30 e 40 g de iogurte batido e centrifugaram 222 ∞ g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante cristalino foi vertido em outro recipiente, pe-

sado e registrado como sinérese (%). Amatayakul, Sherkat & Shah, (2006) pesaram aproximadamente 30 g de iogurte depois de ter sido agitado 20 vezes no sentido horário e mais 20 vezes no anti-horário. As amostras batidas foram centrifugadas a  $3313 \times g$  por 15 minutos a 10 °C. O soro separado foi pesado e a sinérese expressa em percentual de soro separado sobre o peso inicial da amostra.

Já, Staffolo et al., (2004) utilizaram o método espontâneo, determinaram a sinérese colocando 100 mL de amostra em um cilindro graduado de mesmo volume. O índice de sinérese (%) foi a quantidade de soro separado em mL por 100 mL de amostra. As amostras em triplicata foram armazenadas a 21 e a 4°C e as medidas foram feitas durante o período de armazenagem. Enquanto que, Kuçukoner & Tarakçi, (2003), pesaram 100 g de iogurte batido em um papel de filtro sobre um funil e após 2 horas a 7 °C, a quantidade de soro coletada foi usada como índice de sinérese.

## 2.4 ANÁLISE SENSORIAL

Análise sensorial conforme Dutcosky, (1996 *apud* AMERINE et al., 1965) pode ser definida como uma disciplina científica usada para medir, analisar, interpretar reações das características dos alimentos e dos materiais: como são percebidas pelos órgãos da visão, olfação, tato, audição e gustação. Com isso, os pesquisadores buscam desenvolver metodologias para que os objetivos dos testes sejam bem definidos e para que estas metodologias conduzam à seleção de métodos e provadores apropriados, a delineamentos estatísticos corretos e à interpretação adequada dos dados (DUTCOSKY, 1996).

De acordo com Bourne, (1982) os quatro principais fatores de qualidade em alimentos são:

- Aparência que compreende cor, forma, tamanho, brilho, etc., é baseada nas propriedades óticas e na manifestação visual de tamanho e forma;
- Sabor que compreende o gosto percebido na língua e o odor percebido pelo nariz, é a resposta dos receptores para estímulos químicos na cavidade oral;
- Textura é a resposta do tato para um estímulo físico que resulta do contato entre alguma parte do corpo e o alimento;
- Nutrição é um fator de qualidade, mas não é um fator de aceitabilidade sensorial porque não é percebido pelos sentidos diretamente.

As pessoas tendem a perceber os atributos de um alimento na seguinte ordem: aparência, odor, textura e sabor (MEILGAARD, CIVILLE & CARR, 2000).

Segundo Dutcosky, (1996) os métodos sensoriais são classificados em:

- Métodos discriminativos, são aqueles que estabelecem diferenciação qualitativa e/ou quantitativa entre as amostras;
- Métodos descritivos, aqueles que descrevem qualitativamente e quantitativamente as amostras;
- Métodos subjetivos ou afetivos, aqueles que expressam a opinião pessoal do julgador.

Ainda segundo Dutcosky, (1996) dentro dos métodos discriminativos existem os testes de diferença que indicam se existe ou não diferença entre as amostras e os testes de sensibilidade que medem a habilidade de perceber, identificar e/ou diferenciar qualitativa e/ou quantitativamente um ou mais estímulos, pelos órgãos dos sentidos.

Os testes de diferença podem ser a comparação pareada, triangular, duo-trio, comparação múltipla, ordenação, A ou não-A, dois em cinco; enquanto que os testes de sensibilidade podem ser de limites, estímulo constante e diluição. Em relação aos métodos descritivos, têm-se a avaliação de atributos-escalas, perfil de sabor, perfil de textura, análise descritiva quantitativa e tempo-intensidade. Com respeito aos métodos subjetivos, têm-se a comparação pareada, ordenação, escala hedônica e escala de atitude. Os métodos subjetivos medem o quanto uma população gostou de um produto, para avaliar preferência ou aceitabilidade. Preferência pode ser a expressão do grau de gostar, a escolha de uma amostra em relação à outra e percepção do agradável até o desagradável. Aceitabilidade pode ser uma experiência caracterizada por uma atitude positiva, e/ou pela utilização atual do produto; e pode ser dimensionada pela preferência ou grau de gostar para um produto único.

No trabalho de Ozer et al., (2007) o teste de avaliação sensorial dos iogurtes testados foi baseado no reconhecimento da importância relativa de atributos de qualidade selecionados (acidez, viscosidade, palatabilidade, separação de soro e aceitabilidade geral). O painel sensorial foi formado por 10 provadores. Avaliações foram feitas usando uma escala linear de 100 mm marcada com referências apropriadas para cada atributo testado. As amostras foram apresentadas aos provadores em potes plásticos individuais de 200 mL, codificadas. Os iogurtes foram aleatoriamente apresentados ao painel em cada sessão. Os provadores sentaram-se em cabines individuais. Amostras e cédulas foram passadas pela sala de preparação adjunta. Água foi usada para enxágüe entre as amostras. Sete amostras foram apresentadas ao painel em cada sessão e as sessões foram repetidas 2 vezes. As a-

mostras foram avaliadas após 1 e 21 dias de armazenagem. Faergemand et al., (1999) utilizaram na avaliação sensorial dos iogurtes testados a análise descritiva quantitativa. Um total de 6 iogurtes foi avaliado após 4-5 dias de produzidos por um painel treinado de 8 provadores. As amostras foram apresentadas a 10 °C e cada amostra foi examinada 3 vezes aleatoriamente por cada provador. Uma escala de 150 mm foi usada para descrever as propriedades determinadas pelo painel como sendo as descritoras das propriedades de textura de iogurte firme. As propriedades avaliadas foram: separação de soro pela determinação visual da quantidade de líquido no topo do iogurte, firmeza cortando o iogurte com uma colher, arenosidade e cremosidade por avaliação oral.

No trabalho de Sivieri & Oliveira, (2002) as avaliações sensoriais das amostras de bebidas lácteas foram realizadas por uma equipe de 8 provadores, previamente selecionados e treinados para este tipo de análise, utilizando uma escala de qualidade estruturada de cinco pontos, sendo: 1 ponto péssimo; 2 pontos ruim; 3 pontos regular; 4 pontos bom; 5 pontos ótimo. Os atributos avaliados foram: aparência, consistência e sabor. As bebidas lácteas foram submetidas à análise sensorial de aparência, consistência e sabor ao 0 e aos 28 dias de armazenamento a 5°C.

Na análise sensorial realizada por Soukoulis et al. (2007) oito provadores com experiência na avaliação de produtos lácteos fermentados foram escolhidos para avaliação de atributos sensoriais de amostras de iogurte. Sabor, textura e aparência foram avaliados. As amostras em potes plásticos de 125 g, a 7 °C, foram codificadas usando um número aleatório de 3 dígitos e apresentadas sucessivamente aos provadores em cabines individuais. Todos os atributos sensoriais avaliados receberam notas usando uma escala de 10 pontos, onde: 1 = não aceitável, 5 = aceitável, e 10 = sem críticas. Primeiro foi avaliado o aroma removendo a tampa dos potes e atribuindo uma nota pela intensidade das substâncias voláteis. Depois, aparência pela observação visual e propriedades de textura quebrando o gel do iogurte e agitando o produto. E finalmente sabor e aroma foram avaliados engolindo 10 g de amostra. A aceitabilidade geral foi classificada no final da avaliação sensorial de cada amostra.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAIS

##### 3.1.1 Materiais de consumo

###### 3.1.1.1 Leite em pó integral

Foi utilizado no presente trabalho o leite em pó integral fabricado pela Dairy Partners Americas Manufacturing Brasil Ltda, gentilmente fornecido pela Fonterra (Brasil) Ltda. Certificado de análises/especificação anexa (ANEXO III).

###### 3.1.1.2 Soro de leite em pó

Foi utilizado o soro de leite em pó fabricado pela Master Nutricional Ltda, gentilmente fornecido pela Tangará Importadora e Exportadora S/A. Certificado de análises anexo (ANEXO IV).

###### 3.1.1.3 Fermento lácteo

Utilizou-se o fermento lácteo YO-MIX 495 LYO 100 DCU, liofilizado e composto exclusivamente de cepas de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* fabricado pela Danisco e gentilmente fornecido pela Fermentech Com. de Insumos para Alimentos Ltda. Ficha técnica anexa (ANEXO V).

O fermento foi preparado da seguinte forma:



- Primeiro foi preparado o meio para inoculação, constituído de 90% de água e 10% de leite em pó desnatado (marca *Molico* da empresa *Nestlé*) e esterilizado a úmido (121 °C/7 min.);
- Após a esterilização o meio foi resfriado a aproximadamente 37 °C, e uma alíquota de 5 mL foi inoculada com 2 alçadas de 10 µ do fermento liofilizado e incubada a 42 °C por 3 – 4 horas;
- Desses 5 mL, 2 mL foram transferidos para um tubo contendo 10 mL do meio preparado e incubado a 42 °C por 3 – 4 horas.
- Desses 10 mL foram tomadas alíquotas correspondentes a 2% da quantidade final necessária que será adicionada para a fermentação da bebida láctea, incubadas novamente no meio a 42 °C por 3 – 4 horas. Esse fermento final obtido foi usado na dosagem de 2% sobre a bebida láctea.

#### 3.1.1.4 Enzima transglutaminase ACTIVA<sup>®</sup>MP e ACTIVA<sup>®</sup>YG

Neste trabalho foram utilizadas a ACTIVA<sup>®</sup>MP recomendada para derivados lácteos em geral com atividade declarada de 100 U g<sup>-1</sup> de preparação enzimática; e a ACTIVA<sup>®</sup>YG recomendada para iogurtes e produtos similares com atividade declarada de 106 U g<sup>-1</sup> de preparação enzimática, gentilmente fornecidas pela Ajinomoto Interamericana Ind. e Com. Ltda. Especificações/certificados de análises anexos (ANEXOS I e II).

#### 3.1.1.5 Outros

- Potes plásticos e tampas de alumínio para iogurte;
- Reagentes e vidrarias de laboratório para a realização das análises e
- Utensílios de planta piloto.

### 3.1.2 Equipamentos

#### 3.1.2.1 Recipiente de aço inoxidável com agitação

O recipiente de aço inoxidável adaptado para agitação manual e posicionamento de um termômetro, com capacidade para 3 litros, foi utilizado para aquecimento da água a 40 °C para mistura do leite e soro em pó seguida de hidratação por 20 minutos sob agitação e para o tratamento térmico da bebida láctea a 95 °C/5 minutos.

#### 3.1.2.2 Estufa com renovação e circulação de ar *Marconi mod. MA037*

A estufa a 42 °C foi usada para a fermentação da bebida láctea e a 105 °C para a determinação de sólidos totais.

#### 3.1.2.3 Potenciômetro *Micronal mod. B-474*.

O potenciômetro foi utilizado para medir o pH da bebida láctea antes da fermentação, durante a fermentação e a vida de prateleira.

#### 3.1.2.4 Bloco digestor *Tecnal mod. 40/25*

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

#### 3.1.2.5 Destilador de Nitrogênio *Tecnal mod. TE-036/1*

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

### 3.1.2.6 Centrifugador *Beloinox – para análise de gordura*

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

### 3.1.2.7 Centrifugador *Fanem - Excelsa 2*

Esse centrifugador foi usado para determinação de sinérese, método adaptado com base no método utilizado por Gauche et al., (2009).

### 3.1.2.8 Bomba de vácuo *Tecnal mod. TE 058*

A bomba de vácuo foi utilizada para coletar o soro separado após a centrifugação para determinação da sinérese e também para o soro separado na determinação da sinérese espontânea.

### 3.1.2.9 Reômetro digital *Brookfield modelo DV-III* com banho termostático

O reômetro foi utilizado para medir a viscosidade aparente e determinar o comportamento reológico das amostras de bebida láctea fermentada.

### 3.1.2.10 Agitador mecânico *Fisatom mod. 713*

Utilizado para resfriar a bebida para a adição da enzima quando necessário, para resfriar a bebida na temperatura de fermentação e para quebrar o gel e resfriá-lo. Foi utilizada uma haste de 280 mm com hélice naval.

### 3.1.2.11 Outros

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

## 3.2 MÉTODOS

Após a realização de testes preliminares comentados no item 3.2.1, determinou-se o tipo de enzima e as melhores condições de processo para o desenvolvimento do trabalho.

### 3.2.1 Desenvolvimento do trabalho

Inicialmente 2 preparações enzimáticas a ACTIVA<sup>®</sup>YG e ACTIVA<sup>®</sup>MP foram adicionadas nas concentrações de 0,01; 0,03; 0,05; 0,07 e 0,09% em duplicata junto com o fermento lácteo no processo de produção das bebidas lácteas fermentadas, ou seja o tratamento enzimático ocorreu simultaneamente com a fermentação, como realizado por Lorenzen et al., (2002), Bönisch et al., (2007a) e Ozer et al., (2007) na produção de iogurtes.

Essas amostras apresentaram viscosidades maiores do que o controle e diferenças entre si ( $p < 0,05$ ), mas também apresentaram aumento de viscosidade ( $p < 0,05$ ) durante a vida de prateleira indicando ação residual enzimática. As amostras com concentrações de 0,05; 0,07 e 0,09% de preparação enzimática gelificaram durante a armazenagem, descaracterizando a bebida láctea. Não houve diferença entre as preparações enzimáticas ( $p > 0,05$ ). As medidas de viscosidade foram realizadas em triplicata.

Em relação ao aumento da viscosidade durante a armazenagem, como não é possível medir a atividade enzimática residual no iogurte (Bönisch et al., 2007b) e como a transglutaminase foi aprovada no Brasil como coadjuvante de tecnologia/elaboração (Brasil, 2005), ou seja, não pode estar presente no produto final, o tratamento enzimático durante a fermentação foi descartado.

Com respeito às 2 preparações enzimáticas, a ACTIVA<sup>®</sup>YG, como explicado no item 2.2.2.2, aumenta a atividade da MTG quando adicionada em leite cru ou pasteurizado, diminuindo a ação de um inibidor natural da MTG presente nessas matérias-primas, evitando um tratamento térmico adicional no processo de produção de leites fermentados, para inativar o

inibidor ou inativar a enzima, ou seja, o tratamento enzimático ocorre antes do tratamento térmico usual para leites fermentados e esse é usado também para inativar a enzima (MIWA et al., 2007). Quando se usa a preparação enzimática ACTIVA<sup>®</sup>MP antes da fermentação são usados 2 tratamentos térmicos um para inativar o inibidor e outro para inativar a enzima. Dessa forma, a ACTIVA<sup>®</sup>YG é recomendada para iogurtes e produtos similares (MIWA et al., 2007).

Ainda a melhor faixa de pH para a atividade da MTG está entre 5,0 e 8,0 sendo 7,0 o pH de maior atividade (ANDO et al., 1989), sendo o pH da bebida após a mistura do leite e soro de aproximadamente 6,48 dentro da faixa ideal e bem próximo do valor ótimo, com isso o desenvolvimento do trabalho seguiu utilizando-se a preparação enzimática ACTIVA<sup>®</sup>YG na faixa de concentração de 0,01 a 0,03% com tratamento enzimático e inativação antes da fermentação, utilizando-se o tratamento térmico aplicado à bebida para a inativação da enzima, em seguida foi realizada a fermentação, resfriamento, envase e armazenamento, processo também utilizado por Bönisch et al., (2007b).

Após a definição do tipo de preparação enzimática, da faixa de concentração enzimática e do processo de fabricação foram testados diferentes tempos de incubação em diferentes temperaturas. Inicialmente foi fixada a temperatura de tratamento enzimático em 50 °C com 15 minutos de incubação, foram realizadas 3 repetições utilizando-se a concentração de 0,03% de ACTIVA<sup>®</sup>YG (MTG+G) os resultados não apresentaram diferença significativa de viscosidade ( $p > 0,05$ ) em relação ao controle. As viscosidades foram medidas em triplicata.

Em seguida, ainda com a temperatura de tratamento enzimático em 50 °C foram testados tempos de tratamento de 20, 30 e 40 minutos com 0,03% de MTG+G em duplicata. O tempo de 40 minutos de incubação apresentou diferença de viscosidade (medida em triplicata) em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). O próximo experimento foi realizado fixando-se o tempo de tratamento enzimático em 40 minutos com temperaturas de incubação de 30 e 50 °C e concentrações enzimáticas de 0,01 e 0,03%, o experimento foi realizado em duplicata e os resultados mostraram viscosidades (em triplicata) mais altas das amostras em relação ao controle e diferenças de viscosidade entre as amostras ( $p < 0,05$ ).

Com base em mais estes resultados obtidos, o estudo foi realizado fixando-se o tempo de incubação em 40 minutos, variando-se a temperatura de incubação de 30 a 50 °C e a concentração enzimática de 0,01 a 0,03%. Foi utilizado um delineamento experimental, planejamento central composto (item 3.2.3) mais o controle sem tratamento enzimático em 2 repetições e foi utilizado o processo de fabricação descrito no item 3.2.2.

### 3.2.2 Processo de fabricação de bebida láctea fermentada

O processo de fabricação da bebida láctea fermentada seguiu o fluxograma apresentado na figura 15.

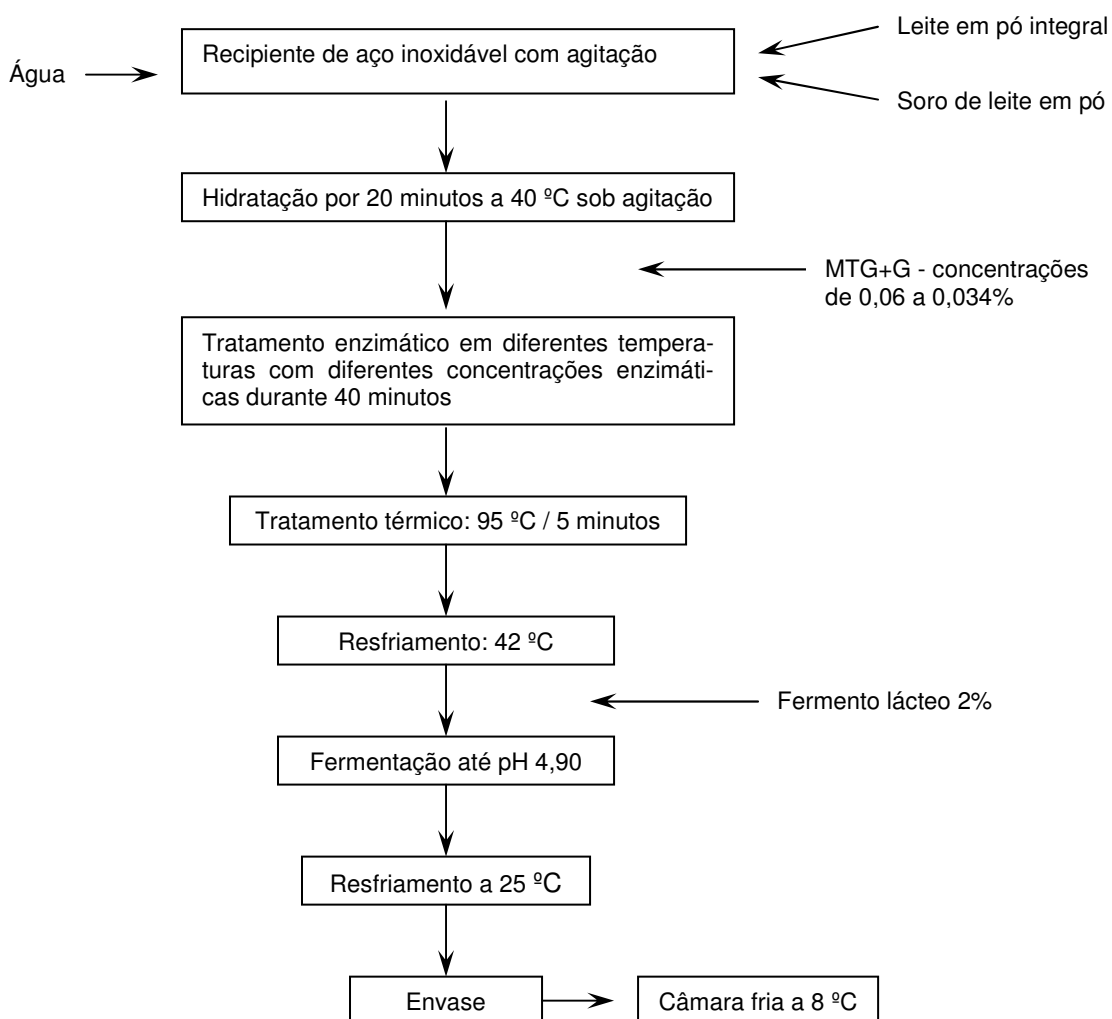


Figura 15 - Fluxograma do processo de fabricação das bebidas lácteas fermentadas

Para os ensaios foi adicionada ao recipiente de aço inoxidável água (1805,8 g) que foi aquecida a 40 °C, em seguida sob agitação foram misturados o leite em pó integral (142,8 g) e o soro de leite (51,4 g), a mistura foi mantida nessa temperatura por 20 minutos sob agitação.

Em seguida as temperaturas de tratamento enzimático foram ajustadas para as amostras de acordo com o delineamento experimental apresentado na tabela 6. As amostras foram então incubadas com enzima transglutaminase ACTIVA® YG por 40 minutos com as concentrações variando de 0,006% a 0,034% também de acordo com o delineamento expe-

rimental e identificadas de T1 a T11 (TABELA 6). As amostras foram mantidas em banho de água e as temperaturas das amostras e do banho foram controladas.

Foi ainda produzida uma amostra controle, identificada pelo mesmo nome, que foi mantida a 40 °C por 40 minutos sem adição de enzima.

Após o tratamento enzimático as amostras e a amostra controle foram submetidas a um tratamento térmico de 95 °C/5 minutos e posterior resfriamento a 42 °C (temperatura de fermentação) utilizando-se um banho de gelo a 4 - 5 °C e agitação constante de 200 rpm.

As amostras foram transferidas para recipientes plásticos, adicionadas de 2% de fermento lácteo e fermentadas em estufa na temperatura de 42 °C até pH 4,90 aproximadamente.

Após a fermentação os recipientes foram colocados em um congelador a -18 °C por 30 minutos para uma etapa inicial de resfriamento, em seguida transferidos para um banho de gelo a 4 - 5 °C onde o gel foi quebrado e o produto resfriado a 24 - 26 °C com agitação constante de 500 rpm por 8 minutos.

As amostras foram envasadas em potes plásticos, levadas para o refrigerador e armazenadas a 7 - 9 °C por 30 dias.

### **3.2.3 Otimização das condições de aplicação da enzima transglutaminase**

Com base no desenvolvimento do trabalho (item 3.2.1), foi realizado um delineamento experimental, obtendo-se a matriz apresentada na tabela 6 para verificar a melhor concentração da enzima ACTIVA® YG (MTG+G) e a melhor temperatura de tratamento enzimático para um tempo de incubação de 40 minutos.

O delineamento teve a finalidade de se obter a maior viscosidade e a menor sinérese durante a vida de prateleira por meio da metodologia de superfície de resposta conforme descrito por Box, Hunter & Hunter, (1978). Foi usado planejamento fatorial 2<sup>2</sup>, com 11 pontos: 4 fatoriais, 4 pontos axiais ( $\alpha = 1,41$ ) e 3 pontos centrais.

O delineamento foi baseado na variação da concentração da preparação enzimática de 0,01 a 0,03% e na variação da temperatura de incubação de 30 a 50 °C. Os ensaios foram realizados em duplicata e os resultados obtidos foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA).

Tabela 6 - Delineamento experimental: Ensaios com as respectivas variáveis codificadas e reais

Ensaio	MTG+G (%)		Temperatura (°C)	
	Codificada	Real	Codificada	Real
T1	-1	0,01	-1	30
T2	+1	0,03	-1	30
T3	-1	0,01	+1	50
T4	+1	0,03	+1	50
T5	- $\alpha$	0,006	0	40
T6	+ $\alpha$	0,034	0	40
T7	0	0,02	- $\alpha$	26
T8	0	0,02	+ $\alpha$	54
T9	0	0,02	0	40
T10	0	0,02	0	40
T11	0	0,02	0	40

### 3.2.4 Fórmulas testadas e composição estimada das amostras produzidas

As tabelas 7 e 8 mostram as formulações utilizadas nos ensaios e a tabela 10 a composição esperada das amostras com base na composição declarada de cada ingrediente utilizado e nas quantidades usadas.

Tabela 7 – Formulação da base da bebida láctea fermentada

Ingredientes	(%)
Leite em pó integral	7,14
Soro de leite em pó	2,57
Água	90,29
Total	100,00

A dosagem da enzima foi feita em percentual da preparação enzimática com atividade declarada de 106 U g<sup>-1</sup> de preparação ACTIVA<sup>®</sup> YG (ANEXO II).



Tabela 8 – Formulações das amostras

Amostras	Base (%)	Fermento lácteo (%)	Enzima (ACTIVA® YG) (%)
Controle	98,00	2,00	-
T1	97,99	2,00	0,01
T2	97,97	2,00	0,03
T3	97,99	2,00	0,01
T4	97,97	2,00	0,03
T5	97,994	2,00	0,006
T6	97,966	2,00	0,034
T7	97,98	2,00	0,02
T8	97,98	2,00	0,02
T9	97,98	2,00	0,02
T10	97,98	2,00	0,02
T11	97,98	2,00	0,02

A tabela 9, a seguir mostra a composição declarada pelos fabricantes do leite em pó integral e do soro de leite em pó conforme fornecimento dos certificados de análises (ANEXO III e IV).

Tabela 9 – Composição dos ingredientes utilizados

%	Leite em pó integral	Soro de leite em pó	Fermento lácteo
Proteína	25,70	14,00	3,50
Gordura	26,90	1,00	0,00
Lactose	37,87 – 39,67	76,67	5,00
Cinzas	4,70 - 6,50	7,27	1,10
Umidade	3,03	1,60	90,40
Extrato seco total (calculado)	96,97	98,40	9,60

A composição estimada do fermento lácteo foi calculada com base na formulação do meio preparado que foi de 90% de água e 10% de leite em pó desnatado marca *Molico* da empresa *Nestlé* (foi utilizada para o cálculo a composição declarada na embalagem, 35% de proteínas, 50% de carboidratos e 0% de gordura) e foi considerado o máximo de 4% de umidade permitida para o leite em pó desnatado conforme BRASIL, (1997) e com isso estimada a quantidade de cinzas de 11%.

Tabela 10 – Composição estimada para as amostras

	%
Proteína	2,22
Gordura	1,91
Lactose	4,68 – 4,81
Cinzas	0,54 – 0,66
Umidade	90,54
Extrato seco total (calculado)	9,35 – 9,60

### 3.2.5 Análises físico-químicas

As análises descritas abaixo foram realizadas em quadruplicata nas amostras dos ensaios relacionados no planejamento experimental, com exceção de viscosidade e sinérese que foram realizadas em triplicata.

- pH: foi realizado em um potenciômetro Micronal modelo V, conforme descrito na A.O.A.C., (1995).
- Acidez: foi realizada por titulação com NaOH a 0,1 N, conforme descrito na A.O.A.C., (1995).
- Gordura: foi realizado segundo Método de Gerber, conforme descrito por Atherton & Newlander, (1977).
- Lactose: Foi realizado segundo o método de Fehling, conforme descrito na A.O.A.C., (1995).
- Proteína: foi realizado segundo Método de Kjeldahl (digestor e destilador de Kjeldahl), 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).
- Cinzas: foi realizado por incineração em mufla a 550 °C, conforme descrito na A.O.A.C., (1995).
- Viscosidade aparente e comportamento reológico: para as medidas de viscosidade aparente e determinação do comportamento reológico foi utilizado o reômetro de *Brookfield mod. DV III* com banho termostático para controle de temperatura das amostras. Foi usado o programa *Rheocalc V1.0* (*Brookfield Engineering Laboratories*, 1995) instruções fornecidas pelo manual do fabricante (BRASEQ, 1998b), As análises foram realizadas na temperatura de  $8 \pm 0,1$  °C com aumento progressivo da velocidade rotacional de 1 até 10

rpm e diminuição progressiva até 1 rpm, resultando em 19 medições por amostra. Foi utilizado dispositivo para pequenas amostras, o probe selecionado foi o *spindle* SC4-18 e o programa utilizado foi o *Rheocalc V1.0* (Brookfield Engineering Laboratories, 1995). A velocidade e o probe foram selecionados de modo a obter um torque entre 10% e 90% para todas as medidas como recomendado pela fabricante (BRASEQ, 1998a). As viscosidades foram medidas em triplicata após 4, 11, 18, 25 e 30 dias. Os resultados foram obtidos em centipoise (cP) e convertidos para pascal-segundo (Pa.s) multiplicando-se por  $10^{-3}$ .

- Sinérese (método da centrifugação): foi realizado com base no método da centrifugação utilizado por Gauche et al, (2009) – 10 g de amostra a  $8 \pm 1$  °C foram centrifugadas sob refrigeração a 380 g por 10 minutos, após 14, 21 e 28 dias. O soro separado foi coletado. O resultado foi expresso em (%), dividindo-se a massa de soro separada pela massa inicial da amostra e multiplicando-se por 100. As medidas foram feitas em triplicata.
- Sinérese (espontânea): foi realizado em triplicata com base no experimento utilizado por Lucey, Munro & Singh, (1998). 10 g de amostra foram adicionadas em um tubo de vidro, e mantidas em repouso sob refrigeração ( $8 \pm 1$  °C), após 14, 21 e 28 dias a massa de soro separada foi medida e os resultados expressos em (%) dividindo-se a massa de soro separada pela massa inicial da amostra e multiplicando-se por 100.

### 3.2.6 Análise sensorial das amostras

Foi realizada a análise sensorial da amostra controle (sem tratamento enzimático) comparada com a amostra do ponto ótimo pela metodologia de superfície de resposta em relação à concentração enzimática e temperatura de incubação. Foram realizados testes de aceitação e preferência de acordo com Meilgaard, Civille & Carr, (2000) utilizando-se a ficha mostrada no ANEXO VI.

A análise foi feita com 30 provadores não treinados e foram avaliados os seguintes atributos:

- Aceitação geral e sabor – escala hedônica de 9 pontos;
- Intensidade de sabor, cremosidade e consistência – escala JAR de 5 pontos;
- Intenção de compra – escala de 5 pontos;
- Preferência

As amostras foram avaliadas tal como produzidas, sem adição de açúcar ou aroma. Todos provaram todas as amostras em cabinas individuais com luz branca, passadas para

os provadores por uma sala de preparo adjunta em potes plásticos de 100 mL codificados, a sequência de degustação foi balanceada, e foi utilizada água antes de cada amostra.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 COMPOSIÇÃO DO CONTROLE E DA BEBIDA TRATADA COM 0,02% DE MTG+G A 40 °C

Foram realizadas análises de extrato seco total, proteínas, gordura, lactose, cinzas, acidez e pH da amostra controle e da amostra T9 (0,02% de MTG+G incubada a 40 °C), a tabela 11 a seguir apresenta os resultados obtidos. As análises foram realizadas em quadruplicata.

Tabela 11 – Resultados Físico químicos do controle e do ensaio T9 (0,02% de MTG+G a 40 °C)

	Controle	Ensaio T9
Proteína, (%)	2,25 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,27 ± 0,03 <sup>a</sup>
Gordura, (%)	1,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,9 ± 0,1 <sup>a</sup>
Lactose, (%)	4,70 ± 0,01 <sup>a</sup>	4,73 ± 0,02 <sup>a</sup>
Cinzas, (%)	0,57 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,60 ± 0,02 <sup>a</sup>
Extrato seco total, (%)	9,39 ± 0,05 <sup>a</sup>	9,42 ± 0,03 <sup>a</sup>
pH	4,37 ± 0,00 <sup>a</sup>	4,37 ± 0,00 <sup>a</sup>
Acidez, (% de ácido láctico)	0,63 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,61 ± 0,00 <sup>a</sup>

Onde: para todos os parâmetros valores médios resultantes de 4 análises. Valores mais prováveis com letras idênticas não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de significância ( $p > 0,05$ ).

A composição analisada está de acordo com a composição estimada (TABELA 10). Como a adição da enzima não influencia na composição final das bebidas, foi escolhida a amostra incubada com 0,02% de MTG+G a 40 °C (T9) para ilustrar que não houve diferença significativa ( $p > 0.05$ ) na composição das amostras.

A tabela 12 mostra a equivalência da concentração de preparação enzimática com unidades enzimáticas por grama de proteína da bebida de acordo com a atividade declarada de 106 U g<sup>-1</sup> de preparação enzimática e a média do teor de proteínas das amostras, 2,25% para o controle e 2,27% da amostra T9. A variação de 0,02% de proteína entre as médias das amostras não influenciou no cálculo da equivalência.

Tabela 12 - Equivalência: Concentração de preparação enzimática com unidades de enzima (U) por grama de proteína da bebida

Concentração de preparação enzimática (%)	Unidades de enzima por grama de proteína da bebida ( $\text{U g}^{-1}$ )
0,006	0,28
0,01	0,47
0,02	0,94
0,03	1,41
0,034	1,60

#### 4.2 CURVAS DE FERMENTAÇÃO DAS AMOSTRAS OBTIDAS NOS ENSAIOS

Na figura 16 são apresentadas as curvas de fermentação obtidas nos ensaios realizados de acordo com o delineamento experimental (item 3.2.3). Os valores utilizados na curva correspondem aos valores médios de 2 repetições.

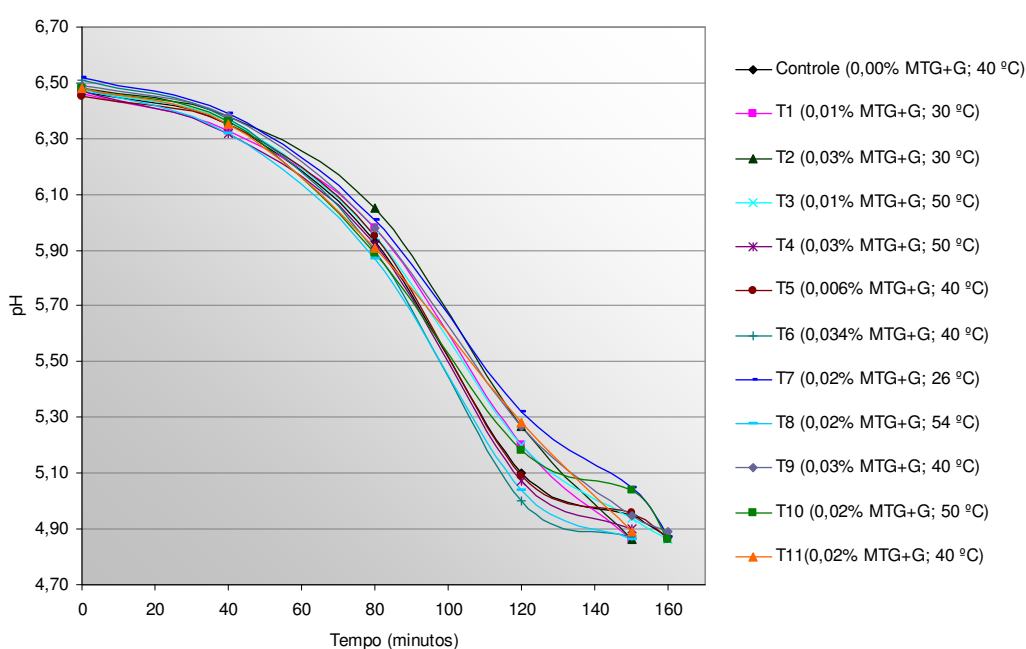


Figura 16 – Curvas de fermentação das amostras

Em relação aos tempos de fermentação, as médias foram comparadas pelo teste de Duncan e verificou-se que não houve diferença significativa entre as médias das amostras e o controle ao nível de significância de 5%, portanto não houve diferença significativa nos tempos de fermentação das amostras comparados ao do controle; resultados de acordo

com os obtidos por Bönisch et al., (2007b) que utilizaram concentrações de 0,0; 0,6; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 U g<sup>-1</sup> de proteína, incubação por 180 minutos e inativação da enzima a 95 °C / 3 minutos (tratamento térmico do iogurte utilizado) e fermentação a 42 °C com 0,2% de cultura pré-ativada. Em outro trabalho realizado por Bönisch et al., (2007a) com a enzima sendo adicionada simultaneamente com o fermento lácteo (0,2%) também não foi observada diferença nos tempos de fermentação das amostras em relação ao controle.

Em contrapartida Lorenzen, (2002) e Faergmand et al. (1999) observaram um tempo maior (20 a 40 minutos) de fermentação nos iogurtes previamente tratados com MTG. Esses últimos sugerem que a disponibilidade de peptídeos de baixo peso molecular para as bactérias é diminuída devido às ligações cruzadas das proteínas catalisadas pela MTG, e com isso a velocidade de crescimento das bactérias é reduzida, uma vez que as endopeptidases, principalmente produzidas pelos *L. bulgaricus*, devem ser produzidas primeiro para aumentar a quantidade de peptídeos de baixo peso molecular essenciais para o crescimento dos *S. thermophilus* (WALSTRA, WOUTERS & GEURTS, 2006).

Lorenzen, (2002) utilizou 2 tratamentos térmicos, pré-tratamento do leite a 92 °C / 5 minutos antes da incubação e 80 °C / 1 minuto para inativação. A incubação foi realizada por 2 horas a 40 °C com 0,05% de concentração enzimática e a fermentação a 43 °C com 3% de cultura para iogurte. No trabalho de Faergmand et al. (1999) a enzima foi adicionada junto com o fermento lácteo liofilizado na quantidade para o volume a ser fermentado.

Essa diferença observada pode estar relacionada às diferentes condições experimentais, concentração e tipo de cultura utilizadas (BÖNISCH et al., 2007b).

No presente trabalho não foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nos tempos de fermentação das bebidas tratadas com MTG e nem em relação ao controle. Esses resultados mostram que nas condições utilizadas nesse trabalho a MTG não influenciou no tempo de fermentação.

#### 4.3 VISCOSIDADE APARENTE

A seguir são mostrados a comparação das viscosidades das amostras em relação ao controle junto com os respectivos comportamentos durante a vida de prateleira e os resultados de viscosidade obtidos da otimização das condições de atuação da enzima (considerando as medidas de viscosidade após 4 dias de fabricação). Seguindo o planejamento experimental descrito no item 3.2.3 foram realizadas medidas de viscosidade após 4, 11, 18, 25 e 30 dias de fabricação das 11 amostras mais o controle.

As curvas de viscosidade de todas as amostras durante a vida de prateleira são apresentadas a seguir na figura 17.

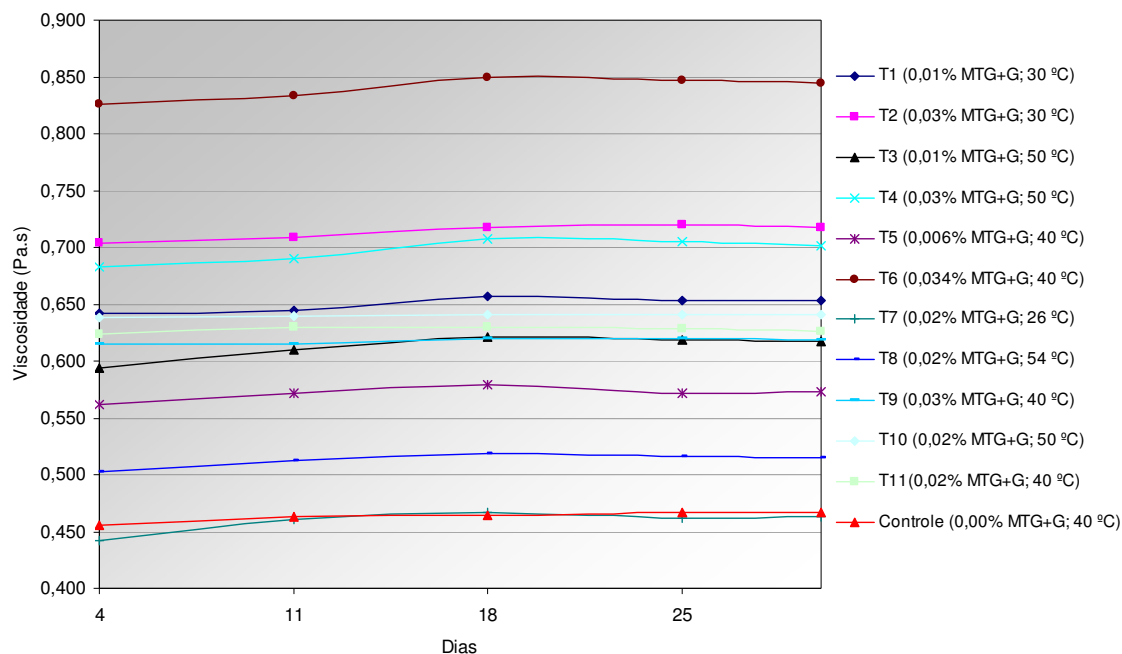


Figura 17 – Curvas de viscosidade de todas as amostras durante a vida de prateleira

A análise estatística dos valores de viscosidade obtidos ao longo da vida de prateleira mostrou que a bebida preparada com 0,02% de MTG+G e temperatura de incubação de 26 °C (T7) não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) do controle. Todas as outras bebidas apresentaram viscosidades significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) do controle e da T7. Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) da amostra com 0,034% de MTG+G e incubada a 40 °C em relação a todas outras amostras. Não houve diferença ( $p > 0,05$ ) entre as amostras T9, T10 e T11 todas incubadas com 0,02% de MTG+G a 40 °C. Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as bebidas com 0,01 e 0,03% de MTG+G incubadas a 30 °C (T1 e T2); entre as bebidas incubadas com 0,01 e 0,03% de MTG+G a 50 °C (T3 e T4); entre as bebidas incubadas com 0,01% de MTG+G a 30 e 50 °C (T1 e T3); entre as bebidas incubadas com 0,03% de MTG+G a 30 e 50 °C (T2 e T4) e entre a bebida incubada com 0,006% de MTG+G a 40 °C com a bebida incubada com 0,02% de MTG+G a 54 °C.

Os resultados mencionados mostram que a concentração de 0,02% de preparação enzimática com incubação a 26 °C não produziu aumento significativo de viscosidade ( $p > 0,05$ ). Dosagens maiores ou iguais a 0,006% de preparação enzimática combinadas com temperaturas de incubação maiores ou iguais a 30 °C produziram aumento significativo de viscosidade ( $p < 0,05$ ).

A melhor combinação foi de 0,034% de preparação enzimática (1,60 g-1 de proteína) a 40 °C (T6) conforme também observado na análise da superfície de resposta (item 4.3.2), essa combinação resultou em um aumento de viscosidade de 81,3% em relação ao controle (TABELA 13).

Houve coerência em relação às amostras T9, T10, T11 todas incubadas com 0,02% de MTG+G a 40 °C (pontos centrais do delineamento) que não apresentaram diferença significativa entre elas ( $p > 0,05$ ).

O aumento da concentração enzimática de 0,01 para 0,03% para as mesmas temperaturas (30 e 50 °C) produziu aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de viscosidade. A atuação da enzima foi melhor a 30 °C do que a 50 °C para as mesmas concentrações enzimáticas (0,01 e 0,03%). A atuação da enzima é menor em temperaturas acima de 50 °C e não houve atividade enzimática na temperatura de 26 °C durante 40 minutos de incubação.

Viscosidades significativas mais altas das bebidas na temperatura de 40 °C tanto em baixas (0,006%) como em concentrações enzimáticas mais altas (0,034%) indicam que essa temperatura parece ser a mais adequada para esse sistema alimentício.

A tabela 13 a seguir mostra o aumento percentual das viscosidades das amostras em relação ao controle após 4 dias de armazenagem. Todas para 40 minutos de incubação.

Tabela 13 – Aumento percentual das viscosidades das amostras em relação ao controle

Amostras	Concentração de MTG+G (%)	Concentração de MTG (U g <sup>-1</sup> de proteína)	Temperatura de incubação (°C)	Aumento da viscosidade em relação ao controle (%)
T1	0,01	0,47	30	41,0
T2	0,03	1,41	30	54,5
T3	0,01	0,47	50	30,5
T4	0,03	1,41	50	49,9
T5	0,006	0,28	40	23,4
T6	0,034	1,60	40	81,3
T7	0,02	0,94	26	- 3,0
T8	0,02	0,94	54	10,4
T9	0,02	0,94	40	35,0
T10	0,02	0,94	40	40,2
T11	0,02	0,94	40	37,1

Os resultados da tabela 13 estão de acordo com os obtidos por Bönisch et al. (2007b) que trabalharam com condições de processo similares à deste trabalho com ACTI-VA<sup>®</sup> YG a 1 U g<sup>-1</sup> de proteína incubada a 42 °C por 3 horas e obtiveram um iogurte batido aproximadamente 60% mais viscoso do que o controle.

O aumento significativo da viscosidade aparente em iogurtes batidos tratados com MTG e o aumento da viscosidade com o aumento da concentração enzimática também foi



relatado por De Paula et al., (2000) que com 0,04% de MTG obtiveram a mesma viscosidade e firmeza de um iogurte adicionado de 2% de leite em pó desnatado. Farnsworth et al., (2006) relataram um aumento de 75% da viscosidade em iogurtes feitos a partir de leite de cabra tratados com MTG a  $0,25 \text{ U g}^{-1}$  de proteína incubada a  $50^\circ\text{C}$  por 1 hora. Bönisch et al., (2007a) que utilizando MTG a  $0,6 \text{ U g}^{-1}$  de proteína incubada a  $42^\circ\text{C}$  por 7,5 horas (durante a fermentação) obtiveram um iogurte aproximadamente 86% mais viscoso do que o controle. Gauche et al., (2009) utilizando MTG a  $0,5 \text{ U g}^{-1}$  de proteína incubada a  $40^\circ\text{C}$  por 2 horas relataram um aumento significativo da viscosidade e um aumento de aproximadamente 20% da firmeza do iogurte tratado com enzima.

O aumento da força de gel em iogurtes firmes foi relatado por Faergmand et al., (1999); Lauber, Henle & Klostermeyer, (2000); Kuraishi, Yamazaki & Susa, (2001), Lorenzen, (2002) e por Ozer et al., (2007).

Wróblewska et al. (2009), observaram um aumento de 46% da viscosidade em *kefir* adicionado de 0,04% de MTG e incubado por 23 horas (durante a fermentação) a  $25^\circ\text{C}$ .

Quando a proteína é polimerizada ocorre um aumento do peso molecular, normalmente ocorre um aumento da viscosidade da solução dessa proteína. A firmeza do gel está relacionada com o aumento de ligações cruzadas, maior será a força necessária para romper o gel quanto maior o número de ligações cruzadas existentes no gel (KURAISHI, SAKAMOTO & SOEDA, 1996).

A viscosidade de uma solução preparada com soro de leite em pó aumentou proporcionalmente com o aumento de polímeros de alto peso molecular nessa solução que por sua vez aumentou com o aumento da concentração de MTG (GAUCHE et al., 2008). Soluções de caseinato tratadas com diferentes concentrações de MTG apresentaram aumento de viscosidade à medida que a concentração de MTG foi aumentada, sendo observada a formação de ligações cruzadas e a formação intensa de dímeros e trímeros (KURAISHI, SAKAMOTO & SOEDA, 1996).

Nos trabalhos de Bönisch et al., (2007a) e (2007b) foram medidos os graus de polimerização (GP) em iogurtes batidos com e sem MTG e correlacionados com a viscosidade e foi observado que quanto maior o GP maior a viscosidade e esses foram maiores com o aumento da concentração enzimática. Ozer et al., (2007), também observaram um aumento significativo da viscosidade em iogurtes tratados com MTG e a viscosidade aumentou com aumento da concentração enzimática.

O desempenho da enzima depende do tipo, da quantidade e da modificação sofrida pelo substrato, da própria concentração de enzima, do pH, da temperatura e do tempo de incubação (SAKAMOTO, KUMAZAWA & MOTOKI, 1994).

Como mencionado anteriormente os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com os obtidos por Bönisch et al. (2007b) que utilizaram condições de processo

similares à deste trabalho e a mesma preparação enzimática. Em relação aos outros trabalhos mencionados sobre a aplicação de MTG em iogurtes (FAERGEMAND et al, 1999; DE PAULA et al., 2000; LAUBER, HENLE & KLOSTERMEYER, 2000; KURAISHI, YAMAZAKI & SUSA, 2001; LORENZEN, 2002; BÖNISCH et al., 2007a; JAROS, HEIDIG & ROHM, 2007; OZER et al., 2007 e GAUCHE et al., 2009) e na aplicação de MTG em soluções de ingredientes lácteos (KURAISHI, SAKAMOTO & SOEDA, 1996; TRUONG et al. 2004; GAUCHE et al., 2008), apesar de que as temperaturas de incubação usadas na sua maioria estivessem entre 37 °C e 42 °C, as concentrações de substratos foram diferentes, os tipos ou a relação entre substratos foram diferentes, as concentrações enzimáticas e os tempos de incubação foram diferentes.

Ando et al. (1989) observaram que a temperatura ótima de atuação da MTG é de 50 °C, entretanto o substrato utilizado foi diferente (hidroxilamina e CBZ-glutaminil-glicina) e a concentração enzimática não é mencionada.

No presente trabalho com exceção da bebida tratada com 0,02% MTG+G a 26 °C, todas as outras apresentaram aumento de viscosidade em relação ao controle, ou seja, houve a formação de ligações cruzadas entre as proteínas e conseqüente polimerização devido à ação da transglutaminase.

#### 4.3.1 Otimização das condições de atuação da enzima – resultados de viscosidade

Após 4 dias de fabricação foram medidas as viscosidades das 11 amostras produzidas, os resultados obtidos são apresentados na tabela 14.

Os resultados foram analisados pelo programa estatístico *Minitab versão 15.1* gerando os gráficos, os coeficientes e a equação apresentados a seguir.

Na equação do modelo abaixo foram utilizados para as variáveis os coeficientes de regressão significativos ( $p < 0,05$ ) e foram eliminadas as variáveis com coeficientes de regressão não significativos ( $p > 0,05$ ).

$$Y = 0,62556 + 0,06531X_1 + 0,00214X_2 + 0,05218X_1^2 - 0,05865X_2^2$$

Onde,

Y = viscosidade em Pa.s;

X<sub>1</sub>= variável codificada para concentração em % de MTG+G e;

X<sub>2</sub> = variável codificada para temperatura em °C

Tabela 14 – Planejamento experimental x resultados obtidos de viscosidade

	MTG+G (%)		Temperatura (°C)		
Ensaio	Codificada	Real	Codificado	Real	Viscosidade (cP)
1	- 1	0,01	-1	30	658,4
2	+ 1	0,03	-1	30	721,35
3	-1	0,01	+ 1	50	557,9
4	+ 1	0,03	+ 1	50	716,85
5	- $\alpha$	0,006	0	40	586,9
6	+ $\alpha$	0,034	0	40	836,4
7	0	0,02	- $\alpha$	26	450,65
8	0	0,02	+ $\alpha$	54	545,9
9	0	0,02	0	40	614,4
10	0	0,02	0	40	663,9
11	0	0,02	0	40	597,9
1	- 1	0,01	-1	30	625,4
2	+ 1	0,03	-1	30	685,35
3	-1	0,01	+ 1	50	629,9
4	+ 1	0,03	+ 1	50	647,9
5	- $\alpha$	0,006	0	40	536,9
6	+ $\alpha$	0,034	0	40	814,3
7	0	0,02	- $\alpha$	26	432,4
8	0	0,02	+ $\alpha$	54	458,9
9	0	0,02	0	40	606,9
10	0	0,02	0	40	612,9
11	0	0,02	0	40	649,9

A figura 18 mostra o gráfico da distribuição dos resíduos ao longo da curva normal.

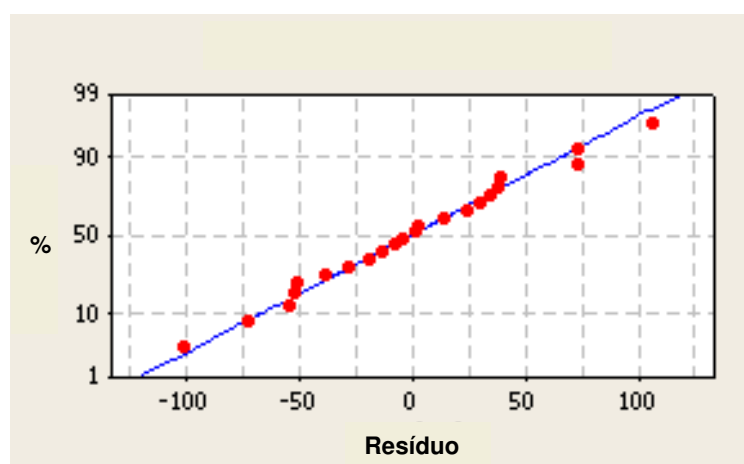


Figura 18 – Gráfico da distribuição dos resíduos ao longo da curva normal - viscosidade

Os resíduos estão bem distribuídos e alinhados com a curva normal indicando que os dados obedecem ao modelo da distribuição normal que é a base da suposição para fazer a análise de variância.

A análise de variância (ANOVA) do modelo codificado da viscosidade mostrou um valor de  $p$  para o coeficiente de regressão menor do que 0,05, sendo assim possível construir os gráficos de superfície de resposta.

As figuras 19 e 20 mostram respectivamente o gráfico da superfície de resposta e as curvas de contorno obtidas com a equação do modelo.

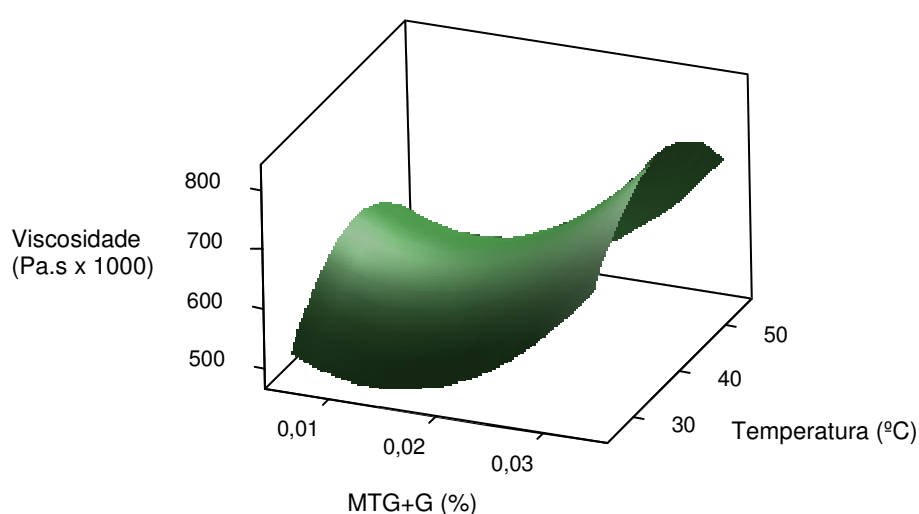


Figura 19 – Superfície de resposta do modelo – viscosidade dos ensaios descritos na tabela 14 após 4 dias de armazenagem

As análises da superfície de resposta e das curvas de contorno mostram que para 40 minutos de incubação a melhor combinação é 0,034% de concentração enzimática com 40 °C de temperatura de incubação. Dosagens menores com temperaturas maiores, menores ou iguais não têm o mesmo efeito e com 0,034% em temperaturas maiores ou menores não teria o mesmo efeito. Essa combinação apresentou um aumento de viscosidade de 17,3% em relação à segunda amostra mais viscosa e de 87,0% em relação à amostra menos viscosa.

A curva ascendente da superfície em relação à concentração enzimática está coerente, a viscosidade aumenta com o aumento da concentração enzimática.

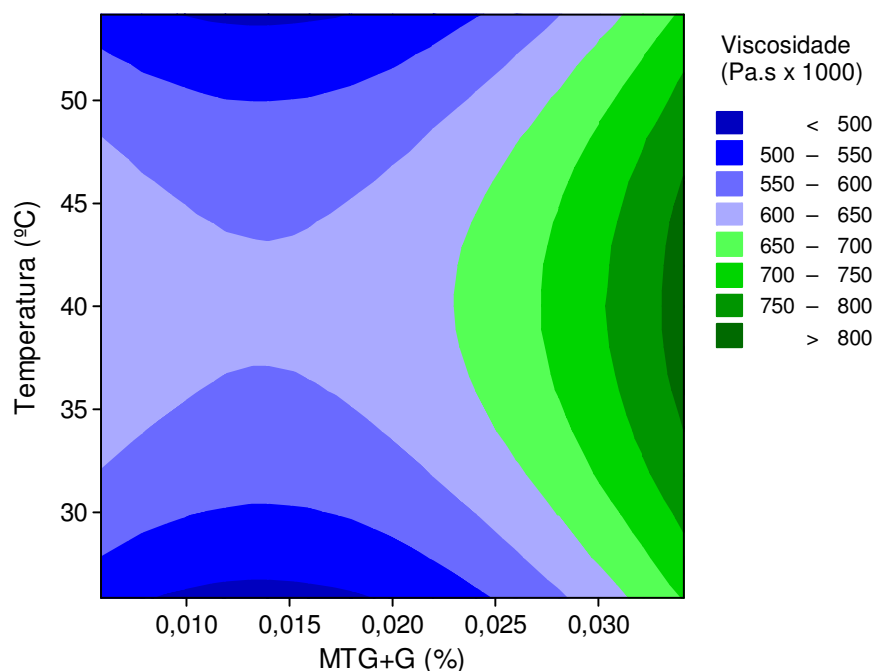


Figura 20 - Curvas de contorno do modelo - viscosidade dos ensaios descritos na tabela 14 após 4 dias de armazenagem

Kuraishi, Sakamoto & Soeda, (1996) relataram um aumento de aproximadamente 950 vezes (de 20 a 19000 cP) na viscosidade de uma solução de caseinato de sódio a 10% (m/m) com o aumento de 10 vezes da concentração enzimática ( de 0,5 para 5 U g<sup>-1</sup> de proteína). Bönisch et al.,(2007b) observaram uma aumento de 36% da viscosidade de iogurte batido quando a concentração enzimática foi aumentada em 6 vezes (de 0,5 para 3,0 U g<sup>-1</sup> de proteína). Ozer et al., (2007) relataram um aumento de 90% da viscosidade de iogurte quando a concentração foi aumentada em 5 vezes (de 0,1 para 0,5 U g<sup>-1</sup>). Gauche et al., (2008) relataram um aumento de 28% no índice de consistência de uma solução de soro de leite em pó a 50% (m/m) quando a concentração enzimática foi aumentada 3,35 vezes (de 23 para 77 U g<sup>-1</sup> de proteína). E ainda Farnsworth et al., (2006) observaram um aumento de 41% na viscosidade de iogurtes produzidos a partir de leite de cabra tratados com MTG quando a concentração enzimática foi aumentada em 4 vezes (de 0,25 para 1 U g<sup>-1</sup> de proteína).

No presente trabalho foi observado um aumento de 47% na viscosidade da bebida quando a concentração enzimática foi aumentada em 5,7 vezes (de 0,28 para 1,6 U g<sup>-1</sup> de proteína)

As ligações cruzadas catalisadas pela MTG polimerizam as proteínas, aumentando o seu peso molecular e consequentemente aumentando a viscosidade da solução ou do produto que contém essas proteínas. Quanto maior a concentração enzimática, maior o número

de ligações cruzadas, maior o grau de polimerização e maior a viscosidade (KURAISHI, SAKAMOTO & SOEDA, 1996; BÖNISCH et al., 2007a e 2007b; GAUCHE et al., 2008;).

A faixa de concentração utilizada no delineamento foi comentada no item 3.2.1 e foi escolhida com o objetivo de não descaracterizar a bebida láctea fermentada com base nos ensaios realizados no desenvolvimento do trabalho e nos comentários de Almeida, Bonassi & Roça, (2001) que as bebidas lácteas são caracterizadas por apresentar baixa viscosidade e de Capitani et al., (2005) que as mais comercializadas são as mais similares ao iogurte.

O objetivo dos experimentos era dentro da faixa de concentração selecionada de 0,01 a 0,03% e da faixa de temperatura de incubação de 30 a 50 °C otimizar essas duas variáveis para se obter o máximo de viscosidade. A superfície de resposta obtida está de acordo com o objetivo do delineamento experimental.

#### **4.3.2 Comportamento reológico das bebidas**

A figura 21 a seguir mostra o comportamento reológico de algumas das bebidas produzidas e do controle.

Observa-se que todas as bebidas apresentam pequeno comportamento tixotópico e que a adição da enzima em diferentes concentrações não influenciou significativamente ( $p > 0,05$ ) no comportamento tixotrópico da bebida láctea fermentada. A área de histerese formada pela curva ascendente e descendente pode ser usada como uma medida de tixotropia (BARNES, 1997), as diferenças entre os mesmos pontos das curvas ascendente e descendente não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) indicando baixa tixotropia (GONZÁLEZ-TOMÁS & COSTELL, 2006) e não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as áreas de histerese das amostras.

O aumento e a redução lineares da taxa de deformação (de 1,32/s a 13,2/s e depois a 1,32/s) não produziram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) nas tensões de cisalhamento obtidas na curva ascendente quando comparados com as tensões da curva descendente para cada amostra, quando a velocidade rotacional foi aumentada linearmente de 1 até 10 rpm e também diminuída linearmente de 10 a 1 rpm. Esse aumento progressivo da taxa de deformação causou a diminuição da viscosidade aparente e por consequência o aumento da tensão de cisalhamento caracterizando o comportamento pseudoplástico das bebidas (GOZZO, CUNHA & MENEGALLI, 2009).

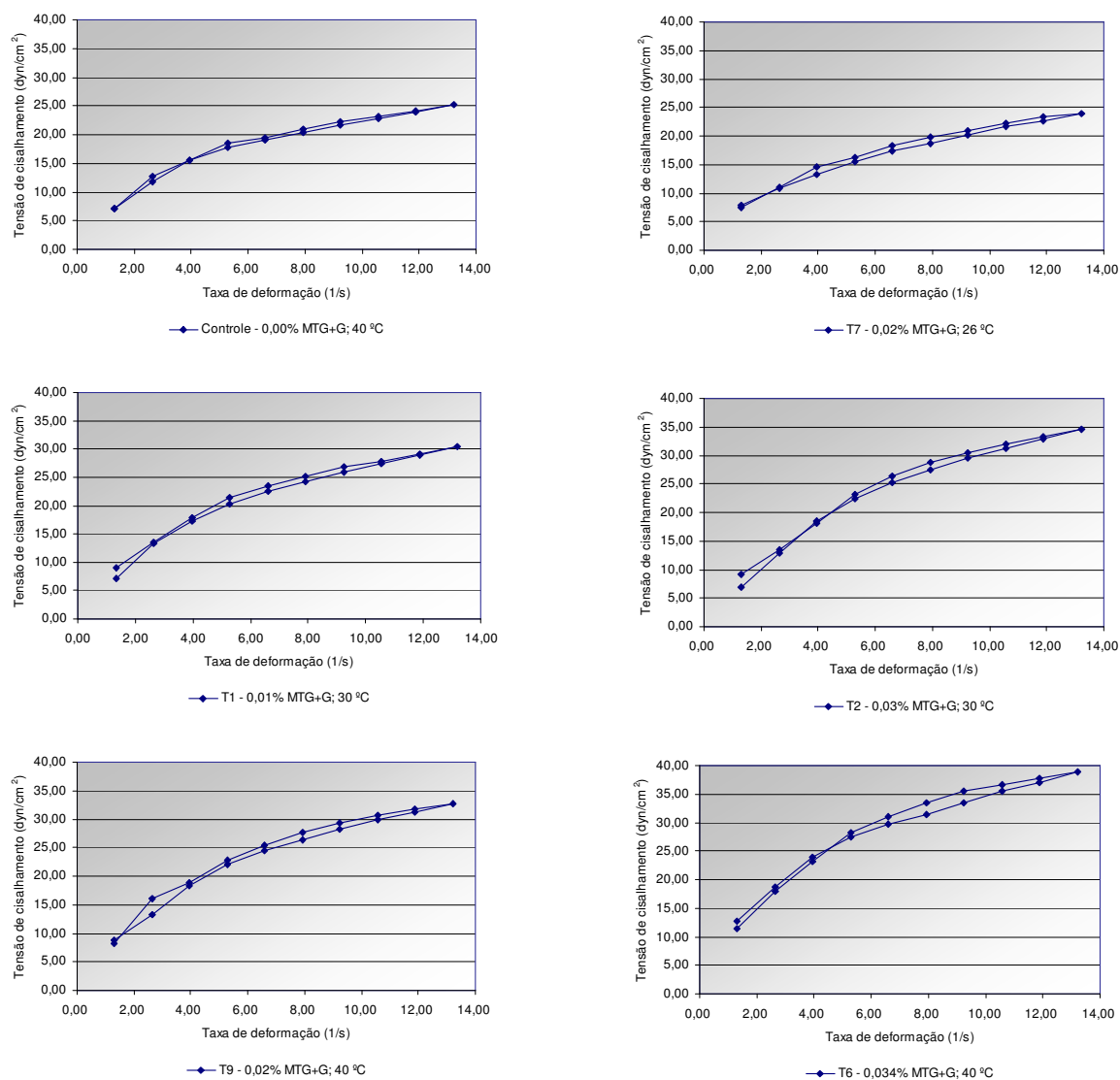


Figura 21 – Comportamento reológico das amostras controle, T1, T2, T6, T7 e T9

## 4.4 SINÉRESE

### 4.4.1 Comparação do índice de sinérese das amostras em relação ao controle e durante a vida de prateleira – método da centrifugação

Na figura 22 são apresentadas as curvas dos índices de sinérese por centrifugação de todas as amostras durante a vida de prateleira.

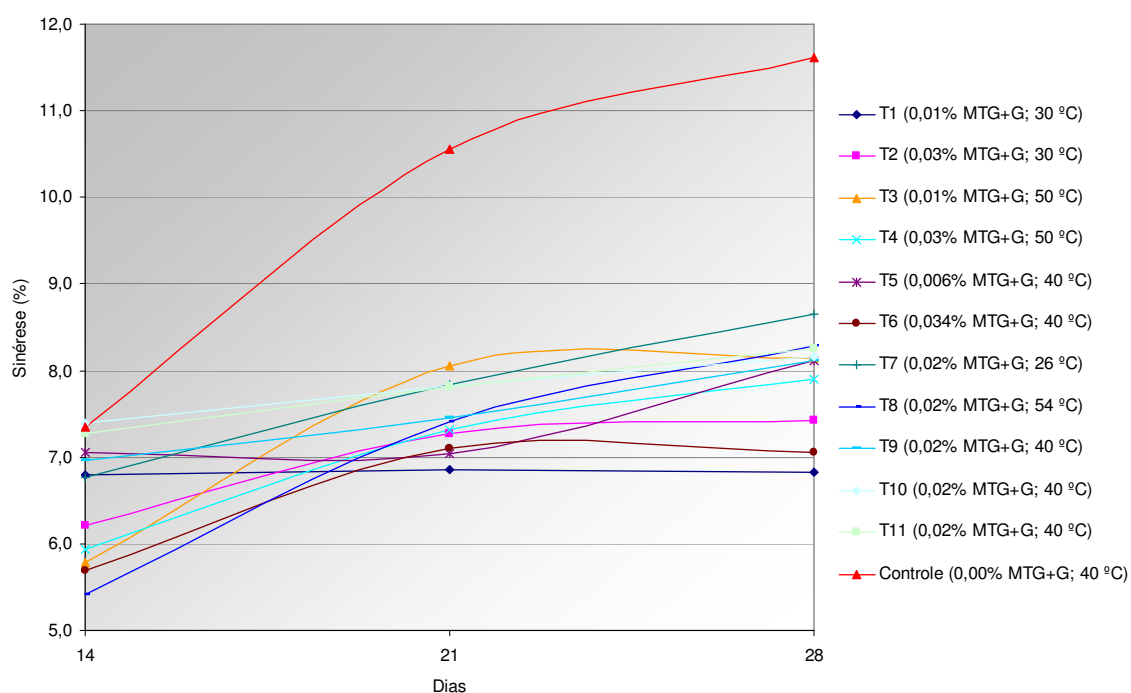


Figura 22 – Curvas do percentual de sinérese por centrifugação de toas as amostras durante a vida de prateleira

Os resultados obtidos da análise estatística dos dados de sinérese mostraram que após 14 dias de armazenagem as bebidas preparadas com 0,03% de MTG+G e incubada a 30 °C (T2); com 0,01% de MTG+G incubada a 50 °C (T3); com 0,03% de MTG+G incubada a 50 °C (T4); com 0,034% de MTG+G incubada a 40 °C (T6) e com 0,02% de MTG+G incubada a 54 °C (T8) apresentaram diferença significativa no índice de sinérese ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle e não apresentaram diferença significativa entre elas ( $p > 0,05$ ). Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) das bebidas preparadas com 0,01% de MTG e incubada a 30 °C (T1); com 0,006% de MTG+G incubada a 40 °C (T5); com 0,02% de MTG+G incubada a 26 °C (T7) e com 0,02% de MTG+G incubada a 40 °C (T9, 10 e T11) em relação ao controle e nem entre elas. Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) das bebidas preparadas com 0,01% de MTG+G incubada a 50 °C (T3); com 0,034% de MTG+G incubada a 40 °C (T6) e com 0,02% de MTG+G incubada a 54 °C (T8) em relação às bebidas preparadas com 0,01% de MTG+G e incubada a 30 °C (T1); com 0,006% de MTG+G incubada a 40 °C (T5); com 0,02% de MTG+G incubada a 26 °C (T7) e com 0,02% de MTG+G incubada a 40 °C (T9, 10 e T11).

Após 21 e 28 dias de armazenagem todas as bebidas apresentaram diferença significativa no índice de sinérese ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle e não entre elas ( $p > 0,05$ ).

Os resultados mencionados mostram que após 14 dias de armazenagem as bebidas com concentrações enzimáticas iguais ou acima a 0,03% e ou incubadas em temperaturas



iguais ou maiores do que 50 °C tiveram uma redução significativa de sinérese ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle.

As bebidas com concentrações enzimáticas acima de 0,03% ou incubadas em temperaturas iguais ou maiores do que 50 °C tiveram uma redução significativa de sinérese ( $p < 0,05$ ) quando comparadas às bebidas com 0,02% ou menos de concentração enzimática incubadas em temperaturas iguais ou menores a 40 °C, também como observado na superfície de resposta (FIGURA 24) e nas curvas de contorno (FIGURA 25).

Não houve diferença entre as bebidas T9, T10 e T11 todas incubadas com 0,02% de MTG+G a 40 °C, resultados coerentes porque essas amostras eram os pontos centrais do delineamento e, portanto iguais.

Após 21 e 28 dias de vida de prateleira não há mais diferença significativa ( $p > 0,05$ ) no nível de sinérese entre as bebidas, indicando que a partir de 21 dias as concentrações enzimáticas e as temperaturas de incubação estudadas não fazem mais diferença. Todas as bebidas apresentaram redução significativa de sinérese ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle.

O uso da MTG+G na faixa de concentração de 0,006 a 0,034% com incubação entre 26 e 54 °C teve um efeito significativo na redução do nível de sinérese ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle, indicando que mesmo em baixas concentrações a MTG+G pode reduzir a sinérese em bebidas lácteas fermentadas após 21 dias de vida de prateleira.

A redução de sinérese em iogurtes tratados com MTG também foi relatada por Gauche et al., (2009) que trabalhando com MTG a  $0,5 \text{ U g}^{-1}$  de proteína e incubação a 40 °C por 2 horas, utilizando o método da centrifugação obteve uma redução de 31% de sinérese em relação ao controle para o iogurte sem adição de soro e reduções de 21 e 16% para os iogurtes com 20 e 30% de soro respectivamente. No presente trabalho para uma concentração enzimática e método parecidos foram obtidas reduções de 25 a 27,9% para um produto com 40% de soro.

Farnsworth et al., (2006) usando centrifugação obtiveram uma redução de mais de 40% na sinérese de iogurtes produzidos com leite de cabra utilizando MTG na concentração de 2 a  $4 \text{ U g}^{-1}$  de proteína incubada a 50 °C por 1 hora. Bönisch et al., (2007b) relataram que não foi observada sinérese nos iogurtes produzidos com  $0,6 \text{ U g}^{-1}$  incubada a 42 °C por 3 horas, o percentual de sinérese observado no iogurte sem tratamento enzimático não é mencionado.

Ozer et al. (2007) observaram uma redução de 23% da sinérese de iogurtes tratados com MTG a aproximadamente  $0,6 \text{ U g}^{-1}$  de proteína após 14 dias de armazenagem. Kurai-shi, Sakamoto & Soeda, (1996) relataram uma redução de 50% na sinérese de iogurtes tratados com MTG a  $1 \text{ U g}^{-1}$  de proteína.

Iogurtes nos quais o leite para a sua obtenção foi tratado com MTG têm a sua capacidade de reter a água aumentada ou melhorada devido às ligações cruzadas formadas nas

proteínas e entre elas melhorando a estabilidade da matriz formada no sistema (KURAISHI, SAKAMOTO & SOEDA, 1996; MOTOKI & SEGURO, 1998). Essas ligações cruzadas levam a uma diminuição da permeabilidade do gel que por sua vez forma uma microestrutura mais compacta e estável aumentando a capacidade deste de reter a água na sua matriz (FAERGMAND & QVIST, 1997; FAERGMAND et al., 1999; LAUBER, HENLE & KLOSTERMEYER, 2000).

#### 4.4.2 Otimização das condições de atuação da enzima – resultados de sinérese por centrifugação

Após 14, 21 e 28 dias de fabricação foram medidas a sinérese por centrifugação das 11 amostras produzidas de acordo com o planejamento experimental. Os resultados obtidos são mostrados na tabela 15.

Tabela 15 – Planejamento experimental x resultados obtidos de sinérese após 14, 21 e 28 dias pelo método da centrifugação

Ensaio	MTG+G (%)		Temperatura (°C)		Sinérese (%)		
	Codificada	Real	Codificado	Real	14 dias	21 dias	28 dias
1	- 1	0,01	-1	30	7,02	7,10	7,03
2	+ 1	0,03	-1	30	6,02	7,00	7,16
3	-1	0,01	+ 1	50	5,71	8,30	8,37
4	+ 1	0,03	+ 1	50	6,02	7,44	8,17
5	- $\alpha$	0,006	0	40	7,36	7,39	8,71
6	+ $\alpha$	0,034	0	40	5,72	7,36	8,20
7	0	0,02	- $\alpha$	26	6,57	7,54	8,22
8	0	0,02	+ $\alpha$	54	5,25	7,68	8,48
9	0	0,02	0	40	7,03	7,61	8,24
10	0	0,02	0	40	7,45	7,93	8,26
11	0	0,02	0	40	7,39	7,97	8,42
1	- 1	0,01	-1	30	6,59	6,62	6,63
2	+ 1	0,03	-1	30	6,39	7,53	7,70
3	-1	0,01	+ 1	50	5,85	7,81	7,91
4	+ 1	0,03	+ 1	50	5,85	7,19	7,63
5	- $\alpha$	0,006	0	40	6,75	6,71	7,53
6	+ $\alpha$	0,034	0	40	5,67	6,86	5,91
7	0	0,02	- $\alpha$	26	6,96	8,13	9,07
8	0	0,02	+ $\alpha$	54	5,57	7,13	8,08
9	0	0,02	0	40	6,92	7,32	7,99
10	0	0,02	0	40	7,34	7,71	8,06
11	0	0,02	0	40	7,14	7,64	8,08

Os resultados foram analisados pelo programa estatístico *Minitab versão 15.1* gerando os gráficos, os coeficientes e a equação apresentados a seguir.

A figura 23 mostra o gráfico da distribuição dos resíduos ao longo da curva normal. Observa-se no gráfico que os resíduos estão bem distribuídos e alinhados com a curva normal indicando que os dados podem ser analisados pela análise de variância e obedecem ao modelo da distribuição normal que é a base da suposição para fazer a ANOVA.

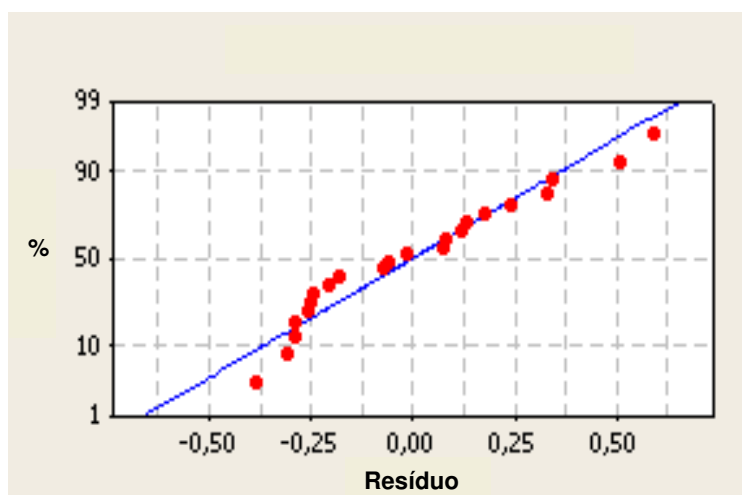


FIGURA 23 – GRÁFICO DA DISTRIBUIÇÃO DOS RESÍDUOS AO LONGO DA CURVA NORMAL – SINÉRESE PELO MÉTODO DA CENTRIFUGAÇÃO APÓS 14 DIAS

Na equação do modelo abaixo, foram utilizados para as variáveis os coeficientes de regressão significativos ( $p < 0,05$ ) e foram eliminadas as variáveis com coeficientes de regressão não significativos ( $p > 0,05$ )

$$Y = 7,2117 - 0,2960X_1 - 0,4014X_2 - 0,4308X_1^2 - 0,5746X_2^2$$

Onde,

Y = sinérese em %;

$X_1$  = variável codificada para concentração em % de MTG e;

$X_2$  = variável codificada para temperatura em °C

A análise de variância (ANOVA) do modelo codificado da viscosidade mostrou um valor de  $p$  para o coeficiente de regressão menor do que 0,05, sendo assim possível construir os gráficos de superfície de resposta.

As figuras 24 e 25 mostram respectivamente o gráfico da superfície de resposta e as curvas de contorno obtidas com a equação do modelo.

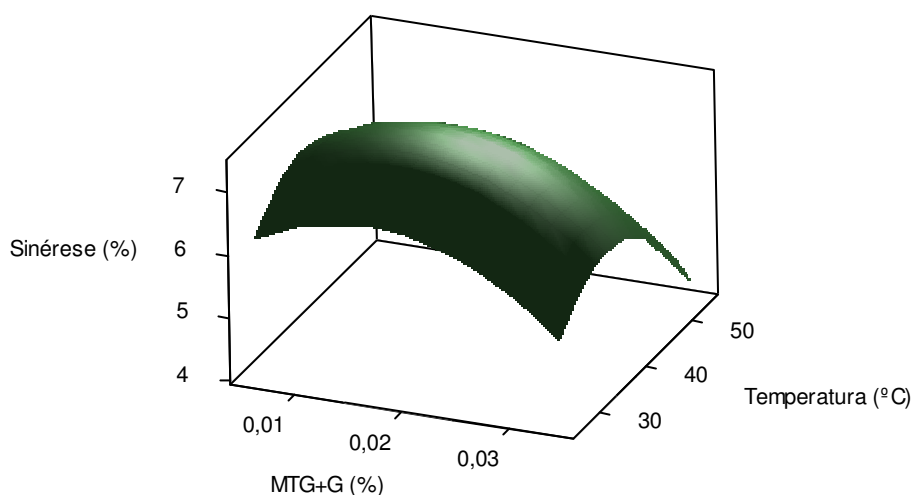


Figura 24 – Superfície de resposta do modelo – sinérese por centrifugação dos ensaios descritos na tabela 15 após 14 dias de armazenagem

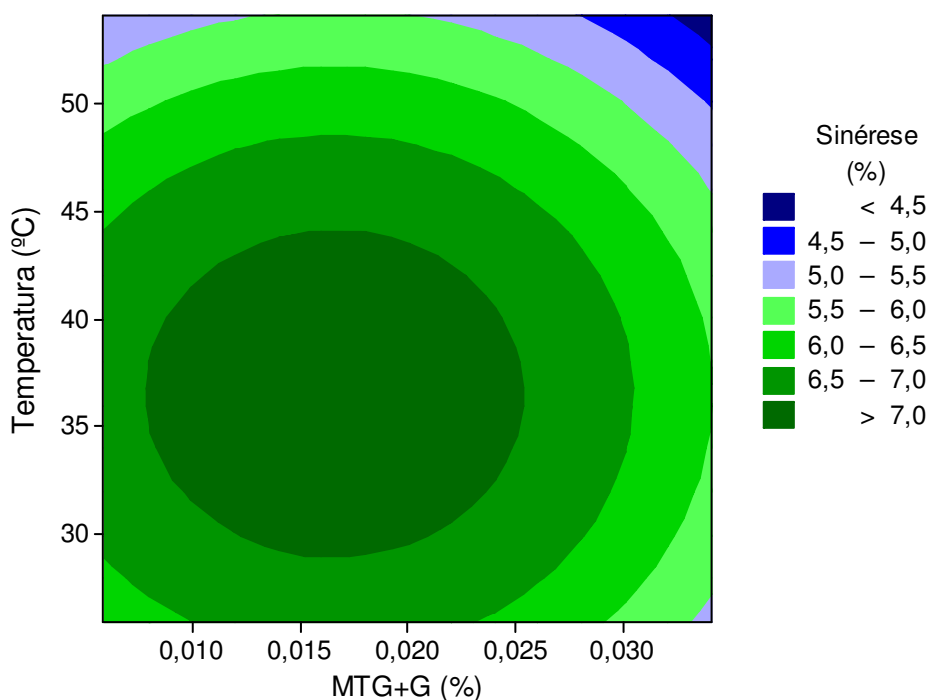


Figura 25 – Curvas de contorno do modelo – sinérese por centrifugação dos ensaios descritos na tabela 15 após 14 dias de armazenagem

As análises da superfície de resposta e das curvas de contorno mostram que para 40 minutos de incubação e após 14 dias, concentrações iguais ou acima de 0,03% combinadas com temperaturas entre 26 e 54 °C produziram um menor percentual de sinérese e temperaturas iguais ou maiores do que 50 °C combinadas com concentrações enzimáticas de 0,006 a 0,034% produziram um menor percentual de sinérese. Concentrações enzimáticas entre

0,01 e 0,025% combinadas com temperaturas entre 30 e 43 °C aproximadamente teriam o pior efeito em relação à sinérese

A sinérese é formada pela contração do gel (Lucey, 2002), como comentado no item 4.4.1 as ligações cruzadas catalisadas pela MTG levam a uma formação de uma microestrutura no sistema mais compacta e estável aumentando a capacidade de reter água na sua matriz (FAERGMAND & QVIST, 1997; FAERGMAND et al., 1999; LAUBER, HENLE & KLOSTERMEYER, 2000), o que minimizaria a contração. Observando a superfície de resposta (FIGURA 24) e as curvas de contorno (FIGURA 25) essa microestrutura parece ser mais compacta e, portanto sujeita a uma menor contração quando foi utilizada 0,03% de MTG+G com tratamento enzimático a 30 e 50 °C e 0,01% também a 30 e 50 °C, condições que apresentaram os menores índices de sinérese.

Ao contrário da viscosidade que quanto maior o número de ligações cruzadas maior o seu valor, em relação à sinérese após 14 dias parece que a formação de uma estrutura mais compacta está relacionada com como essas ligações são formadas; talvez os tipos de ligações formadas: inter ou intramoleculares e ou os tipos de polímeros formados (hetero, homo ou a extensão destes), ou ainda a velocidade que essas ligações são formadas (com 0,01% de MTG+G seriam formadas mais lentamente do que 0,02% e com 0,03% mais rapidamente) possam ter influenciado na formação da microestrutura do gel.

Para 21 e 28 dias a análise de variância (ANOVA) do modelo codificado da sinérese mostrou um valor de  $p$  para o coeficiente de regressão maior do que 0,05, portanto não significativo, não sendo possível a construção do gráfico da superfície de resposta e as curvas de contorno. Como comentado no item 4.4.1 após 21 dias de vida de prateleira não há mais diferença significativa no nível de sinérese entre as amostras ( $p > 0,05$ ), indicando que a partir de 21 dias as concentrações enzimáticas e as temperaturas de incubação estudadas não fazem mais diferença no nível de sinérese.

A contração do gel ocorre devido ao rearranjo das proteínas por meio de interações não-covalentes (Lucey, 2002), esse rearranjo ocorre de forma gradativa durante o armazenamento. As ligações cruzadas catalisadas pela transglutaminase podem limitar esses rearranjos uma vez que ligações covalentes são formadas entre as proteínas, diminuindo a formação de ligações não-covalentes. Após 21 dias esses rearranjos podem ter estacionado nas bebidas que apresentaram mais sinérese após 14 dias, e essas não apresentaram mais diferença estatística ( $p > 0,05$ ) no índice de sinérese após 21 dias em comparação com as outras bebidas que haviam apresentado menos sinérese após 14 dias.

#### 4.4.3 Comparação do percentual de sinérese espontânea das amostras em relação ao controle e durante a vida de prateleira

A seguir são apresentadas as curvas de percentual de sinérese espontânea de todas as amostras (FIGURA 26).

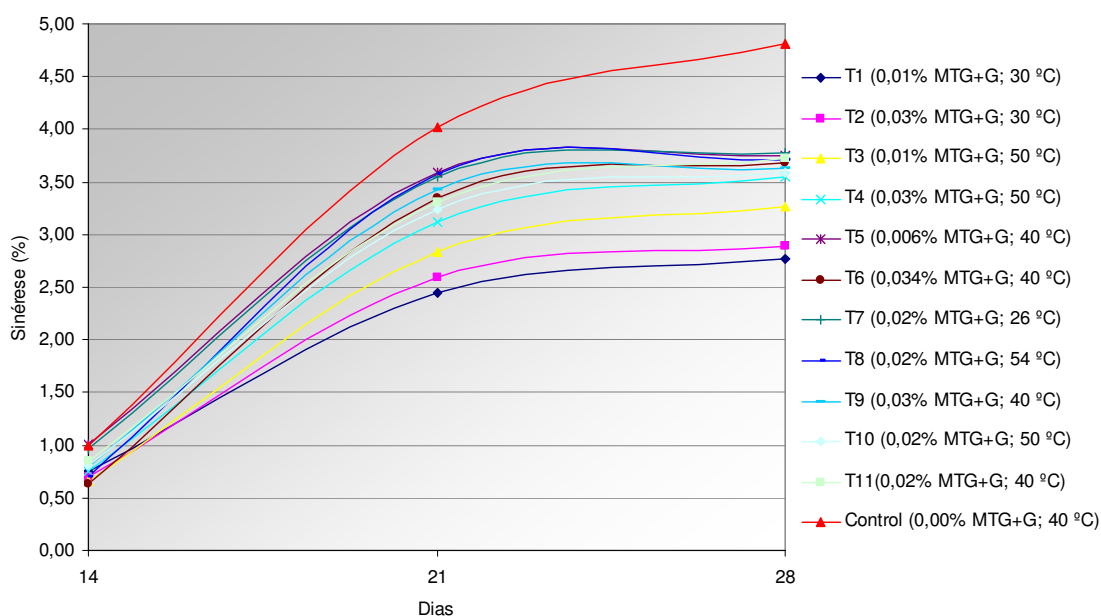


Figura 26 - Curvas do percentual de sinérese espontânea de todas as amostras durante a vida de prateleira

Os resultados obtidos da análise estatística dos dados de sinérese mostraram que após 14 dias de armazenagem as bebidas preparadas com 0,006% de MTG+G incubada a 40 °C (T5) e com 0,02% de MTG+G incubada a 26 °C (T7) não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) em relação ao controle e entre elas. Todas as outras bebidas apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle e às bebidas T5 e T7. Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) das bebidas incubadas com 0,01% de MTG+G a 50 °C (T3) e com 0,034% de MTG+G a 40 °C (T6) em relação às bebidas incubadas com 0,02% de MTG+G a 40 °C (T9, T10 e T11) e não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as bebidas T3 e T6 e entre as bebidas T9, T10 e T11. Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as bebidas incubadas com 0,01 e 0,03% de MTG+G a 30 °C (T1 e T2); com 0,01 e 0,03% a 50 °C (T3 e T4); com 0,034% de MTG+G a 40 °C (T6) e 0,02% de MTG+G a 54 °C (T8).

Após 21 e 28 dias de armazenagem todas as bebidas apresentaram diferença significativa de viscosidade ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle. Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as bebidas incubadas com 0,01 e 0,03% de MTG+G a 30 °C (T1 e T2) e es-

As 2 bebidas apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação a todas as outras. Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as bebidas incubadas com 0,01 e 0,03% a 50 °C (T3 e T4) e dessas amostras em relação às outras. Não houve diferença entre as bebidas incubadas com 0,006% de MTG+G a 40 °C (T5); com 0,034% de MTG+G a 40 °C (T6); com 0,02% de MTG+G a 26 °C (T7) e com 0,02% de MTG+G a 40 °C (T9, T10 e T11).

Esses resultados mostram que após 14 dias de vida de prateleira com exceção das bebidas com baixa concentração enzimática (0,006%) e com baixa temperatura de incubação (26 °C) todas as outras apresentaram níveis significativos mais baixos de sinérese ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle. As bebidas incubadas a temperaturas maiores ou iguais a 50 °C apresentaram menor índice de sinérese ( $p < 0,05$ ) do que aquelas incubadas a 40 °C com concentrações enzimáticas de 0,006 a 0,02%. Não houve diferença ( $p > 0,05$ ) entre as bebidas incubadas a 30 e 50 °C com 0,01 e 0,03% de MTG+G e nem entre as bebidas incubadas a 40 e 54 °C com concentrações de 0,034 e 0,02% de MTG+G respectivamente.

Como mencionado nos itens 4.4.1 e 4.4.2 a sinérese é formada pela contração do gel (Lucey, 2002), as ligações cruzadas catalisadas pela TG formam uma microestrutura do gel mais compacta (FAERGMAND & QVIST, 1997; FAERGMAND et al., 1999; LAUBER, HENLE & KLOSTERMEYER, 2000) o que diminuíram essa contração e conseqüentemente uma menor sinérese. A bebida com baixa concentração enzimática (0,006%) e a bebida a tratada a 26 °C não formaram ligações cruzadas suficientes para minimizar a contração do gel após 14 dias como nas outras bebidas.

Após 21 e 28 dias todas as bebidas apresentaram níveis de sinérese significativamente mais baixos ( $p < 0,05$ ) do que o controle, indicando como no método da centrifugação que mesmo em baixas concentrações a MTG+G pode reduzir a sinérese em bebidas lácteas fermentadas após 21 dias de vida de prateleira.

Da mesma forma como comentado no item 4.4.2, a contração do gel ocorre devido ao rearranjo das proteínas por meio de interações não-covalentes (Lucey, 2002), esse rearranjo ocorre de forma gradativa durante o armazenamento. As ligações cruzadas catalisadas pela transglutaminase podem limitar esses rearranjos uma vez que ligações covalentes são formadas entre as proteínas diminuindo a possibilidade de formação de ligações não-covalentes. Após 21 dias esses rearranjos podem ter estacionado nas bebidas que apresentaram mais sinérese após 14 dias, e essas não apresentaram mais diferença estatística ( $p > 0,05$ ) no índice de sinérese após 21 dias em comparação com as outras bebidas que haviam apresentado menos sinérese após 14 dias.

#### 4.4.4 Otimização das condições de atuação da enzima – resultados de sinérese espontânea

Após 14, 21 e 28 dias de fabricação foram medidas a sinérese espontânea das 11 amostras produzidas de acordo com o planejamento experimental. Os resultados obtidos são mostrados na tabela 16.

Tabela 16 – Planejamento experimental x resultados obtidos de sinérese espontânea após 14, 21 e 28 dias

Ensaio	MTG (%)		Temperatura (°C)		Sinérese (%)		
	Codificada	Real	Codificado	Real	14 dias	21 dias	28 dias
1	- 1	0,01	-1	30	0,78	2,48	2,85
2	+ 1	0,03	-1	30	0,72	2,64	2,92
3	-1	0,01	+ 1	50	0,68	2,87	3,33
4	+ 1	0,03	+ 1	50	0,79	3,14	3,59
5	- $\alpha$	0,006	0	40	1,04	3,68	3,78
6	+ $\alpha$	0,034	0	40	0,65	3,39	3,71
7	0	0,02	- $\alpha$	26	1,03	3,59	3,80
8	0	0,02	+ $\alpha$	54	0,72	3,67	3,74
9	0	0,02	0	40	0,82	3,45	3,66
10	0	0,02	0	40	0,79	3,31	3,50
11	0	0,02	0	40	0,83	3,40	3,72
1	- 1	0,01	-1	30	0,74	2,40	2,69
2	+ 1	0,03	-1	30	0,68	2,55	2,85
3	-1	0,01	+ 1	50	0,64	2,81	3,21
4	+ 1	0,03	+ 1	50	0,73	3,11	3,51
5	- $\alpha$	0,006	0	40	0,97	3,49	3,71
6	+ $\alpha$	0,034	0	40	0,62	3,29	3,65
7	0	0,02	- $\alpha$	26	0,92	3,51	3,75
8	0	0,02	+ $\alpha$	54	0,68	3,48	3,67
9	0	0,02	0	40	0,77	3,41	3,59
10	0	0,02	0	40	0,83	3,18	3,68
11	0	0,02	0	40	0,86	3,21	3,74

Os resultados foram analisados pelo programa estatístico *Minitab versão 15.1* e as análises de variância do modelo codificado da sinérese espontânea para 14, 21 e 28 dias mostraram valores de  $p$  para o coeficiente de regressão maior do que 0,05, portanto não sendo possível a construção do gráfico da superfície de resposta e as curvas de contorno.



#### 4.4.5 Comparação dos métodos – centrifugação x espontânea

Comparando-se os métodos é possível observar que, pela superfície de resposta e as curvas de contorno obtidas, o método da centrifugação após 14 dias indica claramente as faixas de concentração e temperatura que têm o melhor efeito em relação à sinérese (concentrações iguais ou maiores do que 0,03% de MTG+G com incubação de 26 a 54 °C, ou temperaturas de incubação iguais ou maiores do que 50 °C com concentrações de 0,006% a 0,034% de MTG+G), enquanto que pelo método espontâneo as melhores combinações são mais amplas, apenas são excluídas as concentrações de 0,006% de MTG+G a 40 °C e 0,02% de MTG+G a 26 °C.

Os métodos são coerentes após 21 e 28 dias de armazenagem, ambos apresentam redução significativa da sinérese de todas as amostras em relação ao controle.

Ainda após 21 e 28 dias o método espontâneo indica um desempenho significativo melhor das amostras incubadas a 30 e 50 °C com 0,01 e 0,03% de MTG+G em relação a todas outras amostras. Essa situação não é observada no método da centrifugação, ainda que as mesmas amostras tenham apresentado bons desempenhos esses não são significativos pela análise de variância.

A tabela 17 abaixo mostra a comparação da redução de sinérese dos dois métodos em relação ao controle durante a armazenagem por 28 dias e a tabela 18 a seguir mostra essa redução para todas as amostras.

Tabela 17 – Comparação da redução da sinérese dos dois métodos em relação ao controle durante a vida de prateleira

Período	Espontâneo (%)		Centrifugação(%)	
	Variação	Média	Variação	Média
14 dias	0,0 – 36,0	18,0	0,0 – 26,4	13,2
21 dias	10,9 – 39,0	25,0	23,8 – 35,0	29,4
28 dias	21,0 – 42,0	31,5	25,5 – 42,0	33,8
Média final		24,8		25,5

Após 14 dias o método espontâneo apresenta uma maior redução de sinérese, após 21 dias o desempenho é melhor pelo método da centrifugação e após 28 dias os métodos se equivalem. Considerando a média final dos 3 períodos estudados os dois métodos se equivalem.

Tabela 18 – Redução percentual da sinérese das amostras em relação ao controle dos dois métodos durante a vida de prateleira

Amostras	Concen- tração de MTG+G (%)	Concen- tração de MTG+G (U g <sup>-1</sup> de proteína)	T de incu- bação (°C)	Redução da sinérese em relação ao controle (%)							
				Espontâneo				Centrifugação			
				14 dias	21 dias	28 dias	Média	14 dias	21 dias	28 dias	Média
T1	0,01	0,47	30	23,88	39,22	42,32	35,14	7,49	35,04	41,24	27,92
T2	0,03	1,41	30	30,06	35,52	40,01	35,20	15,57	31,18	36,06	27,60
T3	0,01	0,47	50	34,04	29,34	31,96	31,78	21,44	23,69	29,95	25,03
T4	0,03	1,41	50	24,09	22,30	26,09	24,16	19,27	30,69	32,02	27,33
T5	0,006	0,28	40	+0,56	10,87	22,02	10,78	4,05	33,23	30,15	22,48
T6	0,034	1,60	40	36,27	16,93	23,40	25,53	22,57	32,65	39,33	31,52
T7	0,02	0,94	26	2,47	11,63	21,39	11,83	7,95	25,76	25,59	19,77
T8	0,02	0,94	54	29,48	11,12	22,92	21,17	26,39	29,82	28,77	28,33
T9	0,02	0,94	40	20,36	14,75	24,62	19,91	5,19	29,31	30,19	21,56
T10	0,02	0,94	40	18,79	19,30	25,33	21,14	+0,55	25,91	29,81	18,39
T11	0,02	0,94	40	15,32	17,75	22,48	18,51	1,20	26,06	29,00	18,75

Observando a tabela 18 em ambos os métodos as bebidas T1, T2, T3, T4 e T6 apresentaram os melhores desempenhos com exceção à amostra T8 que no método da centrifugação apresentou o segundo melhor desempenho.

A amostra T6 que mostrou o melhor desempenho em relação à viscosidade apresentou também o melhor desempenho para sinérese pelo método da centrifugação e o quarto melhor desempenho pelo método espontâneo.

A amostra T2 que mostrou o segundo melhor desempenho para viscosidade, apresentou o melhor desempenho para sinérese espontânea e o quarto melhor pelo método da centrifugação.

O método por centrifugação permite padronizar a análise com a aplicação de uma força externa e estabelecer uma comparação de qual índice seria aceitável ou melhor com base em um histórico de análises do controle, enquanto que o método espontâneo não simula uma possível variação da cadeia de frio, o que poderia gerar mais sinérese, e consequentemente poderia gerar uma falsa conclusão.

#### 4.5 VARIAÇÃO DO pH DURANTE A VIDA DE PRATELEIRA

A seguir são mostradas as curvas da variação de pH de todas as amostras durante a vida de prateleira (FIGURA 27) de acordo com o delineamento experimental descrito no item 3.2.3. Os valores utilizados são a média de 2 repetições dos experimentos.

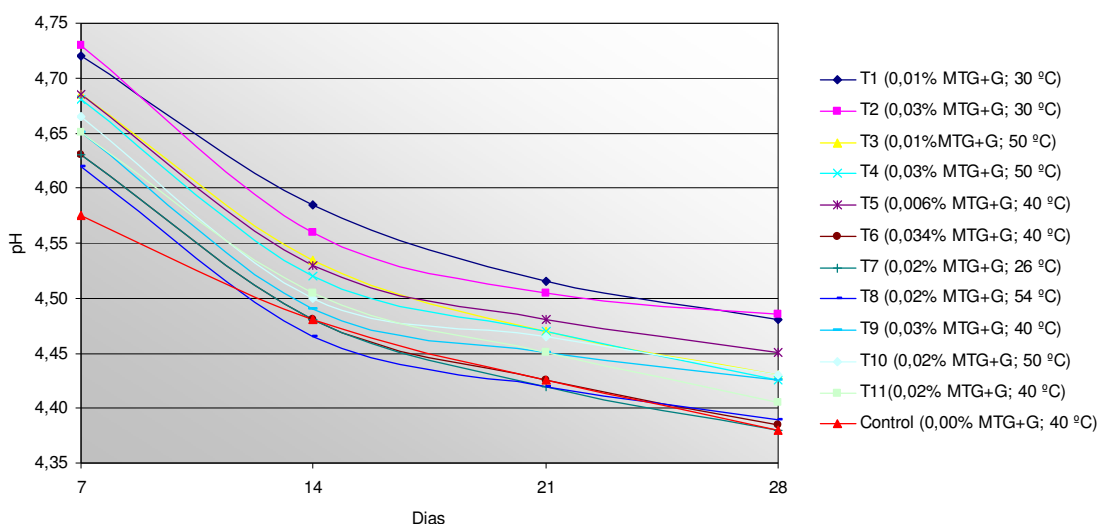


Figura 27 – variação do pH das amostras durante a armazenagem

Em relação à variação do pH durante a armazenagem por 28 dias, as médias foram comparadas pelo teste de Duncan e verificou-se que não houve diferença significativa entre as médias das amostras e o controle ao nível de significância de 5%, portanto não houve diferença significativa na pós-acidificação das amostras comparadas a do controle após 7, 14, 21 e 28 dias; resultados de acordo com os obtidos por Bönisch et al , (2007a e 2007b) que não observaram diferença na pós-acidificação das amostras tratadas ou não com a MTG e em desacordo com os resultados obtidos por Lorenzen et al, (2002) que observaram uma pós-acidificação menor nos iogurtes tratados com MTG.

Da mesma forma como no item 4.2 essa diferença observada entre experimentos de outros trabalhos pode estar relacionada às diferentes condições experimentais, concentração e tipo de cultura utilizadas (BÖNISCH et al., 2007b)

## 4.6 RESULTADOS DA ANÁLISE SENSORIAL

Foi realizada a análise sensorial da bebida controle (sem tratamento enzimático) comparada com a bebida T6 com 0,034% de MTG incubada a 40 °C por 40 minutos, ou seja, a bebida do ponto ótimo pela metodologia de superfície de resposta em relação à concentração enzimática e temperatura de incubação. Essa amostra foi escolhida porque apresentou a viscosidade mais alta entre todas as amostras sem descaracterizar a bebida láctea fermentada. Apresentou o menor índice de sinérese pelo método da centrifugação e também um índice significativamente menor de sinérese ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle pelo método espontâneo sendo, portanto uma das mais prováveis escolhas para um desenvolvimento industrial.

A análise foi realizada com 30 provadores não treinados, os atributos avaliados e os respectivos resultados são apresentados abaixo.

### 4.6.1 Aceitação geral e sabor

Foi utilizada escala hedônica de 9 pontos. Os resultados (FIGURAS 28 e 29 e TABELA 19) não mostraram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre o controle (Padrão) e a bebida tratada com enzima (Enzima).

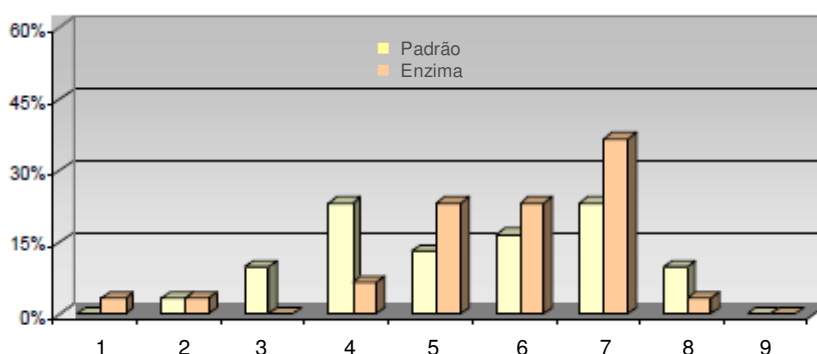


Figura 28 – Resultados para aceitação geral

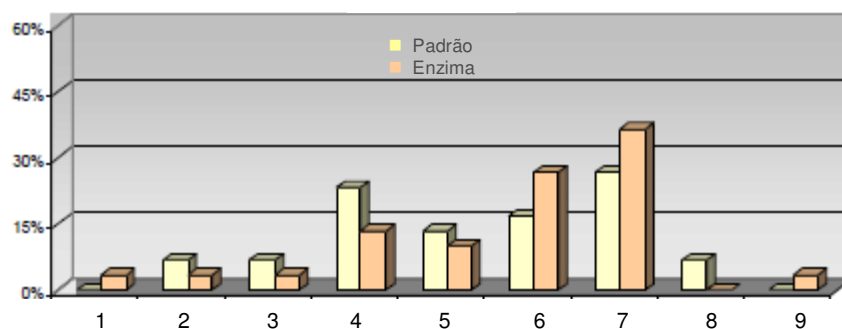


Figura 29 – Resultados para aceitação de sabor

Tabela 19 – Resultados para aceitação geral e sabor

Atributo	Padrão	Enzima
Aceitação geral	5,40a	5,77a
Aceitação sabor	5,33a	5,70a

Valores mais prováveis com letras idênticas na mesma linha indicam que não existe diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os atributos

A escala utilizada foi hedônica de 9 pontos, os resultados tanto para a bebida sem tratamento enzimático (Padrão) como para a bebida tratada (Enzima) estão aproximadamente no meio da escala. Os resultados mostram que a ação da enzima não teve influência negativa no sabor da amostra e nem na aceitação geral.

#### 4.6.2 Intensidade de sabor, acidez, cremosidade e consistência

Foi utilizada escala JAR de 5 pontos. Os resultados (TABELA 20) não mostraram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre o controle (Padrão) e a amostra (Enzima).

Tabela 20 – Resultados para intensidade de sabor, acidez, consistência e cremosidade

Atributo	Padrão	Enzima
Sabor	3,00a	2,83a
Acidez	3,27a	3,07a
Consistência	2,53a	2,73a
Cremosidade	2,57a	2,63a

Valores mais prováveis com letras idênticas na mesma linha indicam que não existe diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os atributos

Mais uma vez os resultados indicam que a ação da enzima não teve influência no sabor, os gráficos mostram uma tendência pela preferência do sabor e da acidez (FIGURA 30) da bebida preparada com enzima (Enzima).

Em relação à consistência era esperada uma percepção significativa da diferença de consistência entre as bebidas, o que não ocorreu, mas o gráfico da preferência de consistência (FIGURA 31) mostra uma tendência para a preferência da consistência da bebida tratada com enzima (Enzima).

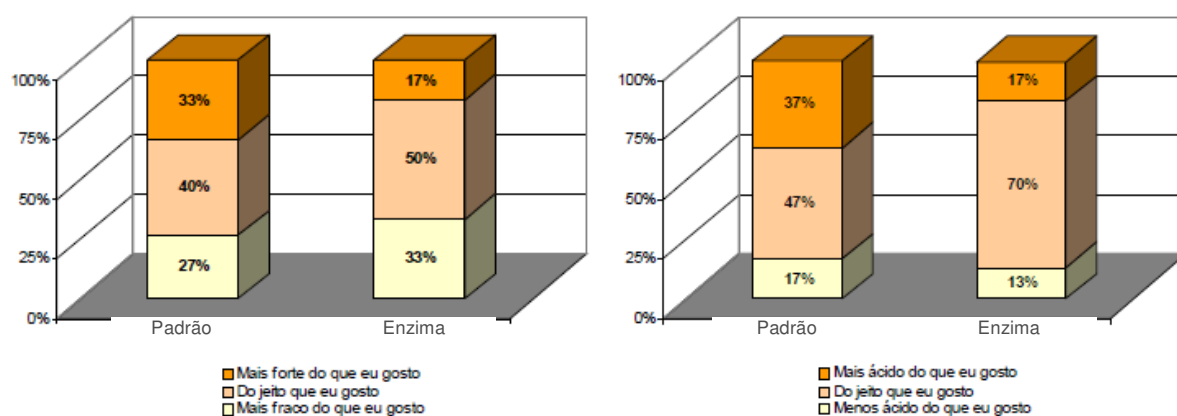


Figura 30 – Comparação da preferência de sabor e da acidez do controle (padrão) com a bebida tratada com enzima (enzima)

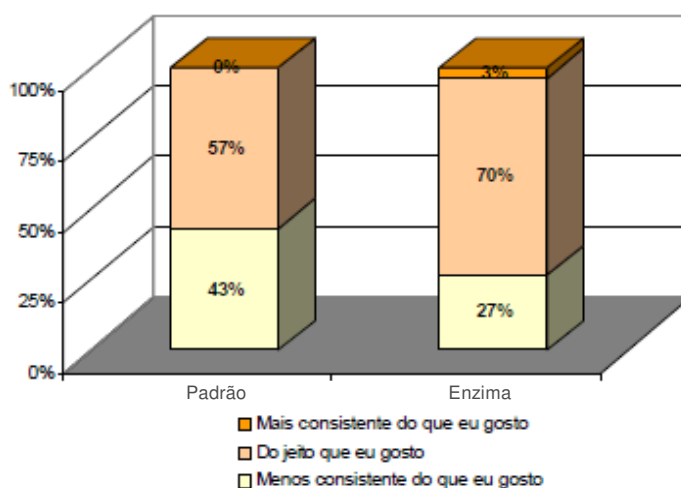


Figura 31 – Comparação da preferência de consistência entre o controle (padrão) e a bebida tratada com enzima (enzima)

#### 4.6.3 Intenção de compra

Foi utilizada escala de 5 pontos. Os resultados (TABELA 21) não mostraram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre o controle (Padrão) e a bebida preparada com enzima (Enzima), mas os gráficos da intenção de compra (FIGURA 32) mostram uma tendência de uma maior intenção de compra da bebida preparada com enzima (Enzima), 43% disseram que comprariam contra 20% do controle (Padrão). Os gráficos mostram também uma menor rejeição da bebida tratada com enzima (Enzima), 30% disseram que não comprariam contra 43% do controle (Padrão).

Tabela 21 – Resultados para intenção de compra

Atributo	Padrão	Enzima
Intenção de compra	2,67a	3,07a

Valores mais prováveis com letras idênticas na mesma linha indicam que não existe diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os atributos

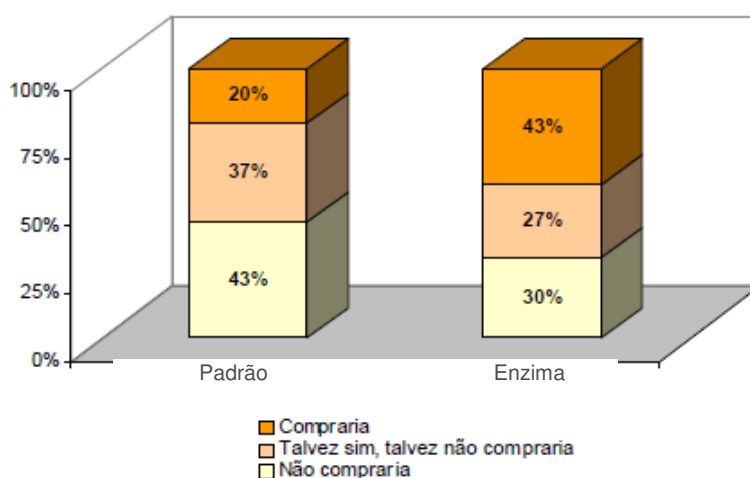


Figura 32 – Resultados para intenção de compra entre o controle (padrão) e a bebida tratada com enzima (enzima)

#### 4.7.4 Preferência

Os resultados (FIGURA 33) mostraram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o controle (Padrão) e a bebida preparada com enzima (Enzima).

A bebida tratada com enzima (Enzima) apresentou uma preferência de 77% contra 23% do controle (Padrão). Indicando uma confirmação das tendências observadas nos gráficos de preferência de sabor e acidez (FIGURA 30), 50% disseram que o sabor estava como os provadores preferiam contra 40% do controle (Padrão); em relação à acidez 70% dos provadores mencionaram que preferiam esse atributo da bebida preparada com enzima contra 47% em relação ao controle (Padrão).

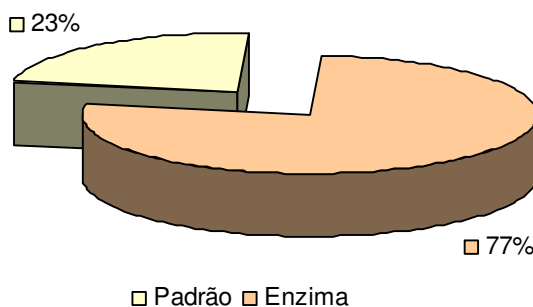


Figura 33 – Resultados para preferência

Tendência também observada na preferência de consistência (FIGURA 31), 70% dos provadores preferiram a consistência da bebida preparada com enzima (Enzima) contra 57% do controle (Padrão). E na intenção de compra (FIGURA 32), com um percentual de provadores que comprariam a bebida tratada com enzima (Enzima) maior do que comprariam o controle (Padrão) e uma menor rejeição para a bebida tratada com enzima (Enzima).

Ozer et al. (2007) utilizaram uma avaliação sensorial baseada no reconhecimento da importância relativa de atributos selecionados (aceitação geral, acidez, separação de soro, viscosidade e palatabilidade) e observaram que os iogurtes firmes produzidos com altas concentrações de MTG ( $\geq 13 \text{ U g}^{-1}$  de proteína) receberam as maiores notas referentes à palatabilidade e a aparência. Nas amostras tratadas com concentrações mais baixas de MTG ( $\leq 6,5 \text{ U g}^{-1}$  de proteína) não foram observadas diferenças na percepção da viscosidade pelos provadores quando comparadas ao controle, apesar da diferença do tipo de iogurte os resultados estão de acordo com os apresentados neste trabalho, não foi observada diferença significativa da consistência ( $p > 0,05$ ) da bebida tratada com MTG+G ( $1,60 \text{ U g}^{-1}$  de proteína) em relação ao controle. Já no trabalho de Lorenzen (2002) a análise sensorial mostrou que os iogurtes firmes produzidos com MTG apresentaram um sabor menos característico de iogurte e uma percepção maior de cremosidade, o que não foi observado na análise sensorial apresentada neste trabalho. Faergmand (1999) também observaram uma maior percepção de cremosidade nos iogurtes também firmes tratados com MTG.



## 5 CONCLUSÕES

Para um tempo fixo de incubação de 40 minutos para todas as bebidas e para as condições estudadas, adições iguais ou maiores do que 0,006% de preparação enzimática com temperaturas de incubação maiores ou iguais a 30 °C produziram aumento significativo de viscosidade em relação à bebida sem tratamento enzimático.

O aumento da concentração enzimática de 0,01 para 0,03% para as mesmas temperaturas (30 e 50 °C) produziu aumento significativo da viscosidade e o desempenho da enzima foi melhor na temperatura de 30 °C do que a 50 °C para as mesmas concentrações enzimáticas (0,01 e 0,03%).

As melhores condições de atuação foram de 0,034% de preparação enzimática (1,60 U g<sup>-1</sup> de proteína da bebida) a 40 °C, essa combinação apresentou um aumento na viscosidade de 81,3% e redução de 31,53% de sinérese em relação ao controle.

A temperatura de 40 °C para incubação da enzima é a mais adequada para produção de bebida láctea fermentada tratada com transglutaminase.

A ação enzimática não influenciou no comportamento reológico das bebidas. Todas apresentaram baixa tixotropia e comportamento pseudoplástico assim como o controle.

Em relação à sinérese, quando utilizado o método por centrifugação, após 14 dias de armazenagem, as amostras com concentrações enzimáticas iguais ou acima a 0,03% e ou incubadas em temperaturas iguais ou maiores do que 50 °C tiveram uma redução significativa de sinérese em relação ao controle. No mesmo período, quando utilizado o método espontâneo as bebidas com concentrações enzimáticas iguais ou maiores que 0,01% incubadas em temperaturas iguais ou maiores que 30 °C apresentaram redução significativa do índice de sinérese em relação ao controle, condições mais amplas do que as observadas pelo método por centrifugação.

Após 21 dias de armazenamento a  $8 \pm 1$  °C as concentrações enzimáticas e as temperaturas de incubação estudadas não afetam significativamente o índice de sinérese entre as bebidas tratadas enzimaticamente.

O uso da MTG, mesmo em baixas concentrações, reduz a sinérese em bebidas lácteas fermentadas após 21 dias de vida de prateleira.

A análise sensorial realizada com o controle e com a amostra que apresentou o melhor desempenho para viscosidade e sinérese por centrifugação, mostrou uma preferência significativa pela amostra tratada enzimaticamente de 77% em relação à bebida controle. A utilização da enzima no preparo da bebida não interferiu negativamente no sabor.

## REFERÊNCIAS

- ABOUMAHMUD, R.; SAVELLO, P. Crosslinking of whey protein by transglutaminase. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 2, p. 256-263, 1990.
- AJINOMOTO. **General information about transglutaminase**: catálogo (a).
- AJINOMOTO. **Ajinomoto Brasil**: catálogo. São Paulo, 2004 (b).
- AJINOMOTO. **ACTIVA®MP**: catálogo. São Paulo (c).
- AJINOMOTO. **ACTIVA®YG**: catálogo. São Paulo (d).
- ALMEIDA, K. E.; BONASSI, I. A.; ROÇA, R. O. Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijo minas frescal. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas. v. 21, n. 2, p. 187-192, mai./ago. 2001.
- AMATAYAKUL, T.; SHERKAT, F.; SHAH, N. P. Syneresis in set yoghurt as affected by EPS starter cultures and levels of solids. **International Journal of Dairy Technology**, v. 59, n. 3, p. 216-221, aug. 2006.
- AMERINE, M. A.; PANGBORN, R. M.; ROESSLER, E. B. **Principles of sensory evaluation of food**. New York: Academic Press, 1965. 802p.
- ANDO, H.; ADACHI, M.; UMEDA, K.; MATSUURA, A.; NONAKA, M.; UCHIO, R.; TANAKA, H.; MOTOKI, M. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. **Agric. Biol. Chem.**, vol. 53, n. 10, p. 2613-2617, 1989.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC international**. 16 ed. Arlington: AOAC, v. 2, chapter 33, 1995. p. 1-75.
- ATHERTON, H. V.; NEWLANDER, J. A. **Chemistry and testing of dairy products**. 4ª ed. Westport: Avi Publishing Company Inc., 1977. 388p.
- BARNES, H. A. Thixotropy – a review. **Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics**, v. 70, p. 1-33, 1997.
- BARONI, A. F.; FREITAS, I. C.; DA CUNHA, R. L.; HUBINGER, M. D.; MENEGALLI, F. C. Caracterização reológica de requeijão cremoso tradicional e com teor reduzido de gordura: viscosidade extensional e em cisalhamento. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 2, n. 1-2, p. 21-29, 1999.

BHULLAR, Y. S.; UDDIN, M. A.; SHAH, N. P. Effects of ingredients supplementation on textural characteristics and microstructure of yoghurt. **Milchwissenschaft**, v. 57, n. 6, p. 329-332, 2002.

BÖNISCH, M. P.; LAUBER, S.; KULOSIK, U. Effect of ultra-high temperature treatment on the enzymatic cross-linking of micellar casein and sodium caseinate by transglutaminase. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 8, p. 398-404, 2004.

BÖNISCH, M. P.; TOLKACH, A.; KULOSIK, U. Inactivation of an indigenous transglutaminase inhibitor in milk serum by means of UHT-treatment and membrane separation techniques. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 8, p. 669-678, 2006.

BÖNISCH, M. P.; HUSS, M.; LAUBER, S.; KULOZIK, U. Yoghurt gel formation by means of enzymatic protein cross-linking during microbial fermentation. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 4, p. 585-595, 2007a.

BÖNISCH, M. P.; HUSS, M.; WEITL, K.; KULOZIK, U. Transglutaminase cross-linking of milk proteins and impact on yoghurt gel properties. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 11 - rheology and structure of fermented milk, p. 1360-1371, 2007b.

BOURNE, M. C. **Food texture and viscosity: concept and measurement**. New York: Academic Press Inc., 1982. 325p.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters** – an introduction to design, data analysis, and model building. 2<sup>nd</sup> ed. New York: John Wiley & Sons, 1978. 653p.

BRASEQ Brasileira de Equipamentos. **Manual de instruções e operação do reômetro digital Brookfield modelo DV-III**, Manual nº M/S1-210-H596, 1998a.

BRASEQ Brasileira de Equipamentos. **Manual de instruções e operação do software rheocalc** (rheocalc V1.0 Brookfield Engineering Laboratories 1995), 1998b.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria 369, de 4 de setembro de 1997. **Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite em pó**. Brasília, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 36, de 31 de outubro de 2000. **Regulamento técnico de identidade e qualidade de bebidas lácteas**. Brasília, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 51, de 18 de setembro de 2002. **Regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a Granel.** Brasília, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 16, de 23 de agosto de 2005. **Regulamento técnico de identidade e qualidade de bebida láctea.** Brasília, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 46, de 23 de outubro de 2007. **Regulamento técnico de identidade e qualidade de leites fermentados.** Brasília, 2007.

CAPITANI, C. D.; PACHECO, M. T. B.; GUMERATO, H. F.; VITALI, A.; SCHMIDT, F. L. Recuperação das proteínas do soro de leite por meio de coacervação com polissacarídeo. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 40, n. 11, p. 1123-1128, nov. 2005.

CODEX Alimentarius. **Standard for whey powders.** Codex Stan A-15 – 1995, rev. 1-2003, amd. 2006.

COZZOLINO, A.; DI PIERRO, P.; MARINIELLO, L.; SORRENTINO, A.; MASI, P.; PORTA, R.; Incorporation of whey proteins into cheese curd by using transglutaminase. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, Great Britain, v. 38, n. 3, p. 289-295, 2003.

CUNHA, T. M.; CASTRO, P. F.; BARRETO, P. L. M.; BENEDET, H. D.; PRUDÊNCIO, E. F.; et al. Avaliação físico-química, microbiológica e reológica de bebida láctea e leite fermentado adicionados de probióticos. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 103-106, jan./mar. 2008.

DALGLEISH, D.G.; SPAGNUOLO, P. A.; GOFF, H. D. A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 1025-1031, 2004.

DE JONG, G. A. H.; BOUMANS, J. W. L.; WIJNGAARDS, G. **Food grade transglutaminase inhibitor and uses thereof.** United States patent number: 7491410. 2009.

DE PAULA, A. C.; VIOLA, G. S.; SOUZA, J. S.; SIMÕES, P. M. **Estudo da utilização da enzima Activa transglutaminase na fabricação de iogurte.** 65f. Trabalho de Graduação. Escola de Engenharia Mauá - Departamento de Engenharia Química e de Alimentos do Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, 2000.

DATAMARK Ltda. **Brasil pack '09** – a indústria brasileira de embalagens. ed. 24. São Paulo, 2009.

DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos**. 20. ed. Curitiba: Champagnat, 1996. 123p.

EL-NOUR, A. M. A.; EL-KHOLY, A. M.; EL-SALAM, M. H. A. Rheological properties of cows' milk yoghurt treated by transglutaminase. **Egyptian Journal of Dairy Science**, v. 32, n. 1, p. 73-86, 2004.

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

FAERGEMAND, M.; SORENSEN, M. V.; JORGENSEN, U.; BUDOLFSEN, G.; QVIST, K.B. Transglutaminase: effect on instrumental and sensory texture of set style yoghurt. **Milchwissenschaft**, v. 54, n. 10, p. 563-566, 1999.

FARNSWORTH, J. P.; LI, J.; HENDRICKS, G. M.; GUO, M. R. Effects of transglutaminase treatment on functional properties and probiotic culture survivability of goat milk yogurt. **Small Ruminant Research**, v. 65, p. 113-121, 2006.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Dairy chemistry and biochemistry**. London: Blackie Academic & Professional, 1998. 478p.

GAUCHE, C.; TOMAZI, T.; BARRETO, P. L. M.; OGLIARI, P. J.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Physical properties of yoghurt manufactured with milk whey and transglutaminase. **LWT - Food and Science Technology**, v. 42, p. 239-243, 2009.

GAUCHE, C.; VIEIRA, J. T. C.; OGLIARI, P. J.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Crosslinking of milk whey proteins by transglutaminase. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 788-794, 2008.

GERRARD, J. A. Protein-protein crosslinking in food: methods, consequences, applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, p. 391-399, 2002.

GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C.; BECERRA, M.; CHÁFER, M.; ALBORS, A.; CAROT, J. M.; CHIRALT, A. Influence of substituting milk powder for whey powder on yogurt quality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, n. 9-10, p. 334-340, 2002.

GONZÁLEZ-TOMÁS, L.; COSTELL, E. Relation between consumers' perceptions of color and texture of dairy desserts and instrumental measurements using a generalized procrustes analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 12, p. 4511-4519, 2006.

GOZZO, A. M.; CUNHA, R. L.; MENEGALLI, F. C. Viscosidade extensional e em cisalhamento de suspensões acidificadas de amido de amaranto e caseinato de sódio. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 29, n. 3, p. 587-596, jul./set. 2009.

HAN, X-Q.; DAMODARAN, S. Thermodynamic compatibility of substrates proteins affects their cross-linking by transglutaminase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 5, p. 1211-1217, 1996.

HINZ, K.; HUPPERTZ, T.; KULOSIK, U.; KELLY, A. L. Influence of enzymatic cross-linking on milk fat globules and emulsifying properties of milk proteins. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 4, p. 289-293, 2007.

HIRATA, C. M. M.; HEGEDUS, C. E. N.; DE ROS TRÍBOLI, E. P.; LEONHARDT, G. F.; BARBOSA, M. C. **Normas para apresentação de documentos científicos: teses, dissertações, trabalhos acadêmicos e monografias**. São Caetano do Sul, SP: IMT-CEUN, 2006. 72p.

ISLETEN, M.; KARAGUL-YOUCSEER, Y. Effects of dried dairy ingredients on physical and sensory properties of non fat yoghurt. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 8, p. 2865-2872, 2006.

JAROS, D.; PARTSCHEFELD, C.; HENLE, T.; ROHM, H. Transglutaminase in dairy products: chemistry, physics, applications. **Journal of Texture Studies**, v. 37, n. 2, p. 113-155, 2006.

JAROS, D.; HEIDIG, C.; ROHM, H. Enzymatic modification through microbial transglutaminase enhances the viscosity of stirred yogurt. **Journal of Texture Studies**, v. 38, n. 2, p. 179-198, 2007.

KANAJI, T.; OSAKI, H.; TAKAO, T.; KAWAJIRI, H.; IDE, H.; MOTOKI, M.; SHIMONISHI, Y. Primary structure from a microbial transglutaminase from *Streptoverticillium* sp. strain s-8112. **The Journal of Biological Chemistry**, U. S. A., v. 268, n. 16, p. 11575-11572, jun. 1993.

KEOGH, M. K.; O'KENNEDY, B. T. Rheology of stirred yogurt as affected by added milk fat, proteins and hydrocolloids. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 1, p. 108-112, 1998.

KÜÇÜKÖNER, E.; TARAKÇI, Z. Influence of different fruit additives on some properties of stirred yoghurt during storage. **J. Agric. Sci.**, v. 13, n. 2, p. 97-101, 2003.

KULOZIK, U.; TOLKACH, A.; BULCA, S.; HINRICHS, J. The role of processing and matrix design in development and control of microstructures in dairy food production - a survey. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 8, p. 621-630, 2003.

KURAISHI, C.; SAKAMOTO, J.; SOEDA, T. The usefulness of transglutaminase for food processing. **Biotechnology for Improved Foods and Flavors** (reprinted from ACS Symposium Series 637), p. 29-38, 1996.

KURAISHI, C.; YAMAZAKI, K.; SUSAKI, Y. Transglutaminase: its utilization in the food industry. **Food Reviews International**, v. 17, n. 2, p. 221-246, 2001.

KURMANN, J. A.; RASIC, J. L.; KROGER, M. **Encyclopedia of fermented fresh milk products**: an international inventory of fermented milk, cream, buttermilk, whey, and related products. New York: Van Nostrand Reinhold, 1992. 368p.

LAUBER, S.; HENLE, T.; KLOSTERMEYER, H. Relationship between the crosslinking of caseins by transglutaminase and the gel strength of yoghurt. **European Food Research and Technology**, v. 210, n. 5, p. 305-309, 2000.

LEE, J. W.; LUCEY, A. J. Structure and physical properties of yogurt gels: effect of inoculation rate and incubation temperature. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 10, p. 3153-3164, 2004.

LEE, J. W.; LUCEY, A. J. Impact of gelation conditions and structural breakdown on the physical and sensory properties of stirred yogurts. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 7, p. 2374-2385, 2006.

LORENZEN, P. C. Enzymatic crosslinking of dairy proteins. **Bulletin of the International Dairy Federation**, n. 374, p. 30-36, 2002.

LORENZEN, P. C. Effects of varying time/temperature-conditions of pre-heating and enzymatic cross-linking on techno-functional properties of reconstituted dairy ingredients. **Food Research International**, v. 40, n. 6, p. 700-708, 2007.

LORENZEN, P. C.; NEVE, H.; MAUTNER, A.; SCHLIMME, E. Effect of enzymatic cross-linking of milk proteins on functional properties of set-style yoghurt. **International Journal of Dairy Technology**, v. 55, n. 3, p. 152-157, 2002.

LUCEY, J. A. Formation and physical properties of milk protein gels. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 2, p. 281-294, 2002.

LUCEY, J. A.; MUNRO, P. A.; SINGH, H. Whey separation in acid skim milk gels made with glucono- $\delta$ -lactone: effects of heat treatment and gelation temperature. **Journal of Texture Studies**, v. 29, n. 4, p. 413-426, 1998.

McKENNA, B. M. **Texture in food** - volume 1: semi-solid foods. Boca Raton: CRC Press LLC, 2003. p. 338-339.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory evaluation techniques**. 2<sup>nd</sup> ed. Boca Raton: CRC Press, Inc., 2000. 354p.

MIWA, N.; KAWASAKI-SHI, K.; KUMAZAWA, Y.; NAKAGOSHI, H.; SAKAGUCHI, S. **Method for modifying raw material milk and dairy product prepared by using the modified raw material milk.** Ajinomoto Co. Inc. Patent number: CA 2 358 381 C. 2007.

MOTOKI, M.; KUMAZAWA, Y. Recent research trends in transglutaminase technology for food processing. **Food Science Technology Research**, v. 6, p. 151-160, 2000.

MOTOKI, M.; SEGURO, K. Transglutaminase and its use for food processing. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, n. 5, p. 204-210, 1998.

MOUNSEY, J. S.; O'KENNEDY, B. T.; KELLY, P. M. Influence of transglutaminase treatment on properties of micellar caseins and products made therefrom. **Lait**, v. 85, p. 405-418, 2005.

NONAKA, M.; TANAKA, H.; OKIYAMA, A.; MOTOKI, M.; ANDO, H.; UMEDA, K.; MATSURA, A. Polymerization of several proteins by  $\text{Ca}^{2+}$ -independent transglutaminase derived from microorganisms. **Agric. Biol. Chem.**, v. 53, n. 10, p. 2619-2623, 1989.

O'SULLIVAN, M. M.; KELLY, A. L.; FOX, P. F. Effect of transglutaminase on the heat stability of milk: a possible mechanism. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 1, p. 1-7, 2002.

OZER, B.; HIRMACI, H. A.; OSTEKIN, S.; HAYALOGU, A.; ATAMER, M. Incorporation of microbial transglutaminase into non-fat yogurt production. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 3, p. 199-207, 2007.

PARNELL-CLUNIES, E.; KAKUDA, Y.; deMAN, J. M.; CAZZOLA, F. Gelation profiles of yogurt as affected by heat treatment of milk. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 3, p. 582-588, 1988.

PENNA, A. L. B.; BARUFFALDI, R.; OLIVEIRA, M. N. Optimization of yogurt production using demineralized whey. **Journal of Food Science**, v. 62, n. 4, p. 846-850, 1997.

PENNA, A.L.B.; OLIVEIRA, M.N.; TAMINE, A. Influence of carrageenan and total solids content on the rheological properties quality of lactic beverage made with yogurt and whey. **Journal of Texture Studies**, v. 34, n. 1, p. 95-113, 2003.

PICCOLO, K. C. **Avaliação do efeito da enzima transglutaminase no processo de produção do requeijão cremoso.** 101f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) Escola de Engenharia Mauá - Departamento de Engenharia Química e de Alimentos do Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, 2006.

RADKE-MITCHEL, L. C.; SANDINE, W.E. Influence of temperature on associative growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. **Journal of Dairy Science**, v. 69, n. 10, p. 2558-2568, 1986.



SAINT-EVE, C.; LÉVY, N. M.; SOUCHON, I. Influence of proteins on the perception of flavored stirred yogurts. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 3, p. 922-933, 2006.

SAKAMOTO, H.; KUMASAWA, Y.; MOTOKI, M. Strength of protein gels prepared with microbial transglutaminase as related to reaction conditions. **Journal of Food Science**, v. 59, p. 866-871, 1994.

SGARBIERI, V.C. Revisão: propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 1, p. 43-56, jan./mar. 2005.

SHARMA, R.; LORENZEN, P. C.; QVIST, K. B. Influence of transglutaminase treatment of skim milk on the formation of  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine) and the susceptibility of individual proteins towards crosslinking. **International Dairy Journal**, v. 11, n.10, p. 785-793, 2001.

SISO, M. I. G. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Biotechnology Resource**, Great Britain, v. 57, p. 1-11, 1996.

SIVIERI, K.; OLIVEIRA, M. N. Avaliação da vida-de-prateleira de bebidas lácteas preparadas com "fat replacers" (Litesse e Dairy-lo). **Ciênc. Tecnol. Alimen.**, Campinas, v. 22, n. 1, p. 24-31, jan./abr. 2002.

SOUKOULIS, C.; PANAGIOTIDIS, P.; KOURELI, R.; TZIA, C. Industrial yogurt manufacture: monitoring of the fermentation process and improvement of final product quality. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 6, p. 2641-2654, 2007.

STAFFOLO, M. D.; BERTOLA, N.; MARTINO, M.; BEVILACQUA, A. Influence of dietary fiber addition on sensory and rheological properties of yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 14, 2004. 263-268p.

TAMINE, A. Y.; ROBINSON, R.K. **Yogur: ciencia y tecnologia**. Zaragoza: Editorial Acribia S.A., 1991. p. 239-241.

TAMINE, A. Y.; ROBINSON, R. K. **Yoghurt: science and technology**. 2<sup>nd</sup> ed. Boca Raton: Woodhead Publishing Ltd, 1999. 619p.

TEIXEIRA, L. V.; FONSECA, L. M. Perfil físico-químico do soro de queijos mozzarella e minas-padrão produzidos em várias regiões do estado de Minas Gerais. **Arq. Bras. Méd. Vet. Zoot**, v. 6, n. 1, p. 243-250, 2008.

TELES, C. D.; FLÔRES, S. H. Influência da adição de espessante e leite em pó nas características reológicas do iogurte desnatado. **B. CEPPA**, Curitiba, v. 25, n. 2, p. 247-256, jul./dez. 2007

TETRA PAK Processing systems AB. **Dairy processing handbook**. Sweden. 1995. p. 241-255

THAMER, K. G.; PENNA, A. B. Efeito do teor de soro, açúcar e de frutooligossacarídeos sobre a população de bactéria lácticas probióticas em bebidas fermentadas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 3, p. 393-400, jul./set. 2005.

THAMER, K. G.; PENNA, A. B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 26, n. 3, p. 589-595, jul./set. 2006.

TRUONG, V.; CLARE, D. A.; CATIGNANI, G. L.; SWAISGOOD, H. E. Cross-linking and rheological changes of whey proteins treated with microbial transglutaminase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1170-1176, 2004.

VASBINDER, A. J.; ALTING, A. C.; VISSCHERS, R. W.; KRUIF, C. G.; Texture of acid milk gels: formation of disulfide cross-links during acidification. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 29-38, 2003a.

VASBINDER, A. J.; ROLLEMA, H. S.; BOT, A.; KRUIF, C. G. Gelation mechanism of milk as influenced by temperature and pH; studied by the use of transglutaminase cross-linked casein micelles. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 5, p. 1556-1563, 2003b.

WASTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy science and technology**. 2<sup>nd</sup> ed. Boca Raton: CRC Press, 2006. 782p.

WRÓBLEWSKA, B.; KOLAKOWSKI, P.; PAWLIKOWSKA, K.; TROSZYNSKA, A.; KALISZEWSKA, A. Influence of the addition of transglutaminase on the immunoreactivity of milk proteins and sensory quality of kefir. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 2434-2445, 2009.

XIAO-QING, H.; PFEIFER, J. K.; LINCOURT, R. H.; SCHUERMAN, J. M. **Process for making a cheese product using transglutaminase**. Kraft Food Holdings Inc. Patent number: US 6 572 901 B2. 2003.

YOKOYAMA, K.; NIO, N.; KIKUCHI, Y. Properties and applications of microbial transglutaminase. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v. 64, p. 447-454, 2004.

ZHU, Y.; RINZEMA, A.; TRAMPER, J.; BOL, J. Microbial transglutaminase - a review of its production and application in food processing. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v. 44, p. 277-282, 1995.

ZHU, Y.; RINZEMA, A.; BONARIUS, H. P. J.; TRAMPER, J.; BOL, J. Microbial transglutaminase production by *Streptoverticillium mobaraense*: Analysis of amino acid metabolism using mass balances. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 23, p. 216-226p. 1998.

## ANEXO I

AJINOMOTO

**ACTIVA® MP**

## PRODUCT SPECIFICATION

**Description:** White Powder, Odorless. *AJI TEST\** [Sensorial Analyses].

**Ingredients:** Lactose, Maltodextrin e Transglutaminase.

**Physical-Chemical Characteristics**

Loss on Drying	not more than 2,0 %	<i>Japanese Standards for Food Additive</i> (80 °C, 2 h)
Transglutaminase activity	78 – 126 U/g	<i>AJI TEST*</i> [Hydroxamate Method]
Arsenic as As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	not more than 2 mg/kg	<i>AJI TEST*</i> [Atomic Absorption Spectrophotometry]
Heavy Metals as Pb	not more than 20 mg/kg	<i>AJI TEST*</i> [Sodium Sulfide Colorimetry]

**Microbiological Characteristics**

Total Plate Count (UFC/g)	not more than 3000	<i>Standards Methods of Analysis in Japanese Food Safety Regulation</i> [Standard Agar Medium]
Heat Resistant Bactéria (UFC/g)	not more than 500	<i>Standards Methods of Analysis in Japanese Food Safety Regulation</i> [Standard Agar Medium]
Coliform Bacteria	negative	<i>Standards Methods of Analysis in Japanese Food Safety Regulation</i> [BGLB Medium]

**\*AJI TEST – All methods are available on request to AJINOMOTO.**

All information contained in this specification is subject to change without prior notice.  
Please contact us to confirmation.

**AJINOMOTO BIOLATINA IND. E COM. LTDA**  
**AJINOMOTO INTERAMERICANA IND. E COM. LTDA**

R. Joaquim Távora, 541  
04015-901 – São Paulo –SP  
www.ajinomoto.com.br

Phone: 55 11 5080-6801  
FAX: 55 11 5080-6789  
e-mail: vi\_dom@aia.ajinomoto.com

# AJINOMOTO®

RAPID SPEDITION UND LOGISTIK  
NIEDERLASSUNG HAMBURG  
D-21035 HAMBURG ALLERMÖHE

## Certificate of analysis

Shipment date  
02.01.2008  
Truck/Container  
/ os c 2869  
Delivery item/date  
80038383 000010 / 04.01.2008  
Order item/date  
17515 000050 / 26.12.2007  
Customer number/Customer reference number  
201495 / 113280 - 26.12.2007

Material: Our Reference / Your Reference  
FT7000 ACTIVA MP 1kgx10 / FT7000

Batch 200708231A  
Production date 23.08.2007 / Best before date 20.02.2009

Parameter	Unit	Value	Lower Limit	Upper Limit	Method
Visual aspect	-	Conform		Conform	
Loss on drying	%	0,5		2,0	MOLESD
TG Activity	EU	100	78	126	MOLACTG
Arsenic (As2O3)	mg/kg			2,0	MOLAS
Heavy metals	mg/kg			20	MOLMLT
Total viable count	N/g	10		3000	MOLGMT
Thermophilic bacteria mesophil.	N/g	10		500	MOLSPMES
Coliforms	-	Absent		Absent	MOLCOLI
Salmonella (N/25g)	-	Absent		Absent	MOLSALM

When no result is entered, Ajinomoto Foods Europe assures that the value complies with the agreed specification.  
This certificate is generated by computer.

Nathalie Lejeune  
Quality Manager Ajinomoto Foods Europe

### AJINOMOTO FOODS EUROPE S.A.S.

Société par Actions Simplifiée au capital de 8.131.976 € - N° Siret 572 233 955 01036 - TVA : FR 48 572 233 955 - RCS PARIS 572 233 955

#### Usine et Services Administratifs

48, rue de Nesle - BP42 - 80190 MESNIL-SAINT-NICAISE - FRANCE  
Tél. : 33 (0)3 22 88 50 50 - Fax : 33 (0)3 22 88 84 57

#### Siège social

153, rue de Courcelles - 75517 PARIS Cedex 17 - FRANCE  
Tél. : 33 (0)1 56 33 27 80

## ANEXO II

AJINOMOTO®

## ACTIVA® YG

**Descrição:** pó bege claro, praticamente inodoro. *AJI TEST*\* [Análise Sensorial].

**Ingredientes:** Lactose, Extrato de Levedura, Maltodextrina, Transglutaminase, Óleo de Cártamo.

*Características Físico-Químicas*

Umidade	não maior que 4,0 %	<i>Japanese Standards for Food Additive</i> (105° C, 4 h)
Atividade enzimática	85 – 121 U/g	<i>AJI TEST</i> * [Método Hidroxamato]
Arsênico como As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	não maior que 2 mg/kg	<i>AJI TEST</i> * [Espectrofotometria por Absorção Atômica]
Metais Pesados como Pb	não maior que 20 mg/kg	<i>AJI TEST</i> * [Análise de Comparação Visual através do complexo de Sulfeto de Sódio]

*Características Microbiológicas*

Contagem Total (UFC/g)	não maior que 5000	<i>Standards Methods of Analysis in Japanese Food Safety Regulation</i> [Padrão Ágar]
Termoresistentes (UFC/g)	não maior que 1000	<i>Standards Methods of Analysis in Japanese Food Safety Regulation</i> [Padrão Ágar]
Coliformes Totais	não detectado	<i>Standards Methods of Analysis in Japanese Food Safety Regulation</i> [BGLB]

\* *AJI TEST* – Métodos de análises desenvolvidos pela AJINOMOTO.

As informações contidas estão sujeitas a alterações sem prévia notificação.  
Favor entrar em contato para a confirmação das mesmas.

AJINOMOTO BIOLATINA IND. E COM. LTDA  
AJINOMOTO INTERAMERICANA IND. E COM. LTDA

R. Joaquim Távora, 541  
04015-901 – São Paulo, SP - Brasil  
www.ajinomoto.com.br

Phone: 55 11 5080-6801  
FAX: 55 11 5080-6789  
e-mail: vl\_dom@asia.ajinomoto.com

# AJINOMOTO®

AJINOMOTO FOODS EUROPE SAS - Nestle Branch, 48, rue de Nestle - BP42 -  
MESNIL-SAINT-NICAISE - France

## Certificate of analysis

Shipment date

Truck/Container

Delivery item/date

Order item/date

Customer number/Customer reference number

Material: Our Reference / Your Reference  
FT2000 ACTIVA YG 1kgx10 / 32961

Batch 200809181A / Quantity  
Production date 09/18/2008 / Best before date 03/19/2010

Parameter	Unit	Value	Lower Limit	Upper Limit	Method
Visual aspect	-	Conform		Conform	
Loss on drying	%	2.7			MOLESD
TG Activity	EU	106	85	121	MOLACTG
Arsenic (As2O3)	mg/kg			2.0	MOLAS
Heavy metals	mg/kg			20	MOLMLT
Total viable count	N/g	15		5000	MOLGMT
Thermophilic bacteria mesophil.	N/g	< 10			MOLSPMES
Coliforms	-	Absent		Absent	MOLCOLI
Salmonella (N/25g)	-	Absent		Absent	MOLSALM

When no result is entered, Ajinomoto Foods Europe assures that the value complies with the agreed specification.  
This certificate is generated by computer.

Philippe Carré  
Quality Manager Ajinomoto Foods Europe

Page 1 / 1

**AJINOMOTO FOODS EUROPE S.A.S.**

Société par Actions Simplifiée au capital de 6.131.978 € - N° Siret 572 233 955 00035 - TVA : FR 48 572 233 955 - RCS PARIS 572 233 955

Usine et Services Administratifs  
8, rue de Nestle - BP42 - 80190 MESNIL-SAINT-NICAISE - FRANCE  
él. : 33 (0)3 22 88 50 50 - Fax : 33 (0)3 22 88 84 57

**Siège social**  
153, rue de Courcelles - 75817 PARIS Cedex 17 - FRANCE  
Tél. : 33 (0)1 56 33 27 80

## ANEXO III

## Product Specification

Strictly Confidential



Product Number : 109165  
Short Description : DPA BRA WMP Reg 26% 25kgMBG

Long Description : MULTI-PLY BAGS  
WHOLEMILK POWDER  
EACH 25 KG NET

Testing						
Test Category	Test Parameter	Test Method	Test Units	Pass Min	Pass Max	Test Pass - ICMSP
Chemical	Ash	#9507/G/2hours	% m/m	4.7	5.5	
	pH	#Potentialmetric (pH)	pH	6.3	6.8	
Physical	Bulk Density	#Wire 300 tap (g/ml)	g/ml	0.42	0.70	
(MOP5) Chemical	Fat	IDF 60:1987	% m/m	26	28	
	Moisture	IDF 26:2004	% m/m		3.5	
	Protein - SHF Basis	Calculation	% m/m	24.0		
	Protein (N x 6.38 as Is)	ISO 8968-1/IDF20-1:2001	% m/m	24.5	27.5	
	Titratable Acidity	APHIS 2004 (% m/v)	% m/v		0.15	
(MOP5) Microbiological	Aerobic Plate Count	ISO 4833:2003/IDF 100B:1991	cfu/g		10,000	
	Bacillus Cereus	ISO 7932:2004(G)	cfu/g		500	
	Coag Positive Staphylococci	ISO 5944/IDF 60:2001(G)	/g		10	
	Coliforms	ISO 5941-1:1999/IDF 738:1995	cfu/g		<1	
	Escherichia coli	ISO 11896-1/IDF170-1:2005 (g)	/g	ND	ND	
	Inhibitory Substances	IDF 57:1970	g/ml		ABSENT	
	Listeria	ISO 11290-1:1999/Am 2004/25g	/25g		ABSENT	
	Salmonella	ISO 5944/IDF 60:2001/25g/750g	/750g		ABSENT	
	Yeasts and Moulds	ISO 8911/IDF 64:2004 (cfu/g)	cfu/g		50	
(MOP5) Physical	Foreign Matter	ADM 1680 (32.5g)	/32.5g		ABSENT	
	Impedibility Index	ISO 8156/IDF 129:2005 (ml)	ml		0.5	
	Scorched Particles	ADM 1680 (32.5g)	/32.5g		0	
(MOP5) Sensory	Flavour	Difference From Control	Typ/Atyp	TYPICAL		

### Test Notes


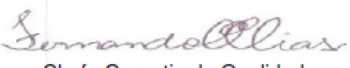
#### Test Notes

Internationally accepted test methods or equivalent are acceptable.

Additional testing may be required to meet importing country regulations.


Assurance provided that acceptable limits of microbiological pathogens and mycotoxins have been achieved during processing and will be kept under control throughout shelf life.

Maximum limits for contaminants (heavy metals) shall comply with the standards established by the Codex Alimentarius Commission.

					
<b>RELATÓRIO DE ANÁLISE FÍSICO QUÍMICA / MICROBIOLÓGICA</b>					
Produto:			Especificação:		Código:
Leite em Pó Integral			109165		413919
Data Fabricação:	Data Validade:	Lote:	SIF:		
19/10/2009	18/10/2010	9292133331	2034		
<b>Qualidade Sensorial</b>		<b>Normas</b>		<b>Resultados</b>	
Sabor		Característico, puro, não oxidado, caramelizado ou rançoso.		Característico	
Densidade		0,42-0,70 g/ml		0,49	
Aparência		Pó fino uniforme, livre de pontos pretos e matérias estranhas.		Característico	
<b>Análises Físico-Químicas</b>		<b>Normas</b>		<b>Resultados</b>	
Umidade		3,5% Máx.		3,03%	
Gordura		26 - 28%		26,90%	
Proteínas		25% Mín.		25,70%	
Acidez		18 ml NaOH 0,1N/10g SNG		16,5	
Material Estranho		ausente /32,5g		Ausência	
pH		6,3 - 6,8		6,7	
Índice de solubilidade		1 mL Máx.		0,5	
Partículas queimadas		Disco "B" 32,5/g Máx.		Ausência	
Antibiótico		Ausência		Ausência	
<b>Microbiologia</b>		<b>Normas</b>			
Contagem total de mesófilos, UFC/g		5.000UFC/g Máx.		<10 UFC/g	
Escherichia Coli		ND/g		ausente/1g	
Coliformes (30°C)		<1NMP/g		<0,3 NMP/g	
Estafilococos coagulase positiva		<10/g		<10 UFC/g	
Salmonella spp.		Ausente/750g		ausente/750g	
Bacillus cereus		500UFC/g Máx.		<100 UFC/g	
Listeria monocytogenes		ausência/25g		ausente/25g	
Mofo e leveduras		50 UFC/g Máx.		<10 UFC/g	
Enterobacteriaceae		10 UFC/g Máx.		<10 UFC/g	
<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: flex-end;"> <div> <p>Data: 27/10/2009</p> </div> <div style="text-align: right;">             Chefe Garantia da Qualidade            Dairy Partners Americas Manufacturing            Ituiutaba - MG         </div> </div> <p style="text-align: center; font-size: small;">Dairy Partners Americas Manufacturing - BR 365 Km 755, Ituiutaba - MG, Brasil Fone: 55 (34) 3268-0800</p>					



## ANEXO IV

<b>TANGARÁ</b> FOODS		<b>CERTIFICADO DE ANÁLISES</b>	
<b>DADOS DO CERTIFICADO</b>			
Ano: 2010		SIF: 4350	
Nome do Estabelecimento: Tangará Importadora e Exportadora S/A			
Endereço: Rodovia Daryl Santos		N.º. 2500	
Bairro: Araçás	Município: Vila Velha	Estado / País: ES/Brasil	Cep: 29103-091
Tel: (27) 2123 9300		Fax: (27) 2123 9301	
<b>DADOS DAS ANÁLISES</b>			
Nome do Produto: SORO DE LEITE EM PÓ		1 Kg	Lote: M46
Marca:	Data de Fabricação	30/06/09	<b>Obs:</b>
<b>MASTER</b>	Data de Validade	30/06/10	
<b>RESULTADOS FÍSICO - QUÍMICOS</b>			
<b>Análise</b>	<b>Resultado</b>		<b>Método</b>
Umidade (%)	1,6		INS 0050
Cinzas (%)	7,27		INS 0044
Acidez (%)	0,06		INS 0040
Gordura (%)	1,0		INS 0045
Proteínas (%)	14,0		INS 0049
Densidade (g/ml)	0,667		INS 0071
Partículas Queimadas	Disco "A"		INS 0068
Índ. de Insolubilidade (ml)	0,1		INS 0059
<b>RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS</b>			
<b>Análise</b>	<b>Resultado</b>		<b>Método</b>
Coliformes (NMP/g)	< 0,3		INS 0037
Coliformes fecais (NMP/g)	< 0,3		INS 0037
Enum. de Mic. Mesófilos (UFC/g)	3,1x10 <sup>3</sup>		INS 0036
Bolores e Leveduras (UFC/g)	< 10		INS 0034
<i>B. cereus</i> (UFC/g)	<1,0x10 <sup>2</sup>		INS 0063
<i>S. aureus</i> (UFC/g)	< 10		INS 0035
<i>Salmonella</i> (em 25g)	Ausente		INS 0061
<b>RESULTADOS MICROSCÓPICOS</b>			
<b>Análise</b>	<b>Resultado</b>		<b>Método</b>
Microscopia	Ausência de sujidades, larvas e parasitos.		INS 0067
<b>RESULTADOS SENSORIAIS</b>			
<b>Análise</b>	<b>Resultado</b>		<b>Método</b>
Aparência	(Característico)		MQL 0001
Sabor	(Característico)		
 <p>Mirella Rossi Vicente CRQ 02301367 Supervisora de Qualidade TANGARÁ IMPORTADORA E EXPORTADORA S/A.</p>			

## ANEXO V

Danisco Cultures  
cultures@danisco.com  
www.danisco.com

Page 1 / 2

**DANISCO**

First you add knowledge...

## PRODUCT DESCRIPTION - PD 205566-0EN

**Material no. 50588**

### YO-MIX™ 495 LYO 100 DCU

YO-MIX™ Yogurt Cultures

#### Description

Freeze-dried concentrated lactic starter for the direct vat inoculation of milk and milk bases.

#### Usage levels

Product	Dose
yogurt	10 - 20 DCU / 100 l of vat milk
Fermented milk	10 - 20 DCU / 100 l of vat milk

The quantities of inoculation indicated should be considered as guidelines. Supplement cultures may be required depending on technology, fat content and product properties desired. We do not accept any liability in case of undue application.

#### Directions for use

Store at temperature < 4 °C in dry atmosphere. When stored at negative temperature, keep the sachet at room temperature for 30 to 60 minutes before opening. If not, the performance of the culture is affected. Prolonged exposure at room temperature will reduce performances. Check before use that the culture is in powder form. Add directly to the manufacturing milk as soon as the agitation blades of the vat are covered with milk. Avoid foam and air introduction in the milk.

Important recommendations:

If the product has formed a solid mass, it should be discarded. To keep bacteriophage contamination under control, ensure plant and equipments are cleaned and disinfected with appropriate products at regular intervals to limit bacteriophage concentration level. Avoid any system that brings back part of end products to the beginning of the processing line in order to limit phage propagation.

We do not accept any liability in case of undue application.

#### Composition

*Streptococcus thermophilus*  
*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

#### Properties

- *Processing benefits:* freeze dried form facilitates the storage and handling of cultures. YO-MIX™ 495 LYO 100 DCU is a blend of selected strains for direct vat inoculation of manufacturing milk, these strains have been carefully chosen and combined to answer your specific needs in term of acidification, texture and taste.

- YO-MIX™ 495 LYO 100 DCU gives quick acidification to pH 4.70 - 4.60 and then, a slower acidification to reach lower pH. This characteristic allows an exceptional pH stabilisation during the end of fermentation processing time and the shelf life. This enables a handling of large tank fermentations, a flexibility in the management of the cooling step, a lower post-acidification.

- YO-MIX™ 495 LYO 100 DCU contains exopolysaccharide producing strains that enable a smooth and thick texture: possibility to perform at 43°C as well as 37°C, formulation cost-saving, reduction of milk protein content, reduction/no need of E. labelling thickening agents, excellent resistance to shear stress at the cooling step and during storage before conditioning, good syneresis control, good performance on recipe with sugar.

- End user benefits: safer end-products, controlled taste and texture consistency, mild flavour and low post-acidification during shelf life, no water release when consumed.

A phage alternative is available on request.

#### Physical/chemical specifications

##### Quantitative/Activity standard

Test medium:

Sterilised reconstituted milk (10% solids)

Heated 20 min at 110 °C. Standardised to pH 6.60

Temperature: 42 °C

Inoculation rate: 20 DCU / 100 l

Delta pH: 1.35

Time to reach the delta pH: <= 3.5 hours

• The information contained in this publication is based on our own research and development work and is to the best of our knowledge reliable. Users should, however, conduct their own tests to determine the suitability of our products for their own specific purposes and the legal status for their intended use of the product. Statements contained herein should not be considered as a warranty of any kind, expressed or implied, and no liability is accepted for the infringement of any patents.

## PRODUCT DESCRIPTION - PD 205566-0EN

Material no. 50588

### YO-MIX™ 495 LYO 100 DCU

YO-MIX™ Yogurt Cultures

#### Microbiological specifications

Microbiological quality control - standard values and methods

Coliforms	< 10 / g [1]
Enterococci	< 20 / g [2]
Yeasts	< 10 / g [3]
Moulds	< 10 / g [3]
Staphylococci coagulase positive	< 10 / g [4]
Listeria monocytogenes	neg. / 25 g [5]
Salmonella	neg. / 25 g [6]

[1] NF V08-015, IDF 73A-1985

[2] Gelose bile esculine sodium azide / 48 h at 37 °C

[3] NF V08-022, IDF 948-1991

[4] NF V08-057, IDF 145A-1997

[5] NF V08-055, IDF 143A-1990

[6] NF V08-052, IDF 938-1995

#### Storage

18 months from date of production at ≤ 4 °C

#### Packaging

Sachets made with three layers of material (polyethylene, aluminium, polyester). The following information is printed on each sachet: product name, pack size, batch n° and shelf life.

#### Quantity

Shipment cartons each containing 50 sachets

#### Purity and legal status

YO-MIX™ 495 LYO 100 DCU meets the specification laid down by the EU legislation.

Label food regulations should always be consulted concerning the status of this product, as legislation regarding its use in food may vary from country to country.

#### Safety and handling

MSDS is available on request.

#### Kosher status

KOSHER O-U-D

#### Allergens

Below table indicates the presence (as added component) of the following allergens and products thereof (according to Directive 2003/89/EC amending Directive 2000/13/EC):

Yes	No	Allergens	Description of components
	X	cereals containing gluten	
	X	crustaceans	
	X	eggs	
	X	fish	
	X	peanuts	
	X	soybeans (GMO-free)	
	X	milk (including lactose)	
	X	nuts	
	X	celery	
	X	mustard	
	X	sesame seeds	
	X	sulphur dioxide and sulphites (> 10 mg/kg)	

#### Additional information

ISO 9001 certified

\* The information contained in this publication is based on our own research and development work and is to the best of our knowledge reliable. Users should, however, conduct their own tests to determine the suitability of our products for their own specific purposes and the legal status for their intended use of the product. Statements contained herein should not be considered as a warranty of any kind, expressed or implied, and no liability is accepted for the infringement of any patents.

## ANEXO VI

Questionário Bebida Láctea FermentadaInstruções:

**Você irá provar e avaliar 2 amostras de bebida láctea.**

**Por favor, prove a primeira amostra e responda suas perguntas. Em seguida, faça o mesmo com a segunda amostra.**

**Por favor, beba água antes de provar cada amostra!**

**Amostra \_\_\_\_\_**

**Amostra \_\_\_\_\_**

O quanto você gostou da bebida, de MANEIRA GERAL?

Gostei muitíssimo

Gostei muitíssimo

Gostei muito

Gostei muito

Gostei moderadamente

Gostei moderadamente

Gostei ligeiramente

Gostei ligeiramente

Nem gostei, nem desgostei

Nem gostei, nem desgostei

Desgostei ligeiramente

Desgostei ligeiramente

Desgostei moderadamente

Desgostei moderadamente

Desgostei muito

Desgostei muito

Desgostei muitíssimo

Desgostei muitíssimo

O quanto você gostou do SABOR desta bebida?

Gostei muitíssimo

Gostei muitíssimo

Gostei muito

Gostei muito

Gostei moderadamente

Gostei moderadamente

Gostei ligeiramente

Gostei ligeiramente

Nem gostei, nem desgostei

Nem gostei, nem desgostei

Desgostei ligeiramente

Desgostei ligeiramente

Desgostei moderadamente

Desgostei moderadamente

Desgostei muito

Desgostei muito

Desgostei muitíssimo

Desgostei muitíssimo

O que você achou da INTENSIDADE DE SABOR desta bebida?

<input type="text" value="5"/> MUITO MAIS FORTE do que eu gosto	<input type="text" value="5"/> MUITO MAIS FORTE do que eu gosto
<input type="text" value="4"/> UM POUCO MAIS FORTE do que eu gosto	<input type="text" value="4"/> UM POUCO MAIS FORTE do que eu gosto
<input type="text" value="3"/> DO JEITO QUE EU GOSTO	<input type="text" value="3"/> DO JEITO QUE EU GOSTO
<input type="text" value="2"/> UM POUCO MAIS FRACO do que eu gosto	<input type="text" value="2"/> UM POUCO MAIS FRACO do que eu gosto
<input type="text" value="1"/> MUITO MAIS FRACO do que eu gosto	<input type="text" value="1"/> MUITO MAIS FRACO do que eu gosto

O que você achou da INTENSIDADE DE ACIDEZ da bebida?

<input type="text" value="5"/> MUITO MAIS ÁCIDO do que eu gosto	<input type="text" value="5"/> MUITO MAIS ÁCIDO do que eu gosto
<input type="text" value="4"/> UM POUCO MAIS ÁCIDO do que eu gos- to	<input type="text" value="4"/> UM POUCO MAIS ÁCIDO do que eu gos- to
<input type="text" value="3"/> DO JEITO que eu gosto	<input type="text" value="3"/> DO JEITO que eu gosto
<input type="text" value="2"/> UM POUCO MENOS ÁCIDO do que eu gosto	<input type="text" value="2"/> UM POUCO MENOS ÁCIDO do que eu gosto
<input type="text" value="1"/> MUITO MENOS ÁCIDO do que eu gosto	<input type="text" value="1"/> MUITO MENOS ÁCIDO do que eu gosto

O que você achou da INTENSIDADE DE CONSISTÊNCIA da bebida?

<input type="text" value="5"/> MUITO MAIS CONSISTENTE do que eu gosto	<input type="text" value="5"/> MUITO MAIS CONSISTENTE do que eu gosto
<input type="text" value="4"/> UM POUCO MAIS CONSISTENTE do que eu gosto	<input type="text" value="4"/> UM POUCO MAIS CONSISTENTE do que eu gosto
<input type="text" value="3"/> DO JEITO que eu gosto	<input type="text" value="3"/> DO JEITO que eu gosto
<input type="text" value="2"/> UM POUCO MENOS CONSISTENTE do que eu gosto	<input type="text" value="2"/> UM POUCO MENOS CONSISTENTE do que eu gosto
<input type="text" value="1"/> MUITO MENOS CONSISTENTE do que eu gosto	<input type="text" value="1"/> MUITO MENOS CONSISTENTE do que eu gosto

O que você achou da CREMOSIDADE da bebida?

<input type="text" value="5"/> MUITO MAIS CREMOSO do que eu gos- to	<input type="text" value="5"/> MUITO MAIS CREMOSO do que eu gos- to
<input type="text" value="4"/> UM POUCO MAIS CREMOSO do que eu gosto	<input type="text" value="4"/> UM POUCO MAIS CREMOSO do que eu gosto
<input type="text" value="3"/> DO JEITO QUE EU GOSTO	<input type="text" value="3"/> DO JEITO QUE EU GOSTO
<input type="text" value="2"/> UM POUCO MENOS CREMOSO do que eu gosto	<input type="text" value="2"/> UM POUCO MENOS CREMOSO do que eu gosto
<input type="text" value="1"/> MUITO MENOS CREMOSO do que eu gosto	<input type="text" value="1"/> MUITO MENOS CREMOSO do que eu gosto

Se esta bebida estivesse disponível para você comprar, você:

<input type="checkbox"/> 5	DEFINITIVAMENTE o compraria	5	DEFINITIVAMENTE o compraria
<input type="checkbox"/> 4	PROVAVELMENTE o compraria	4	PROVAVELMENTE o compraria
<input type="checkbox"/> 3	TALVE SIM, TALVE NÃO compraria	3	TALVE SIM, TALVE NÃO compraria
<input type="checkbox"/> 2	PROVAVELMENTE NÃO compraria	2	PROVAVELMENTE NÃO compraria
<input type="checkbox"/> 1	DEFINITIVAMENTE NÃO compraria	1	DEFINITIVAMENTE NÃO compraria

Qual das amostras você MAIS GOSTOU?

\_\_\_\_\_

Por favor, comente sua preferência, especificando os códigos das amostras.

---

---

---