

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

ANA FLÁVIA ALVES REINALDO

**APLICAÇÃO DE TRANSGLUTAMINASE NA PRODUÇÃO DE BEBIDA
LÁCTEA FERMENTADA COM ALTO TEOR DE SORO**

Patos de Minas
2018

ANA FLÁVIA ALVES REINALDO

**APLICAÇÃO DE TRANSGLUTAMINASE NA PRODUÇÃO DE BEBIDA
LÁCTEA FERMENTADA COM ALTO TEOR DE SORO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Engenharia
de Alimentos da Faculdade de
Engenharia Química da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção
do título de Bacharel em Engenharia
de Alimentos.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Vivian Consuelo
Reolon Schmidt.

Patos de Minas

2018

**APLICAÇÃO DE TRANSGLUTAMINASE NA PRODUÇÃO DE BEBIDA
LÁCTEA FERMENTADA COM ALTO TEOR DE SORO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Engenharia
de Alimentos da Faculdade de
Engenharia Química da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção
do título de Bacharel em Engenharia
de Alimentos, pela banca
examinadora formada por

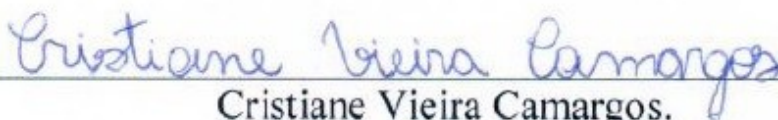
Patos de Minas, 9 de janeiro de 2018.



Prof^ª. Dr^ª. Vivian Vivian Consuelo Reolon Schmidt.



Prof^ª. Dr^ª. Libia Diniz Santos.



Cristiane Vieira Camargos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao Senhor, que sempre guiou minhas escolhas, me deu força e sabedoria e oportunidades para crescer sempre.

Aos meus incríveis, guerreiros e amáveis pais, Rildo e Maria, por todos os ensinamentos, pelo companheirismo, pela dedicação, conselhos, força e além de tudo por sempre acreditarem em mim e nos meus sonhos. Vocês são o motivo de eu querer sempre mais, obrigada pelo exemplo e espero um dia ser tão humana quanto vocês. Aos meus irmãos, Isadora e Phablo, vocês são verdadeiros anjos que Deus colocou em minha vida. Agradeço sempre pelas conversas, pelo apoio, pelas brincadeiras, pelo cuidado e por desejarem a mim o melhor. Espero um dia retribuir tudo o que vocês como família me proporcionaram e merecem.

Agradeço a todos os mestres que tive em minha vida, desde aos que contribuíram para minha formação no ensino fundamental até os incríveis professores que tive a oportunidade de conhecer na graduação. Em especial à dona Luzia, que durante meus primeiros anos na escola foi mais que uma professora, foi uma verdadeira mãe. Ao Danylo de Oliveira, tutor/pai durante alguns bons anos, o senhor é um espelho pra mim, de pessoa e de profissional. À Marta Zotarelli a quem devo muito pelo meu primeiro contato com a pesquisa, que sempre teve muita paciência e me passou muitos ensinamentos. Ao Ricardo Corrêa, a quem eu tenho um enorme carinho, pelo carisma, cuidado, e dedicação em ser simplesmente mestre. E em especial à minha orientadora neste trabalho, Vívian Schimidt, uma excelente professora que enriquece suas aulas com vivências próprias e trabalha sempre em busca de melhorar como profissional, além de ser uma pessoa incrível, que transmite sempre desejar o melhor de quem está próximo a ti, simplesmente muito obrigada pela paciência, pelos conselhos e por ter tido a honra de desenvolver este trabalho.

Agradeço ao grupo Pet por ter feito parte por três anos da minha trajetória acadêmica, onde muito além de executar as tarefas voltadas para tripé de ensino, pesquisa e extensão que o grupo atende, me deu amigos, me fez crescer e amadurecer como pessoa e futura profissional. Amor e gratidão é o sentimento que tenho por este grupo.

A todos que trabalham nos laboratórios, nada seria possível se não contasse com o trabalho e dedicação de todos vocês.

E aos meus amigos, grandes, amigos, em especial à Lara Angélica que se tornou uma irmã, uma pessoa que agradeço por ter comigo, sempre disposta a me ajudar, me ouvir, puxar minha orelha, sem sombra de dúvidas, tudo teria sido mais difícil e sem cor sem você. A

Bruninha, amiga de infância para a vida toda, como foi bom ter você por perto, ter você como exemplo faz bem pra alma, por ser esta pessoa tão gentil, meiga e esforçada, espero ser um pouco como você um dia. A Rafa Akemi, uma menina que sempre foi exemplo de força e determinação, e que sempre torceu por mim de uma forma muito verdadeira e como tal, fez sempre o possível para me ajudar. Ao Igor Evangelista que se tornou um verdadeiro escudeiro nesses últimos tempos, viveu e sofreu comigo os obstáculos desta pesquisa, mas acima de tudo sempre tinha uma palavra de apoio, meu muito obrigada! Ao Murilo pelo companheirismo, cuidado e por sempre tentado me ajudar a enfrentar todas as dificuldades.

Agradeço à minha equipe de revisores particular, Isa e Murilo, que dedicaram um tempo para leitura e comentários mais que pertinentes de partes do texto deste trabalho, vocês são incríveis.

Agradeço à Ajinomoto pela doação da transglutaminase e ao apoio e colaboração de Igor Auad Cano. À Cooperativa Mista de Patos de Minas pela doação do fermento lácteo e agradeço à Alibra Alimentos pela doação do soro de leite em pó.

RESUMO

As bebidas lácteas fermentadas têm tido seu consumo aumentado devido seu custo mais acessível, porém, as características sensoriais destas são afetadas principalmente pelo maior teor de soro. Para manter e acrescentar as propriedades funcionais e sensoriais desejáveis ao produto final faz-se o uso de aditivos, dentre esses, a enzima transglutaminase de origem microbiana (MTG) que atua na formação de ligações cruzadas intra e intermoleculares entre proteínas conferindo maior estabilização da rede de gel. Assim este trabalho teve como objetivo avaliar bebida láctea fermentada acrescida de enzima transglutaminase microbiana variando nas formulações os teores estabilizantes/espessantes, amido de milho modificado, gelatina e goma guar com posterior avaliação físico-química. Foi determinado um total de cinco formulações constituídas por leite e soro de leite em pó reconstituídos na proporção de 1:1, variando amido, gelatina e goma sendo que, tais amostras foram produzidas com e sem adição de MTG. A quantidade de enzima adicionada foi estabelecida sobre o teor proteico apresentado na tabela nutricional do leite e soro de leite em pó. Foi realizado análises de pH, teor de ácido láctico, acidez total titulável, proteínas, sólidos totais e sinérese. Os valores de acidez titulável e o percentual de ácido láctico variaram entre 5,424 a 8,396 e 0,491 a 0,753 respectivamente em análise nos dia 3, 5 e 7 após fabricação. Estes demonstraram que todas as formulações tendem a estabilizar quanto à produção de ácidos e, conseqüente, redução do pH a partir do quinto dia de vida de prateleira. Entretanto o pH demonstrou variação significativa ($p < 0,05$) entre os valores obtidos durante os três dias analisados. O teor de proteínas das formulações foi entre 1,73 e 1,86 gramas em 100 gramas de produto, sendo que o menor teor é observado nas formulações que não continham gelatina. Os percentuais de sólidos não apresentaram diferença entre as formulações com e sem enzima, variando entre 17,629 e 18,706%. Em relação à sinérese, a formulação contendo goma e gelatina (GO/GE) com e sem adição da enzima MTG não apresentou sinérese nos dias de análise, o que demonstra a formação de uma rede de gel com maior capacidade de retenção de água. Em contrapartida as formulações contendo amido foram as que mais apresentaram sinérese devido à retrogradação do amido. De forma geral o percentual de MTG empregado não afetou de forma significativa os resultados obtidos, o que pode demonstrar que em quantidade pequena como empregado (0,006%), esta enzima não possui a capacidade de atuar como apresentado em outros estudos, melhorando características desejáveis como a redução da sinérese.

Palavras-chave: Bebida láctea fermentada, transglutaminase, estabilizantes/espessantes.

ABSTRACT

Fermented dairy drinks have had their consumption increased due to their more affordable cost, however, the sensorial characteristics of these are affected mainly by the higher serum content. In order to maintain and add desirable functional and sensory properties to the final product, additives are used, among them, the transglutaminase enzyme of microbial origin (MTG), which acts in the formation of intra- and intermolecular cross-links between proteins, giving greater stabilization of the network of gel. Thus, the objective of this work was to evaluate fermented dairy beverage plus microbial transglutaminase enzyme, varying the maize starch levels of modified maize, gelatine and guar gum in the formulations with subsequent physical-chemical evaluation. A total of five formulations consisting of reconstituted milk and whey powder reconstituted at a ratio of 1: 1, ranging from friend, gelatin and gum were determined and such samples were produced with and without addition of MTG. The amount of enzyme added was established on the protein content presented in the nutritional table of milk and whey powder. Analyzes of pH, lactic acid content, total titratable acidity, proteins, total solids and syneresis were performed. The values of titratable acidity and the percentage of lactic acid ranged from 5.424 to 8.396 and 0.491 to 0.753 respectively in analysis on day 3, 5 and 7 after manufacture. These have demonstrated that all formulations tend to stabilize as to the production of acids and consequent reduction of pH from the fifth day of shelf life. However, pH showed significant variation ($p < 0.05$) between the values obtained during the three days analyzed. The protein content of the formulations was between 1.73 and 1.86 grams in 100 grams of product, the lowest content being observed in formulations which did not contain gelatin. The percentages of solids showed no difference between the formulations with and without enzyme, varying between 17.629 and 18.706%. Regarding syneresis, the formulation containing gum and gelatin (GO / GE) with and without addition of the MTG enzyme did not show syneresis on the days of analysis, which demonstrates the formation of a gel network with greater water retention capacity. In contrast, the starch-containing formulations were the ones that presented the most syneresis due to retrogradation of the starch. In general, the percentage of MTG used did not significantly affect the results obtained, which may show that in small amount as an employee (0.006%), this enzyme does not have the capacity to act as presented in other studies, improving desirable characteristics such as reduction of syneresis.

Keywords: Fermented dairy drink, transglutaminase, stabilizers / thickeners

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	2
2	BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA	4
	INGREDIENTES	5
	Leite.....	5
	Soro de Leite.....	7
	Amido Modificado	8
	Goma Guar	11
	Gelatina.....	12
	Fermento Lácteo	13
	Outros Ingredientes	15
3	TRANSGLUTAMINASE	16
	AÇÃO DA TRANGLUTAMINASE	17
	PROPRIEDADES DA TRANSGLUTAMINASE DE ORIGEM MICROBIANA	
	18	
	APLICAÇÃO DA MTG EM ALIMENTOS.....	23
	Aplicação da MTG em leites fermentados	26
4	METODOLOGIA.....	30
	PREPARO DA BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA.....	30
	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	33
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
6	CONCLUSÃO.....	43
	REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

O leite é considerado o alimento mais completo em termos nutricionais, sendo utilizado como matéria-prima para diversos produtos, como queijos, bebidas lácteas, leite em pó, manteiga e bebidas lácteas fermentadas (ORDÓÑEZ, 2005).

As bebidas lácteas fermentadas são obtidas por meio da ação de microrganismos que fermentam o meio e este método começou a ser utilizado com o objetivo de prolongar a vida de prateleira do leite. Este produto vem ganhando mercado nos últimos anos por ser um substituinte ao iogurte, constituindo uma alternativa simples e mais barata, porém com similares características sensoriais e nutricionais (RUFINO et al., 2015). Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2013), a produção de bebidas lácteas fermentadas representa 25% do mercado total de leites fermentados e Capitani et al. (2005) apresentam que as bebidas fermentadas com características semelhantes ao iogurte são mais comercializadas.

Dentre os ingredientes obrigatórios na composição de bebidas lácteas fermentadas tem-se o soro de leite, que pode ser utilizado na forma líquida, concentrada ou em pó (BRASIL, 2005). A aplicação de soro na formulação de produtos lácteos tornou-se uma importante forma de reaproveitamento deste subproduto. Segundo Rufino e colaboradores (2015), 50% da produção mundial de soro de leite é descartada como efluente, e a outra metade utilizada diretamente na forma líquida ou transformada em produtos como soro em pó, lactose e concentrados proteicos.

A maior vantagem em utilizar soro de leite na produção de bebidas lácteas fermentadas é econômica. Porém, sensorialmente o aumento da quantidade de soro diminui a viscosidade da bebida, decorrente da diminuição de sólidos. Porém, o aumento da adição de soro em pó desmineralizado, em substituição parcial do leite em pó, diminui a sua consistência (ALMEIDA; BONASSI; ROÇA, 2001). Além disto, a substituição parcial do leite por soro em pó aumenta a sinérese em iogurtes e bebidas lácteas (GONZÁLEZ-MARTÍNEZ et al., 2002).

O uso de aditivos na indústria de alimentos tem o objetivo de acrescentar propriedades funcionais e sensoriais ao produto final, melhorando sua qualidade e apresentação ao consumidor (RUFINO et al., 2015). Nos últimos anos, estudos a respeito da aplicação da enzima transglutaminase (TG, EC 2.3.2.13) em alimentos vêm ganhando destaque. Esta enzima atua na formação de ligações cruzadas intra e intermoleculares entre proteínas através

de ligações covalentes entre resíduos de glutamina e aminas primárias (FARIA, 2010). A formação de ligações cruzadas entre proteínas usando transglutaminase (TG) leva à formação de agregados proteicos irreversíveis sendo, desta forma, adequada para a melhoria das propriedades funcionais de proteínas vegetais e animais, permitindo a formação de produtos com melhores propriedades reológicas e sensoriais (FARIA, 2010).

A transglutaminase (TG) pode ser aplicada em iogurtes, queijos, sobremesas, molhos, queijos processados, sobremesas congeladas e sorvetes (MOTOKI; KUMAZAWA, 2000). No Brasil a TG foi aprovada como coadjuvante de tecnologia (BRASIL, 2005), participando da elaboração e não podendo estar presente no produto final.

Sendo assim, a TG atua na produção de bebidas lácteas fermentadas por ligações cruzadas das proteínas do leite, que podem representar importante alternativa para melhorar a sua textura e propriedades funcionais, reduzindo a fortificação com outros sólidos lácteos (FARIA, 2010).

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar bebida láctea fermentada acrescida de enzima transglutaminase microbiana variando nas formulações os teores de amido de milho modificado, gelatina e goma guar. Como objetivos específicos, posterior avaliação das características físico-químicas da bebida láctea fermentada quanto à acidez titulável, percentual de ácido lácteo, pH, sólidos totais, teor de proteínas e sinérese.

2 BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA

Não há nenhum dado confirmado sobre a origem dos leites fermentados, mas sabe-se que a descoberta dos microrganismos se deu através da acidificação do leite, que era praticada para conservá-lo e para produção de outras bebidas com sabor distinto e agradável (GABIATTI; CORTI, 2010).

Segundo o Regulamento de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea (BRASIL, 2005), bebida láctea é definida como o produto obtido a partir de leite (in natura, pasteurizado, esterilizado, UHT, reconstituído, concentrado, em pó, integral, semidesnatado ou parcialmente desnatado e desnatado) e soro de leite (líquido, concentrado e em pó) adicionado ou não de produto (s) alimentício (s) ou substância (s) alimentícia (s), gordura vegetal, leite (s) fermentado (s), fermentos lácteos selecionados e outros produtos lácteos. A base láctea representa pelo menos 51% massa/ massa (m/m) do total de ingredientes do produto.

No Brasil, a produção de bebidas lácteas é uma das principais opções de aproveitamento do soro de leite, sendo as mais comercializadas são as bebidas fermentadas com características semelhantes ao iogurte (CAPITANI et al., 2005). A produção de bebidas lácteas fermentadas no Brasil em 2007 foi de aproximadamente 53.917 toneladas, e em 2014 cerca de 76.484, um aumento de 42% (DATAMARK, 2016).

A bebida láctea fermentada é o produto lácteo resultante da mistura do leite (in natura, pasteurizado, esterilizado, UHT, reconstituído, concentrado, em pó, integral, semidesnatado, ou parcialmente desnatado e desnatado) e soro de leite (líquido, concentrado e em pó) fermentado mediante ação de microrganismos específicos e/ou adicionado de leite (s) fermentado (s) e que não poderá ser submetido a tratamento térmico após fermentação. A contagem total de bactérias lácticas viáveis deve ser no mínimo de 10^6 UFC/g, no produto final, para o (s) cultivo (s) láctico (s) específico (s) empregado (s), durante todo o prazo de validade (BRASIL, 2005).

O consumo de bebidas lácteas fermentadas vem aumentando sensivelmente no Brasil, provavelmente devido às suas propriedades sensoriais e nutricionais associado à um menor valor (ALMEIDA, BONASSI e ROÇA, 2001). Por se tratar de um produto à base de leite, estes produtos apresentam alto teor de proteínas, cerca de 2,1% (TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS, 2011).

Este produto é caracterizado por apresentar baixa viscosidade e por ter uma relação leite-soro um pouco aleatória e não bem definida (ALMEIDA; BONASSI; ROÇA, 2001). Sendo que as características sensoriais variam de acordo com a formulação. Alguns dos ingredientes que podem empregados na produção de bebidas lácteas fermentadas são apresentados a seguir.

INGREDIENTES

Leite

O leite é um ingrediente obrigatório para produção de bebida láctea fermentada e é definido como sendo o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outras espécies deve denominar-se segundo a espécie do qual proceda. Este produto deve ser mantido sob refrigeração, transportado em carro-tanque isotérmico da propriedade rural para um posto de refrigeração de leite ou estabelecimento industrial adequado, para então ser processado (BRASIL, 2005).

O leite é uma emulsão líquida em que a fase contínua é formada de água e substâncias hidrossolúveis ao passo que a fase descontínua é formada, principalmente, de micelas de caseína e de glóbulos de gordura (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). O leite de vaca, o mais importante do ponto de vista comercial e industrial, é composto de aproximadamente 87,0% de água e 13,0% de sólidos totais distribuídos em 4,9%, de lactose 3,3 a 3,6% de proteínas totais, 3,5 a 3,8% de gordura e 0,7% de minerais (SGARBIERI, 2005).

O sistema proteico do leite é composto por caseínas e proteínas de soro, como apresentado na Tabela 1. As caseínas formam o grupo principal de proteínas do leite, constituindo aproximadamente 80% das proteínas do leite de vaca, com 4 tipos principais: α_1 , α_2 , β e κ -caseína em combinação com fosfato de cálcio coloidal formando agregados chamados de micelas de caseína (TAMINE; ROBINSON, 1999).

Tabela 1: Frações proteicas do leite.

Caseínas	76-88% do total de proteínas
α s1	45-55%
β	25-35%
κ	8-15%
γ	3-7%
Proteínas de soro	15-22% do total de proteínas
Serum albumina	0,7-1,3%
β -lactoglobulina	7-12%
α -lactalbumina	2-5%
Imunoglobulina	1,9-3,3%
Proteose/peptonas	2-6% do total de proteínas

Fonte: Faria, (2010) adaptado de Tamine e Robinson (1999).

As proteínas do leite constituem ingredientes 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 características físico-químicas, que proporcionam propriedades funcionais de grande interesse tecnológico como: solubilidade, absorção e retenção de água e de gordura, capacidade emulsificante e estabilidade de 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).

Sendo assim, o leite é uma importante matéria-prima para a indústria de alimentos sendo comercializado na forma líquida, concentrado ou em pó. O leite em pó é definido segundo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade como o produto obtido por desidratação do leite de vaca integral, desnatado ou parcialmente desnatado e apto para a alimentação humana, mediante processos tecnologicamente adequados (BRASIL, 1997). Sendo estabelecido que o conteúdo de matéria gorda do leite em pó integral deve ser maior ou igual a 26,0% e com umidade máxima de 3,5%, enquanto o leite desnatado apresenta teor de gordura de 1,5 a 25,9% e máximo de 4% de umidade (BRASIL, 1997).

Na produção de bebidas lácteas fermentadas o leite pode ser empregado na sua forma líquida pasteurizado, esterilizado, UHT, concentrado, em pó ou reconstituído, tanto integral, parcialmente desnatado e/ou desnatado. Além disso, apresenta como ingrediente obrigatório o soro de leite, produto antes visto como um resíduo, o qual hoje em dia é empregado como matéria-prima para diversos produtos (BRASIL, 2005).

Soro de Leite

Entende-se por soro de leite o líquido residual obtido a partir da coagulação do leite destinado à fabricação de produtos lácteos. Para este há a distinção entre soro doce, proveniente de coagulação realizada principalmente por ação enzimática, o qual apresenta pH entre 6,0 e 6,8 e o soro ácido, extraído da coagulação por acidificação do leite, possuindo pH inferior a 6. Ambos podem ser encontrados na forma líquida, concentrada ou em pó (BRASIL, 2010).

Na produção de 1 kg de queijo, cerca de 9 kg de soro são gerados restando em torno de 55% dos nutrientes do leite incluindo lactose, proteínas globulares, predominantemente β -lactoglobulina e α -lactoalbumina, minerais e vitaminas solúveis em água e gorduras (ALMEIDA; BONASSI; ROÇA, 2001). Devido a esta alta carga de matéria orgânica, quando despejado em afluentes sem o devido tratamento este composto apresenta-se como um grande agente poluidor, chegando a ser cem vezes mais poluente que o esgoto comum (SILVA, 2011). A Tabela 2 a seguir apresenta a composição média do soro de leite do queijo mussarela, minas padrão e do soro em pó.

Tabela 2 - Composição média do soro de leite líquido do queijo mussarela, minas padrão e do soro em pó.

o/	Soro de queijo mussarela	Soro de queijo minas padrão	Soro em pó
Proteína	0,84	0,8	mín. 10,0
Gordura	0,77	0,68	2,0
Lactose	4,42	4,12	61,0
Cinzas	0,47	0,49	9,5

Fonte: Faria, 2010.

Por isso, o soro de leite tem sido amplamente adicionado na fabricação de produtos alimentícios, tais como pós para bebidas, barras de nutrição, sopas, itens de panificação,

produtos de confeitaria, sobremesas e lácteos (ABIQ, 2014). Isto se deve à sua capacidade gelificante, emulsionante e de retenção de água, além de ser estável ao calor e formar espumas fortes (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

O soro na forma em pó é normalmente empregado na fortificação do leite líquido, prática comum para fabricação de iogurtes e bebidas lácteas fermentadas (TAMIME; BARRANTES; SWORD, 1996). A intenção é aumentar o total de sólidos, resultando em maior densidade da microestrutura da matriz proteica e, por consequência, em um produto mais firme e com menor ocorrência de um fenômeno indesejado denominado sinérese, em que há a separação de líquido da rede de gel (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

Bhullar, Uddin e Shah (2002) relataram que a suplementação com 2% (m/v) de soro de leite em pó aumentou a viscosidade e reduziu a sinérese em formulação de iogurte. O mesmo foi observado por Guzma'n-Gonza'lez et al. (1999) na fortificação de iogurte com soro de leite em pó mantendo as concentrações de proteína total constantes.

A aplicação do soro de leite pode ser líquido, concentrado ou em pó como ingrediente obrigatório na composição de bebidas lácteas fermentadas e apresenta-se como uma forma racional e lógica de aproveitamento deste composto, além de conferir características desejáveis ao produto final (FARIA, 2010). Isto se deve às propriedades desse em conferir textura e sabor, aumentar o valor nutricional, e prolongar a vida útil dos produtos, além de reduzir custos e possibilitar sua aplicação em conjunto ou como substituinte parcial de ingredientes lácteos e de aditivos não lácteos, como amido, gelatina, pectina e gomas (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006)

Amido Modificado

O amido, polissacarídeo complexo de grande importância para a nutrição humana, representando em média 70% à 80% das calorias ingeridas, é um produto de origem vegetal abundante na natureza. Está presente em raízes, sementes e caules de diferentes tipos de plantas, como milho, trigo, arroz, mandioca e batatas, nos quais atua como reserva energética (LAPASIN; PRICL, 1999). O amido consiste em duas classes de polímeros de carboidratos, a amilose que apresenta cadeia linear e a amilopectina que possui ramificações e massa molecular cerca de 102 vezes maior que a amilose (ZOBEL; STEPHEN, 1995).

Os tipos de amido diferem entre si pela fonte de que são extraídos e/ou pela forma de obtenção. As principais diferenças são devido à morfologia granular, ao peso molecular, à composição (grau de ramificação das macromoléculas de polissacarídeos) e às propriedades

físico-químicas. Este carboidrato é insolúvel em água fria e apresenta como vantagens para aplicações, baixo custo, grande disponibilidade e facilidade de armazenamento e manipulação (MALI et al., 2003).

O amido nativo (comum) tem características de fácil e rápida hidratação, rompimento dos grânulos hidratados, causando perda na viscosidade, e produção de pasta com pouco corpo e muita coesão. Estas características podem ser desejáveis ou não de acordo com sua aplicação podendo levar à limitações de uso na indústria (CEREDA, 2002).

Assim, objetivando realçar ou inibir propriedades inerentes dos amidos surgiram técnicas aplicadas para sua modificação. Amidos modificados são definidos como aqueles que passam por tratamento enzimático, físico ou químico com a finalidade de alterar uma ou mais de suas características originais. Desse modo é possível modificar consistência, poder aglutinante e gelificante, melhorar palatabilidade e dispersão em solvente, além de incrementar estabilidade, por exemplo (KEOGH; O'KENNEDY, 1998).

O amido de forma geral, mas principalmente na indústria alimentícia, é utilizado para alterar ou controlar características, como textura, aparência, umidade, consistência e estabilizar emulsões durante vida de prateleira do produto. Dependendo de seu uso este pode ligar ou desintegrar; expandir ou adensar; clarear ou tornar opaco; reter umidade ou inibi-la; produzir textura curta ou fibrosa, lisa ou rugosa; cobertura leve ou crocante (PENNA; OLIVEIRA; TAMINE, 2003).

Uma das propriedades mais importantes do amido é a gelatinização que ocorre quando uma dispersão deste é aquecida provocando a ruptura das estruturas cristalinas do grânulo, o qual absorve água e entumece. Quando gelatinizado o amido fica transparente formando uma pasta que aumenta a viscosidade do meio sendo que a formação do gel ocorre em diferentes intensidades dependendo da concentração e do tipo de amido utilizado (KEOGH; O'KENNEDY, 1998). A temperatura empregada para gelatinização é fator dependente da fonte do amido, como por exemplo, o amido proveniente do arroz apresenta temperatura de formação de gel entre 61 e 77° C, o milho entre 62 e 72°C, a mandioca de 58 a 70° C e a batata entre 66 e 76° C (MALI et al., 2003).

Após a gelatinização, com a redução da temperatura, ocorre um rearranjo das moléculas por ligações de hidrogênio, fator que favorece a recristalização, processo este denominado de retrogradação. Neste fenômeno, a rede de gel de amido formada, devido contração, causa a liberação de moléculas de água anteriormente ligadas às cadeias de amilose provocando sinérese, que por consequência diminui a viscosidade e consistência do produto (LAPASIN; PRICL, 1999).

Em produtos lácteos o amido é amplamente utilizado como espessante e/ou estabilizante assim como a gelatina, pectina, alginato, carragena, derivados de metilcelulose, goma agar, xantana e guar (TAMIME; ROBINSON, 1999). Para tal é essencial que ocorra o aumento de consistência em função do tratamento hidrotérmico (CEREDA, 2002). Portanto é essencial alcançar a temperatura de gelatinização durante o processamento para assegurar os benefícios do amido na textura do produto final (PENNA; OLIVEIRA; TAMINE, 2003).

Em iogurtes e bebidas lácteas têm-se empregado amidos provenientes de diversas fontes (KEOGH; O'KENNEDY, 1998), sendo desejada uma alta viscosidade. Para tal a legislação determina que o teor máximo permitido de aplicação de amidos ou amidos modificados em bebida láctea fermentada com ou sem adição é em proporção máxima de 1% (m/m) do produto final (BRASIL, 2005).

O amido, quando associado a outros hidrocolóides (gomas) pode melhorar características em relação à sinérese e consistência em alguns alimentos (MALI et al., 2003). Munhoz, Weber e Chang (2004) verificaram em estudo da influência de hidrocolóides na textura de gel de amido de milho e concluíram que força do gel foi minimizada com o uso de 0,5-1,0% de goma xantana e 0-0,15% de goma guar incorporadas ao amido com 71% de amilose após 120 horas de armazenamento. Sudhakar e colaboradores (1998), em pesquisa sobre a interação de amido de milho e goma guar verificaram que o hidrocolóide conferiu maior estabilidade aos géis de amido pelo retardo da retrogradação e diminuição da sinérese. Isto quer dizer que, como a força é consequência da retrogradação das cadeias de amilose, os hidrocolóides reduziram este fenômeno que interfere negativamente na qualidade de produtos espessados com amido e que necessitam de refrigeração, como as bebidas lácteas fermentadas.

Andrade e Martins (2002) constataram, em um estudo da aplicação de fécula de batata-doce em bebida láctea fermentada, que 6% do amido na formulação manteve por mais tempo o produto dentro da faixa de viscosidade desejada.

Winterton e Meiklejohn (1978) utilizaram amido modificado de milho como estabilizante para produção de iogurte de fruta. A concentração de 0,03 % (m/m) de amido modificado foi a mais adequada para aplicações comerciais. McGlinchey (1997) comparou iogurtes elaborados com leite desnatado contendo 16,5% de sólidos e 12,5% de sólidos acrescidos de amido modificado. O amido apresentou comportamento eficiente, estabilizando e proporcionando a textura adequada ao iogurte, tanto nos testes quantitativos quanto sensoriais, comparável ao produto controle.

Tamime e Robinson (1999) estudaram o efeito de diferentes substitutos de gordura à base de amido em iogurtes firmes. O decréscimo na sinérese do soro e aumento na firmeza em todos os iogurtes foram observados durante 20 dias de estocagem a 5° C. Sendo que o iogurte elaborado com amido obtido de ervilha apresentou a menor sinérese, enquanto o elaborado com maltodextrina apresentou-se mais poroso e teve espaços ligeiramente maiores preenchidos com soro lácteo.

Assim, pode-se perceber como o amido, associado ou não às gomas, possui papel importante em características reológicas, tais como textura, viscosidade, consistência, aspecto e corpo de derivados lácteos.

Goma Guar

A goma guar, um polissacarídeo, é extraída do endosperma da semente de *Cyamopsis tetragonolobus*. Possui alto peso molecular, e é considerada uma galactomanana devido sua formação molecular composta por cadeia linear de manose (β -1,4) com resíduos de galactose como cadeias laterais, na proporção de uma unidade de galactose para duas de manose. (SILVA, 2011).

A característica mais significativa da goma guar é a sua capacidade de hidratar-se rapidamente conferindo alta viscosidade às soluções. Tal viscosidade é dependente do tempo, temperatura, concentração, pH, força iônica e também do tipo de agitação (GLICKSMAN, 1969). A goma guar promove o retardamento da retrogradação do amido, e é aplicada associada a outras gomas e agentes gelificantes como a gelatina (MUNHOZ; WEBER; CHANG, 2004).

Em geral é usada em aplicações nas quais é necessário espessamento, estabilização, controle reológico e de viscosidade, suspensão e formação de corpo, modificação de textura e consistência e retenção de água. Devido tais características esta é bastante empregada em produtos lácteos, nos quais fornece textura e reduz a sinérese, reagindo com as proteínas do leite a fim de formar uma rede tridimensional, que mantém as partículas em suspensão (SANDERSON, 1981).

As soluções de goma guar apresentam-se estáveis em uma faixa ampla de pH variando entre 3,0 e 10,5. Sendo que a viscosidade final da solução não é afetada pelo pH, porém a taxa de hidratação mostra-se mais rápida entre 8 e 9 e mais lenta acima de 10 e abaixo de 4 (MUNHOZ; WEBER; CHANG, 2004).

Em soluções aquosas apresenta comportamento pseudoplástico, ou seja, reduz a viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento e alcança a viscosidade máxima mais rapidamente quando preparada em temperaturas mais elevadas (40-50° C). A hidratação da goma guar é reduzida na presença de sais dissolvidos e outros agentes ligantes à água, tais como sacarose, além de apresentar ligações mais fortes com solventes polares (SILVA, 2011).

A goma guar interage sinergicamente com outras gomas como a xantana e agar e com a carragena resultando em aumento da viscosidade e da força do gel (SANDERSON, 1981). Em estudo, Silva (2011) na produção de iogurte probiótico variou os teores de coacervado proteico de soro de leite e goma guar entre 0,1% e 1,46% e entre 0% e 0,68%, respectivamente. Neste, concluíram que os percentuais de 0,78 para o coacervado e de 0,68 de goma guar resultaram em um iogurte estável, com viscosidade adequada e viabilidade da cultura probiótica dentro do valor esperado.

Maruyama et al. (2004) em análise da influência das gomas xantana e guar, de carragena e pectina em queijo petit-suisse concluíram, com base nos parâmetros de textura obtidos, que a combinação das gomas xantana, carragena e guar (2,5:2,5:5), totalizando 0,75% (m/m) da formulação, produziu os melhores resultados, contribuindo para a maior estabilidade e firmeza durante todo o armazenamento do produto.

Assim como a goma guar a gelatina é amplamente empregada em formulações de iogurtes e bebidas lácteas, sendo importante conhecer suas características e ação.

Gelatina

A gelatina é amplamente utilizada na indústria alimentícia e farmacêutica, combinada ou não a outros hidrocolóides, como espessante e estabilizante formando géis estáveis em temperaturas abaixo de 40° C. Apresenta como vantagens seu baixo custo e sabor neutro, além de em diferentes concentrações permitir obter uma ampla gama de texturas, desde cremosa a firme, favorecendo diferentes aplicações (FAKHOURI et al, 2007).

Trata-se de um polímero natural obtido pela hidrólise parcial das fibras de colágeno, proteína constituinte de peles, ossos e tecidos conectivos. Sua estrutura é composta por uma mistura de polipeptídios de alta massa molecular, contendo aminoácidos essenciais como a lisina (YANG et al., 2007). A qualidade de uma gelatina é determinada por parâmetros como rigidez do gel, viscosidade e capacidade de intumescência (PARDI et al., 1996). A força do gel é a principal propriedade da gelatina e esta característica determina seu valor de mercado (CHO et al., 2010).

As gelatinas comerciais em virtude da variedade de fontes de colágeno e dos variáveis métodos de produção apresentam diferenças em suas propriedades físicas e químicas. Tais diferenças podem ser tanto na composição e na sequência de aminoácidos nas cadeias polipeptídicas, quanto no ponto isoeletrico e massa molecular (SGARBIERI, 2005). Porém, de forma geral apresentam-se como um produto proteico solúvel em água com temperatura acima de 50° C.

Do ponto de vista estrutural, as gelatinas diferem de outras proteínas, por apresentar uma considerável ausência de ordem interna e uma configuração aleatória das cadeias dos polipeptídeos em solução aquosa, que é consequência do processo de hidrólise empregado para sua obtenção (CHO et al., 2010).

Segundo Fiszman, Lluch e Salvador (1999), produtos lácteos como iogurte e bebidas lácteas fermentadas em que não ocorre a adição de gelatina, o gel formado pelas proteínas do leite coagulado é fraco, apresentando alto grau de sinérese. Sendo assim, esta proteína é normalmente empregada em produtos lácteos fermentados como estabilizante devido a suas características reológicas desejáveis na formação de gel, além de propiciar o aumento da viscosidade, da firmeza e evitar a separação do soro.

Güven (1998) verificou que a gelatina em proporção de 0,5% é capaz de aumentar a consistência de iogurte sem afetar suas propriedades sensoriais como sabor e odor. Já no estudo de Keogh e O’Kennedy (1998) foram utilizadas concentrações variando de 0% a 0,5% de gelatina também em iogurte verificaram redução de sinérese no uso da concentração máxima de 0,5%.

Kumar e Mishra (2004) verificaram o efeito de gelatina, pectina e alginato de sódio separadamente nas proporções de 0,2%, 0,4% e 0,6%, na formulação de iogurte de soja com manga. Sendo que a maior aceitabilidade em relação à aparência, cor, corpo, sabor e de forma geral foi com o teor de 0,4% de gelatina.

A análise de diferentes proporções dos estabilizantes/espessantes amido de milho, carboximetilcelulose, concentrado proteico de soro, gelatina, goma guar e proteína foi realizada na elaboração de bebida láctea fermentada por Costa e colaboradores (2013). O estudo demonstrou que as amostras com adição de 0,5% de gelatina apresentaram ausência de sinérese e viscosidade similar com bebidas lácteas fermentadas comerciais, sendo aceitas pelos consumidores com índice acima de 70% quanto aos atributos de aparência, aroma, sabor e textura.

Além dos componentes de bebidas láteas fermentadas já citados têm-se também o fermento lácteo, extremamente importante por ser o responsável pela conversão dos açúcares em compostos desejáveis e característicos de leites fermentados.

Fermento Lácteo

O cultivo de bactérias lácticas, específicas ou leite fermentado é um ingrediente obrigatório para a produção de bebida láctea fermentada (BRASIL, 2005). Para um bom desenvolvimento do processo de fermentação do leite, as culturas devem ser resistentes à degradação, apresentar um poder acidificante médio, capacidade de desenvolvimento em simbiose e produzirem substâncias responsáveis pela viscosidade, sabor e aroma do produto (CARUSO; OLIVEIRA, 1999).

As cepas das espécies *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* são as mais amplamente empregadas na produção de leites fermentados. Durante a fermentação láctica estas bactérias crescem simbioticamente e decompõem a lactose em glicose e galactose, e posteriormente reduzem o ácido pirúvico, proveniente da glicólise, em ácido láctico. Tal ação influencia profundamente nas características organolépticas do produto final (GURGEL; OLIVEIRA, 1995).

No início da fermentação, a acidez do leite expressa pelo teor de ácido lácteo em graus Dornic está por volta de 20, favorecendo o crescimento do *S. thermophilus*, estimulado por alguns aminoácidos livres, em especial pela valina, produzidos pelo *L. bulgaricus*, o que provoca um aumento de acidez do meio. Nesta fase, o *S. thermophilus* libera ácido fórmico estimulante do desenvolvimento do *L. bulgaricus* (CARUSO; OLIVEIRA, 1999).

Ao se atingir aproximadamente 46° D, o meio torna-se pouco propício ao *S. thermophilus*, favorecendo, assim, um maior e mais rápido desenvolvimento do *L. bulgaricus*, com produção de acetaldeído. Com o aumento de acidez, devido a produção do ácido lácteo o pH aproxima-se de 4,6, ponto isoelétrico da proteína do leite, ocorrendo a desestabilização da micela de caseína e assim a formação de um gel, o coágulo. No final da fermentação, a proporção numérica entre as duas espécies de microrganismos deve ser similar (TAMINE; ROBINSON, 1999).

A ação do fermento lácteo pode ser afetado basicamente por 3 fatores: tempo de incubação (fermentação), percentual de inóculo e temperatura de incubação. Tempos de incubação menores propiciam uma baixa acidez que ocasionará uma maior proporção de

cocos (*Streptococcus thermophilus*), enquanto que longos tempos de incubação geram uma maior acidez e, conseqüentemente, maior número de bacilos (*Lactobacillus bulgaricus*), menos suscetíveis ao baixo pH. Quanto ao teor de inóculo, maior quantidade deste causa um aumento na taxa de produção de ácido lácteo que favorece o crescimento dos bacilos e retarda o crescimento dos cocos. O *L. bulgaricus* apresenta uma temperatura ótima de crescimento acima de 45 °C, superior à temperatura ótima do *S. thermophilus*, parâmetro que portanto pode favorecer o desenvolvimento de um ou de outro (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006). De um modo geral temperaturas entre 40°C e 45°C são ótimas para a produção de iogurtes e bebidas lácteas fermentadas, porém, recomenda-se para alcançar a relação de 1:1 entre as bactérias a fermentação a 42°C (TAMINE; ROBINSON, 1999).

Dentre os compostos formados durante a etapa de fermentação os principais são: o ácido láctico que além de propiciar a formação do gel pelo abaixamento do pH é um componente muito importante pelo sabor conferido, o qual é produzido em igual quantidade pelas duas bactérias; o acetaldeído, principalmente formado pelos bacilos, é um componente essencial do aroma característico do iogurte e bebidas lácteas fermentadas; o diacetil, também importante pelo aroma dado é produzido pelo *S. thermophilus* e em menor grau pelo *L. bulgaricus*; e os polissacarídeos produzidos pelas duas bactérias que têm um papel importante na consistência do produto final (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

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 (BRASIL, 2005).

Também é permitido o emprego de aditivos e coadjuvantes de tecnologia como acidulantes, reguladores de acidez, corantes, aromatizantes, espessantes, estabilizantes, emulsificantes, conservadores e enzimas (BRASIL, 2005).

Quanto ao uso de conservantes o mais empregado em bebidas lácteas é o sorbato de potássio, um potente inibidor de bolores e leveduras, não sendo necessário o uso de conservante contra bactérias devido a formação de ácido láctico durante a fermentação, abaixando o pH, tornando-se um inibidor natural à essas. O sorbato é utilizado em alimentos com pH inferior a 6,5 e de grande valor nutricional, além de não mostrar nenhum sinal de toxicidade aguda, subaguda e crônica (FOOD INGREDIENTS, 2011).

3 TRANSGLUTAMINASE

A transglutaminase (TG) é uma enzima capaz de catalisar reações de acil-transferase introduzindo ligações cruzadas covalentes entre proteínas, peptídeos e várias aminas primárias (NONAKA et al., 1998). Esta enzima foi descrita pela primeira vez em 1959 por Clarke e colaboradores como sendo a responsável por atividade transaminadora no fígado de porquinhos-da-índia. A transglutaminase encontra-se amplamente distribuída na maioria dos tecidos e fluidos corpóreos estando envolvida em funções biológicas como coagulação sanguínea, queratinização epidérmica e cicatrização de ferimentos, por exemplo (FOLK 1980; LORAND; GRAHAM, 2003).

No início de 1980, muitos estudos realizados demonstraram a viabilidade de modificação de proteínas a partir do uso da transglutaminase. Ikura et al. (1982) e Kurth e Rogers (1984) modificaram o comportamento de caseína e globulina de soja utilizando TG advinda do fígado de porquinho-da-índia e de plasma bovino. Tais estudos verificaram a reticulação das proteínas, e a incorporação de aminoácidos em cadeias peptídicas. Yokoyama, Nio e Kikuchi (2004) investigaram a aplicação da TG em proteína de soro de leite, carne bovina, de porco, frango e peixe, em que as melhorias na solubilidade, capacidade de retenção de água e estabilidade térmica dos alimentos em relação às proteínas foram demonstradas.

A partir de então o emprego da TG como modificador de características de alimentos proteicos estava em discussão. Porém, até o fim da década de 1980 a transglutaminase isolada do fígado de cobaias e plasma sanguíneo era a única forma de sua obtenção para comercialização, resultando em baixa atratividade para aplicações industriais devido ao preço extremamente elevado (ZHU et al., 1995; MOTOKI; KUMAZAWA, 2000).

Através da manipulação genética, em 1989, após selecionarem aproximadamente 5000 cepas de microrganismos do solo, Ando e colaboradores isolaram a TG excretada por diferentes microrganismos, tendo destaque a *Streptoverticillium* S-8112, uma variante de *Streptomyces mobaraensis* (MOTOKI; KUMAZAWA 2000).

A transglutaminase de origem microbiana (MTG), ao contrário da transglutaminase obtida do fígado e plasma de animais, não é dependente de íons cálcio para sua ativação. Isto foi de grande relevância para ampliar a aplicação da enzima, principalmente em alimentos, uma vez que a presença de íons cálcio no meio pode levar à precipitação de proteínas como caseína, globulina de soja e miosina (SEGURO et al., 1995). Além disto, a MTG apresenta

como vantagens uma fácil purificação, sem a necessidade de ruptura celular para sua obtenção, e uma especificidade de substrato inferior. Tais características associada à produção em larga escala impulsionaram seu uso industrial, especialmente em alimentos (SEGURO et al., 1995; MOTOKI; KUMAZAWA, 2000; YOKOYAMA; NIO; KIKUCHI, 2004).

AÇÃO DA TRANGLUTAMINASE

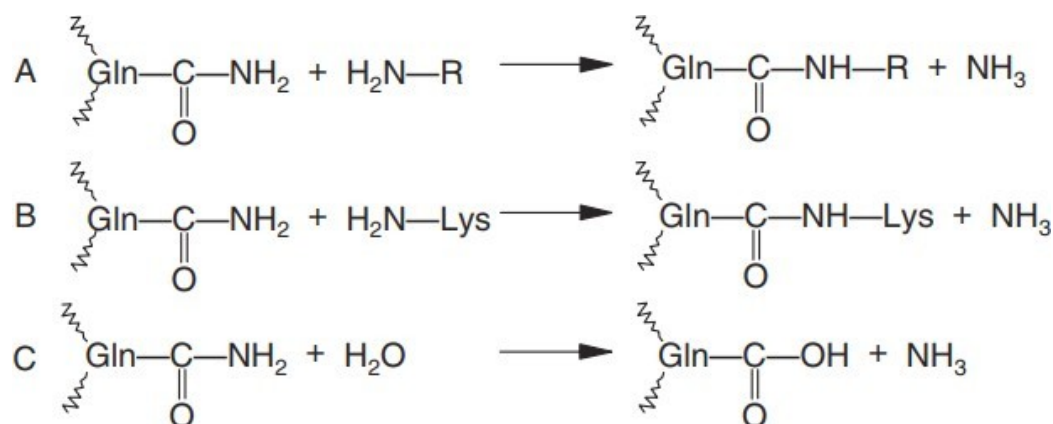
A transglutaminase pode modificar proteínas causando mudanças profundas na estrutura molecular destas por catalisar reações de acil-transferência introduzindo ligações cruzadas intra e intermoleculares entre proteínas, peptídeos e várias aminas primárias ou por desaminação (MOTOKI; KUMAZAWA, 2000; MOTOKI; SEGURO, 1998).

Quando os grupos ϵ -amino de resíduos de lisina em proteínas atuam como acil-receptores, ligações ϵ -(γ -Glu)-Lys inter e intramoleculares são formadas. Estas ligações dão origem a isopeptídeos que formam uma rede proteica estável importante na formação de géis (DUBE et al., 2007), além de produzir mudanças na hidrofobia na superfície da proteína, afetando sua solubilidade e, portanto, outras propriedades funcionais que dependem dessa característica, como gelificação, emulsão, formação de espuma e viscosidade (DAMODARAN, 2010).

Sem as aminas primárias no sistema de reação, água se torna o acil-receptor e os grupos γ -carboxiamida de resíduos de glutamina são desaminados, se tornando resíduos de ácido glutâmico (ANDO et al, 1989; MOTOKI; SEGURO, 1998). Esta reação altera a carga da proteína o que também leva a mudanças na solubilidade proteica (ANDO et al., 1989; DAMODARAN, 2010).

Portanto a enzima pode atuar de três formas distintas em proteínas sendo entre resíduos de glutamina e aminas livres, entre resíduos de glutamina e lisina e entre resíduos de glutamina e água como é demonstrado na Figura 1.

Figura 1 – Reações catalisadas por transglutaminase. (A) Reação de acil-transferência. (B) Reação de reticulação. (C) Desaminação



Fonte: Jaros et al.(2006).

Nas matrizes proteicas, as ligações covalentes cruzadas entre glutamina e lisina são mais rapidamente formadas pela ação da TG. Isto resulta em polímeros de alto peso molecular que é a característica mais explorada pela indústria de alimentos (KURAISHI et al., 2001; LORENZEN, 2007).

De forma geral, as reações promovidas pela enzima criam mudanças profundas nas proteínas melhorando textura e estabilidade em termos de temperatura, sinérese, propriedades emulsionantes, gelificação e aumento da capacidade de ligação à água sem alterar o pH, cor, sabor ou qualidade nutricional dos alimentos (ANDO et al., 1989; KURAISHI et al., 2001).

Portanto a transglutaminase tem sido empregada para modificar a funcionalidade de várias proteínas, incluindo as de soja, miosina, glúten, globulina, caseína e proteínas do soro (TRUONG et al, 2004), obtendo-se resultados promissores nos últimos anos. Como o uso industrial é de transglutaminase de origem microbiana (MTG), iremos nos atentar a esta.

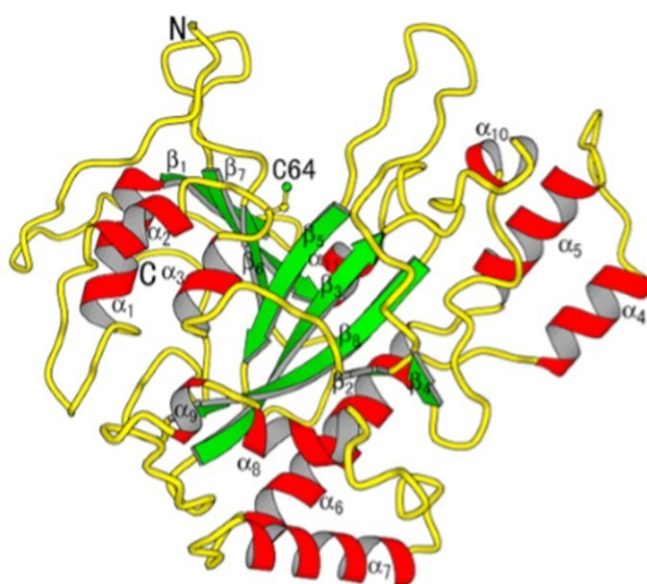
PROPRIEDADES DA TRANSGLUTAMINASE DE ORIGEM MICROBIANA

A transglutaminase de origem microbiana apresenta-se totalmente independente de íons de cálcio (Ca^{+2}), possui peso molecular de aproximadamente 38 kDa e ponto isoelétrico, pH no qual a carga líquida da proteína é zero, de 9,0. (YOKOYAMA; NIO; KIKUCHI, 2004; ANDO et al., 1989).

A MTG é uma enzima monomérica formada por uma única cadeia de polipeptídeo com 331 aminoácidos (ANDO et al., 1989) na qual contêm 2 sítios potenciais de glicosilação, processo enzimático que une moléculas orgânicas (YOKOYAMA; NIO; KIKUCHI, 2004).

Esta enzima faz parte da família das tiolproteases, pois contém um único resíduo de cisteína com um grupo tiol livre que é essencial para sua atividade catalítica. 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 2 mostra a estrutura da MTG.

Figura 2 – Conformação tridimensional da MTG.



Fonte: Motoki e Seguro (1998).

Os íons de cobre (Cu^{+2}), zinco (Zn^{+2}), chumbo (Pb^{+2}) e lítio (Li^{+}) apresentam forte efeito inibidor sobre a ação da MTG (YOKOYAMA; NIO; KIKUCHI, 2004). Ela também é inibida por substâncias orgânicas específicas indicando que há um grupo tiol participando da reação (ANDO et al., 1989).

A MTG é estável em uma larga faixa de pH apresentando atividade entre 4 e 9, porém o pH ótimo para a atividade da enzima está entre 5 e 8 (ANDO et al., 1989). A temperatura em que a enzima demonstra atividade completa está no intervalo entre 40 e 50 °C a pH 6,0, sendo que perde a atividade dentro de alguns minutos a 70 °C (JAROS et al., 2006; YOKOYAMA; NIO; KIKUCHI, 2004).

A maioria dos alimentos que contém proteínas, como globulinas, glúten, albuminas, miosinas, fibrinas, caseína, α -lactalbumina e β -lactoglobulina são bons substratos para a ação da enzima na formação de ligações cruzadas (YOKOYAMA; NIO; KIKUCHI, 2004). Tendo

destaque proteínas que contêm estrutura aleatória como a caseína e a gelatina, assim como as com muitos resíduos de lisina e glutamina, como as proteínas de soja e de trigo (ANDO et al., 1989).

A transglutaminase de origem microbiana foi reconhecida pela comunidade científica como uma substância segura para ingestão humana, e como GRAS (Geralmente Reconhecida como Seguro) pelo FDA (Food and Drugs Administration). Sendo que a legislação brasileira permite o uso de transglutaminase microbiana em alimentos em quantidades suficientes para alcançar o efeito desejado, não havendo especificações para o limite máximo permitido (ANVISA, 2010).

As reações catalisadas pela transglutaminase de origem microbiana causam mudanças significativas nas propriedades físicas dos alimentos que contêm proteínas, aumentando o valor comercial destes. As principais propriedades que a MTG interfere são quanto à capacidade de gelificação, viscosidade, formação de espumas e emulsões e capacidade de retenção de água (KURAISHI; SAKAMOTO; SOEDA, 1996).

Segundo Damodaran (2010), o gel é definido como uma fase intermediária entre estados sólidos e líquidos, formado por ligações covalentes ou não covalentes de polímeros reticulados, de forma que uma rede que pode reter água ou outras moléculas de baixo peso molecular é obtida. Esta é uma propriedade funcional importante no emprego de proteínas na indústria de alimentos, podendo-se citar como exemplos iogurtes, queijos, tofu, surimi e gelatina que apresentam tal característica (HAN et al., 2009).

Sabe-se que géis fracos são formados em meios com pH extremo, enquanto que géis estáveis geralmente são obtidos no ponto isoelétrico da proteína. Estudos demonstraram que o uso da MTG permite que géis altamente elásticos e irreversíveis sejam obtidos em diferentes substratos, mesmo em concentrações de proteína relativamente baixas (DAMODARAN, 2010; MOTOKI; KUMAZAWA, 2000).

Herrero et al. (2008) em pesquisa sobre proteínas de carne, descobriram que as ligações cruzadas introduzidas pela MTG alteraram drasticamente a estrutura da cadeia de miosina, permitindo a formação de polímeros de alto peso molecular. Estas modificações resultaram em géis fortes com uma conformação estrutural compacta e ordenada melhorando a textura, rigidez, elasticidade, coesão e adesividade.

A formação de gel é uma das principais propriedades funcionais dos iogurtes e bebidas lácteas fermentadas. A influência sobre a inibição de sinérese, com a formação de um gel forte e estável com melhora na capacidade de retenção de água devido às ligações cruzadas promovidas pela ação da transglutaminase, já foi relatada em diversos estudos (BÖNISCH et

al., 2007; MOTOKI; KUMAZAWA, 2000; MOTOKI; SEGURO, 1998; YOKOYAMA et al., 2004).

Faria (2010) observou a produção de um coágulo firme e sem liberação de líquido, com viscosidade e consistência adequada ao avaliar bebida láctea fermentada com e sem o uso de MTG. No entanto, já foi confirmado que aplicação de quantidades excessivas da enzima levam ao efeito contrário com formação de um gel mais fraco devido à inibição de desenvolvimento de uma rede proteica uniforme pelo excesso de ligações cruzadas formadas (GUO, 2003).

A solubilidade das proteínas é ditada pela hidrofiliabilidade e hidrofobicidade da superfície da molécula em contato com água, sendo que esta característica afeta a propriedade de emulsificação, gelificação e formação de espuma (DAMODARAN, 2010). A desaminação promovida pela ação da MTG pode aumentar a solubilidade de proteínas devido à diminuição do ponto isoeletrico, o que aumenta a solubilidade proteica na maioria dos sistemas alimentares ligeiramente ácidos (BABIKER, 2000). Isto foi relatado por Xiong et al. (2012) em estudo que demonstrou ter ocorrido o aumento da solubilidade da proteína miofibrilar de porco tratada com MTG em diferentes condições de pH. Esses pesquisadores descobriram que o aumento da solubilidade da miosina em pH abaixo do seu ponto isoeletrico (pH de cerca de 5,0), ocorreu porque a dissociação do grupo c-carboxilo do resíduo de ácido glutâmico (Glu-COOH) são superiores em pH 4,0 e que os resíduos de glutamina ionizados neutralizam as aminas protonadas internamente aumentando a interação água-proteína.

Em avaliação das propriedades funcionais dos isolados de proteína de ervilhas e feijões tratados com MTG, Ali et al. (2010) observaram solubilidade proteica aumentada, sugerindo que esses substratos contêm sítios reconhecíveis pela enzima. Sendo a polimerização das promovida pela MTG, responsável por um aumento na carga líquida negativa da proteína, o que favorece a dissociação de agregados presentes na proteína, aumentando assim a solubilidade.

Em emulsões e espumas, as proteínas são os principais agentes tenso-ativos que auxiliam na formação e estabilização da fase dispersa (DAMODARAN, 2010). As emulsões consistem em dispersões de um líquido em outro líquido e podem ser de água em óleo (W / O) ou óleo em água (O / W), sendo este último caso o mais comum para a maioria das dispersões comestíveis, como maionese, leite, cremes e sopas. Já merengue, mousses, marshmallows e bolos são exemplos de alimentos em espuma que compreendem uma fase aquosa e uma dispersão gasosa, isto é, uma dispersão ar-água (A / W) (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

Babiker (2000) observou um aumento na capacidade de emulsão ao avaliar os efeitos da MTG sobre a emulsão e propriedades de formação de espuma das proteínas da soja. A explicação dada é de que provavelmente a desaminação promovida pela enzima leve ao aumento da natureza anfifílica da proteína. Esta alteração associada à formação e manutenção de gotículas menores na interface água / óleo, também promovida pela ação da enzima, reduz a tensão superficial e permite aumentar a capacidade de ligação com a água, proporcionando maior capacidade emulsionante à proteína (AGYARE; ADDO; XIONG, 2009; BABIKER, 2000).

Em relação à estabilidade de emulsão, Agyare, Addo e Xiong, (2009), avaliaram a ação da MTG em glúten, e Hong e Xiong (2012), em proteína micofibrilar de porco. Ambos observaram que os peptídeos de alto peso molecular formados após catalise de ligações cruzadas pela ação da enzima são adsorvidos na superfície das gotas de óleo e promovem uma repulsão eletrostática, evitando a aproximação dessas gotículas, e assim, sua floculação, coalescência e separação de fases. Por consequência têm-se o aumento da estabilidade da emulsão.

Agyare et al. (2009) também avaliaram as propriedades espumantes do glúten e descobriram que a adição de MTG aumentou a formação de espuma em pH 4,0. Os autores concluíram que isto era devido à rápida adsorção de peptídeos na interface ar-água no seu ponto isoelétrico, o que causa uma rápida redução da tensão superficial e aumenta a interação proteína-proteína, melhorando a capacidade de formação de espuma, bem como a sua estabilização. O aumento da adsorção de proteínas na superfície é devido à desaminação que causa uma queda no pH e aumento dos grupos polares que facilitam o desdobramento das proteínas na superfície da água (RENZETTI; BELLO; ARENDT, 2008).

A capacidade de retenção de água nada mais é do que a capacidade da proteína de absorver a água e mantê-la dentro de uma matriz proteica. Esta característica está associada à propriedades desejáveis em alguns produtos como suculência e ternura de carnes, e textura, coesão, mastigabilidade em panificados e géis (HAN et al., 2009).

No que diz respeito à capacidade de retenção de água em emulsões e espumas, Renzetti, Bello e Arendt (2008) relataram um aumento nesta característica em pães de farinha de arroz integral adicionado de MTG. Os autores atribuíram isto à desaminação de resíduos de glutamina, que provoca o aumento da hidrofiliidade da proteína.

Quanto à viscosidade, sabe-se que a maior concentração, forma, tamanho e densidade das moléculas em um solução, propicia uma maior interação dessas, com redução dos espaços

entre elas, resultando em menor mobilidade da água, e, portanto, maior viscosidade (HAN et al., 2009). Este é um atributo muito desejado em alguns alimentos como iogurtes e sorvetes.

Em uma avaliação da adição da enzima transglutaminase em bebida láctea com alto teor de soro, Faria (2010) verificou o aumento da viscosidade com maior teor de enzima empregado. A maior resistência ao fluxo e consistência pode ser explicada devido a reação de polimerização resultar na formação de polímeros de alto peso molecular, o que pode reduzir a mobilidade da água na rede proteica.

É perceptível a vasta aplicação da MTG em alimentos, possibilitando alterações desejáveis e que devem ser melhor estudadas para se estabelecer parâmetros para a indústria.

APLICAÇÃO DA MTG EM ALIMENTOS

A aplicação da transglutaminase de origem microbiana teve um grande crescimento nos últimos anos, devido melhoras alcançadas nos mais diversos produtos com teor proteico mesmo que em menor quantidade, associada à simplicidade do tratamento ao empregar esta enzima (NGEMAKWE et al., 2015).

No processamento de carne, é de grande interesse maximizar o rendimento dos produtos comercializados. Isso inclui o desenvolvimento de métodos para reestruturar cortes de baixo valor e aparas, com o objetivo de melhorar aparência, sabor e textura e por consequência agregar valor ao produto (FARNSWORTH et al., 2005).

A reestruturação de carnes consiste em unir aparas, comumente destinadas à produção de embutidos, processo ao qual a transglutaminase tem-se apresentado eficiente devido a ação de reticulação promovida. Para isto a técnica normalmente empregada consiste na embutidura da mistura em envoltórios ou moldes, permanecendo em repouso sob refrigeração por cerca de 4 horas. Durante este período a MTG irá formar ligações cruzadas entre resíduos de lisina e glutamina presentes nas moléculas de proteína. Estas ligações são covalentes e estáveis obtendo-se uma rede proteica mais forte, atribuindo ao produto final firmeza e elasticidade, o que contribui para redução de perdas no fatiamento, de produtos como presunto, apresuntado e mortadelas (FARNSWORTH et al., 2005).

Além disso, o emprego da MTG em cárneos permite uma melhor padronização, textura e aumento na capacidade de retenção de água, característica determinante na suculência. A enzima tem sido utilizada em carnes bovina, suína, aves, pescados, frutos do mar, dentre outras (ROMEIH; WALKER, 2017).

Camargo (1999) relatou que níveis crescentes de MTG, até 1,5%, apresentaram eficiência na reestruturação de aparas de carne de peru, apresentando melhor textura, com consequente redução da resistência ao corte e maior suculência nos tratamentos onde houve compressão da massa cárnea durante a ativação enzimática.

Muguruma e colaboradores (2003) avaliaram a funcionalidade de MTG e os seus efeitos sobre as propriedades de gelificação em salsichas de frango com um nível baixo de fosfato, e observaram que a textura foi melhorada pela formação de uma estrutura de rede.

Ferreira et al. (2012) comparando as características físico-químicas e sensoriais de hambúrguer bovino elaborado com cloreto de sódio, polifosfato e MTG, reconheceram a vantagem em se utilizar a enzima em detrimento dos outros aditivos comumente empregados para unir os pedaços cárneos, cloreto de sódio e polifosfatos. A enzima foi capaz de promover a junção dos pedaços de carne, aumentando o rendimento e mantendo a suculência, mostrando ser uma alternativa para a obtenção de reestruturados crus sobre refrigeração e resultando em produtos saudáveis, com menores teores de sais.

Na panificação as características das proteínas são um dos principais parâmetros que afetam a qualidade da farinha e consequentemente a qualidade do produto final (MacRITCHIE, 1987). Assim, modificações nas proteínas para atingirem as propriedades reológicas necessárias são formas utilizadas não apenas para melhorar características como promover o uso de farinhas não comumente empregadas em panificações.

Os primeiros pesquisadores que utilizaram a MTG em produtos derivados de trigo foram Gerrard e colaboradores em 1998. Estes sugeriram que a enzima poderia produzir efeitos benéficos durante a fabricação de pães comparáveis àqueles produzidos pelos melhoradores oxidantes tradicionais. Como resultado eles obtiveram melhora acentuada na força do miolo, redução do trabalho mecânico aplicado à massa e aumento da absorção de água (BÖNISCH et al., 2007).

Collar e Bollaín (2004) estudaram o impacto da transglutaminase microbiana sobre o perfil viscoelástico de massas de pão formuladas em combinação com hidroxipropil-metilcelulose (HMC) e uma pectina com alto conteúdo de éster. Pelo método de superfície de resposta os autores encontraram massas altamente coesas com um aumento da capacidade de retenção de água e força do glúten durante a mistura, fermentação e no assamento de formulações que continham a enzima e pectina. Os autores citados reportaram efeitos benéficos da adição de MTG nas propriedades de textura da massa em que a adição de 0,422% (base farinha) da enzima resultou no aumento da coesividade e elasticidade devido ao aumento de ligações entre proteínas.

Köksel et al. (2001) investigaram a possibilidade do uso da MTG na reparação da estrutura das proteínas do glúten hidrolisadas pelas proteases existentes em insetos que atacam o grão de trigo. Eles primeiramente compararam os efeitos nas propriedades reológicas fundamentais, como extensibilidade e elasticidade de massas preparadas com farinha de trigo saudável com àquelas preparadas com farinha de trigo danificado por insetos. Verificaram que estas sofreram rápida deterioração nas suas propriedades e produziram pães de baixa qualidade. Com a adição da MTG nesta formulação os pesquisadores relataram que a enzima reconstrói substancialmente a estrutura da massa hidrolisada.

Outros produtos alternativos, como os similares aos lácticos feitos à base de soja (queijos e iogurtes de soja) também são um grande campo de atuação para a transglutaminase. As proteínas da soja, como as globulinas, são bons substratos para a reação MTG (FARNSWORTH et al., 2005).

Tofu, um típico produto de coalho de soja, é preparado pela coagulação das proteínas da soja com a adição de íons de cálcio e de magnésio e/ou glucona-delta lactona. Um dos principais obstáculos na produção de tofu está na dificuldade de lhe conferir maior vida de prateleira, devido fácil perda de sua textura macia. No entanto, foi relatado que a adição de MTG permite que a textura original do tofu seja mantida por mais tempo (FARNSWORTH et al., 2005).

A aplicação de MTG foi testada também em macarrões instantâneos e outras massas, e tem sido efetiva na preservação da textura da massa pós cozimento, mesmo quando a farinha de trigo usada era de qualidade inferior (NGEMAKWE et al., 2015).

Além disso, foi desenvolvido por Noguchi et al. (2012) um método para reduzir o potencial alergênico de algumas proteínas de alimentos ou de peptídeos tratadas com MTG. A desaminação de caseína através de um tratamento com a enzima a 25 °C por 20h em água possibilitou produção de caseína com ligações cruzadas e conseqüentemente maior peso molecular, que é menos alergênica.

Na fabricação de produtos lácteos, a enzima é capaz de formar géis de caseína firmes e resistentes à temperatura, com boa retenção de água, o que é atrativo para produção de iogurtes e bebidas lácteas fermentadas. Em sorvetes e queijos a aplicação da transglutaminase microbiana possibilita a redução do teor de gorduras ou sólidos não gordurosos (YOKOYAMA; NIO; KIKUCHI, 2004).

Rodrigues et al. (2014) no estudo de aplicação de transglutaminase microbiana na produção de queijo minas frescal obtiveram que a adição da enzima transglutaminase na

concentração de 0,06% (1,89 UI.g⁻¹) aumentou o rendimento do queijo em, aproximadamente, 6,5% com relação ao produzido pelo processo tradicional.

Em sorvetes, a aplicação da enzima transglutaminase permite a obtenção de um produto com baixas calorias, sem açúcar, com textura mais macia, mais suave e de fácil manipulação (MOTOKI; SEGURO, 1998; KURAISHI; YAMAZAKI; SUSA, 2001). Quando formulações de sorvete são tratadas com transglutaminase antes da pasteurização da mistura e do congelamento subsequente, o perfil de derretimento do sorvete é variavelmente afetado, dependendo do tempo de incubação e da concentração enzimática (LORENZEN, 2002).

Gauche e colaboradores (2009) em estudos de polimerização das proteínas do leite por transglutaminase e avaliação de modificação das propriedades funcionais e aplicação em produtos lácteos determinaram que o nível de oligomerização das moléculas de caseína no processamento de iogurte após a adição de transglutaminase é de 10,9% no produto preparado da forma tradicional e de 25,8% com o tratamento enzimático (3 U/g). Segundo os autores, o efeito da incubação da transglutaminase, simultaneamente ao processo de fermentação reflete em aumento da viscosidade e redução da sinérese.

A área mais avançada no processamento de derivados lácteos usando transglutaminase é na fabricação de iogurtes, com um aumento em estudos também para bebidas lácteas fermentadas (LORENZEN, 2002). Sendo assim é importante conhecer melhor a forma de atuação da enzima sobre estes produtos.

Aplicação da MTG em leites fermentados

Em linhas gerais, proteínas lácteas tem se mostrado bons substratos para as reações catalisadas pela transglutaminase (BÖNISCH et al., 2007). As caseínas, principais proteínas do leite, são um excelente substrato para transglutaminase microbiana em produtos lácteos. Isso é atribuído ao baixo grau de estrutura terciária, flexibilidade e ausência de quaisquer ligações de dissulfureto nas caseínas, permitindo que os grupos reativos fiquem expostos à MTG.

No entanto, as proteínas do soro em sua estrutura globular nativa são, em comparação, menos propensas à reação de reticulação, principalmente devido à estabilização da conformação globular por ligações com dissulfuretos limitando a susceptibilidade dos sítios ativos e requerendo modificações em sua estrutura antes da ação enzimática (FAERGEMAND et al., 1999).

A modificação pode ser realizada por desnaturação por calor, com o uso de agentes redutores, aumento do valor do pH ou pela aplicação de pressão hidrostática. Tais reações podem induzir à desnaturação das proteínas de soro de leite e/ou clivagem dos laços de dissulfureto levando ao desdobramento das proteínas de soro do leite e exposição de potenciais sítios para ação da MTG conforme relatado por Jaros et al. (2006).

Além disso, a MTG apresenta baixa reatividade em leite não aquecido ou pasteurizado, o que é atribuído à presença de um inibidor indígena da enzima no leite, sendo este sensível ao calor. Portanto, um tratamento térmico aplicado principalmente antes da reticulação, é de extrema importância para efetiva ação da MTG (BÖNISCH et al., 2007). Outra opção para solucionar a baixa reatividade da enzima no leite não aquecido ou pasteurizado pode ser pela adição de glutathione (GSH), um agente redutor de qualidade alimentar que previne a inibição da transglutaminase (FAERGEMAND et al., 1999).

Romeih e Hamad (2010) investigaram a susceptibilidade das frações de proteína de soro de leite à reticulação pela MTG e concluíram que a β -lactoglobulina era mais suscetível e com maior taxa de reticulação do que α -lactalbumina. Entre as caseínas do leite, Sharma et al. (2001) verificaram que a k-caseína é mais suscetível à MTG em um sistema de leite cru estando a β -caseína como a segunda mais reticulada. Já no leite reconstituído a partir de leite em pó integral, incubado com MTG a 25 °C durante 2 horas, Kuraishi, Yamazaki e Susa (2001) mostraram que principalmente β -caseína foi reticulada.

No entanto, a susceptibilidade de caseínas individuais à ação da transglutaminase tem sido relacionada aos seus respectivos locais na micela (HINZ; HUPPERTZ; KELLY, 2012). Na superfície da micela de caseína tem-se que as k-caseínas são predominantes, enquanto as β -caseínas e α -caseínas estão localizadas principalmente no núcleo micelar. Ressaltando que a estrutura da micela da caseína é muito dinâmica e é afetada por um grande número de parâmetros como pH, temperatura e equilíbrio mineral no sistema (DALGLEISH, 2011). Isso, por sua vez, pode influenciar a acessibilidade da MTG ao substrato.

A transglutaminase pode ser empregada de duas maneiras diferentes na produção de leites fermentados, antes da fermentação ou simultaneamente a esta etapa (LORENZEN, 2007).

De acordo com Farnsworth et al. (2001), a reticulação proteica do leite com transglutaminase antes da fermentação requer tempo de processo maior, bem como um passo de inativação térmica, mas tem a vantagem de um pH constante durante a reação enzimática. Lorenzen (2007) atribuíram a necessidade de tempo de fermentação maior devido redução na

disponibilidade de peptídeos de baixa massa molecular para o crescimento das bactérias lácticas.

E quando ocorre a ação da transglutaminase simultaneamente com a fermentação, a enzima é gradualmente inativada devido redução do pH saindo da faixa ótima para ação da enzima, não sendo portanto necessário nenhum tratamento térmico (LORENZEN 2007).

A textura dos leites fermentados, em especial de bebidas lácteas fermentadas e iogurtes, são altamente dependentes da funcionalidade dos componentes individuais, das interações entre os componentes e também das etapas do processo de produção. Estudos apresentam benefícios promissores para produtos lácteos fermentados, como: aumento da força do gel, redução da sinérese, aumento da viscosidade e cremosidade (JAROS et al., 2006) pela ação da transglutaminase de origem microbiana.

Faergemand et al. (1999) ao tratarem iogurtes firmes com MTG concluíram que o gel formado era cerca de 15 vezes mais forte quando comparados com aqueles sem tratamento e que este gradual aumento de força estava relacionado ao emprego de maior teor de enzima.

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 formados. A permeabilidade de bebida láctea fermentada foi medida e diminuiu significativamente com o aumento do teor de transglutaminase e, conseqüentemente, o produto apresentou menos sinérese quando comparado ao produto sem tratamento enzimático em estudo realizado por JAROS et al., 2006.

Bönisch et al., (2007) produziram iogurtes batidos adicionando a MTG junto com a cultura láctea para avaliar os efeitos durante a armazenagem. 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 armazenamento, mas não houve aumento no grau de polimerização das amostras, e a possível explicação seria um efeito secundário do tratamento com MTG ocasionando uma aglomeração das proteínas de interações não covalentes.

Lorenzen (2007) mediram o grau de polimerização de iogurtes tratados com MTG (0,6 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.

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 avaliaram as amostras quanto a fluidez, textura e sinérese. 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 a enzima apresentou o mesmo nível de sinérese e consistência do iogurte com 100% leite sem MTG, sugerindo que em relação à sinérese é possível produzir um iogurte similar tratado com a enzima com 20% de soro.

Moreira (2017) estudaram o efeito da adição de transglutaminase e gelatina na viscosidade de bebidas lácteas fermentadas fabricadas com soro de queijo. Estes autores observaram que a aplicação da MTG e gelatina aumentaram a viscosidade do produto final e que os tratamentos utilizando estes aditivos em conjunto ou separados não apresentaram diferença nas condições testadas.

De Paula et al. (2000) estudaram a aplicação da enzima transglutaminase em iogurtes naturais batidos, os resultados mostraram que a adição de 0,04% de MTG apresentou melhores resultados para viscosidade, firmeza e sinérese do que o iogurte fortificado com 2% de leite em pó desnatado.

Assim como relatado para diferentes formulações de iogurtes espera-se que resultados de melhorias em características sensoriais de bebidas lácteas fermentadas sejam alcançados com o uso da transglutaminase. Porém há um menor número de estudos sobre aplicação da enzima em bebidas lácteas fermentadas, e como o consumo deste produto têm sido muito crescente, estes se fazem necessário.

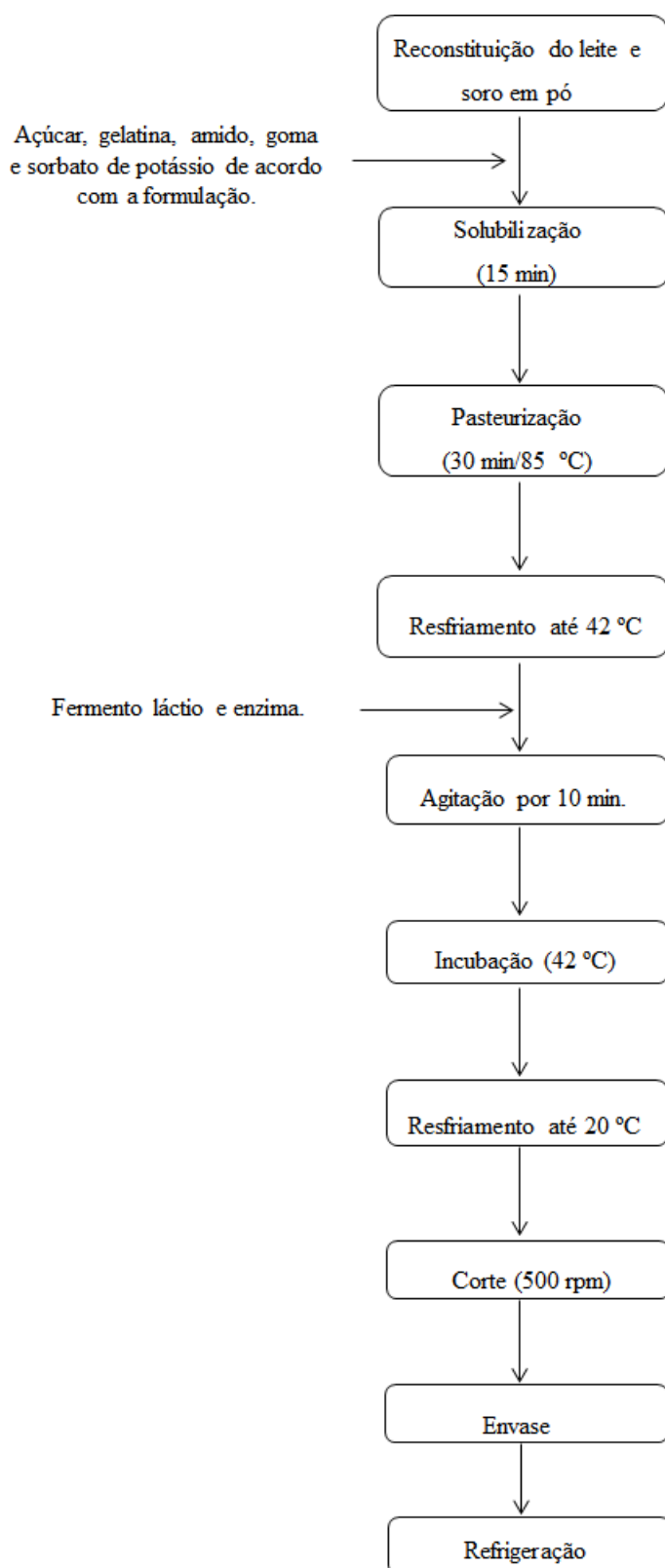
4 METODOLOGIA

PREPARO DA BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA

O soro de leite em pó utilizado foi gentilmente fornecido pela Alibra Alimentos Ltda, fabricante do produto. Utilizou-se o fermento lácteo YO-MIX 885 LYO 50 DCU, liofilizado e composto exclusivamente de cepas de *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* fabricado pela Danisco e gentilmente fornecido pela Usina de Beneficiamento e Cooperativa Mista Agropecuária de Patos de Minas (Coopatos). Neste trabalho foi utilizada a ACTIVA® YG recomendada para iogurtes e produtos similares com atividade declarada de 10^6 U g⁻¹ de preparação enzimática, gentilmente fornecidas pela Ajinomoto Interamericana Ind. e Com. Ltda. O açúcar refinado utilizado foi comercial, assim como o leite em pó, sendo utilizado para critério de escolha o teor de proteínas apresentado na tabela nutricional do produto. Os espessantes/estabilizantes empregados foram a goma guar, amido modificado de milho 50 da Cargil e a gelatina de bloom 220.

O processo de fabricação da bebida láctea fermentada seguiu o fluxograma apresentado na Figura 3.

Figura 3 – Fluxograma da produção da bebida láctea fermentada.



Fonte: O autor.

Para o preparo das amostras água destilada pesada em um béquer era aquecida até 40 °C em manta aquecedora (marca ano modelo). Em seguida sob agitação em agitador magnético com aquecimento (VELP, ARE – 20500162) eram adicionados o leite em pó integral e o soro de leite em pó, sendo a mistura mantida por 6 minutos sob agitação, adicionando posteriormente o açúcar, gelatina, amido, goma e sorbato de potássio, nesta ordem de acordo com a formulação. A solução era mantida sob agitação por 10 minutos para solubilização de todos os ingredientes. Posteriormente era levada ao banho termostático (LAUDA, SL 152) para pasteurização em temperatura de 85 °C por 30 minutos.

Assim que o binômio foi atingido, a solução era resfriada em banho de gelo até atingir temperatura de 42 °C, quando adicionavam-se o fermento lácteo e a enzima. Para homogeneizar a mistura esta era mantida sob agitação por mais 10 minutos em agitador mecânico (IKA, DLH) com rotação de 500 rpm. Ao término desta etapa era realizado o envase da solução em potes de vidro e então era realizada a fermentação em incubadora B.O.D. (BUNKER, LS 334) em temperatura de 42 °C por cerca de 4 horas quando se atingia o pH de corte do coágulo de 4,6. As amostras eram resfriadas em banho de gelo até 20 °C e posteriormente o corte era realizado por agitador mecânico a 500 rpm durante 10 minutos. Por fim as amostras eram envasadas em potes plásticos de 250 mL e armazenadas sob refrigeração em geladeira. Todos os ingredientes sólidos das formulações foram pesados em balança analítica (GEHAKA, AUW 220D).

As formulações variaram quanto à combinação de goma guar, gelatina e amido nas proporções apresentadas na Tabela 3 com e sem adição da enzima transglutaminase microbiana.

Tabela 3: Proporções de estabilizantes/espessantes utilizados na elaboração das bebidas lácteas.

Formulação	Goma Guar (%)	Gelatina (%)	Amido (%)
GO/GE/AM	0,30	0,30	1,00
GE/AM	-	0,30	1,00
GO/AM	0,30	-	1,00
GO/GE	0,30	0,30	-
AM	-	-	1,00

Onde: GO = goma guar; GE =gelatina; AM = amido de milho modificado.

Quando não adicionado algum dos componentes, amido, gelatina ou goma guar, o percentual deste era recompensado pela adição proporcional de leite e soro em pó. A quantidade de enzima adicionada foi determinada pela proporção de proteína presente na solução, calculada considerando o teor proteico apresentado na tabela nutricional do leite e soro em pó. O teor de fermento lácteo foi determinado seguindo instruções do fabricante, estabelecendo um percentual de 0,0006% por litro de formulação.

ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As análises descritas abaixo foram realizadas em triplicata nas formulações com e sem adição de enzima transglutaminase de origem microbiana.

- pH: foi realizado em um potenciômetro Micronal modelo V, conforme descrito na A.O.A.C., (1995);
- Teor de ácido láctico: foi determinado pela medida de acidez realizada por titulação com NaOH a 0,1 M, conforme descrito na A.O.A.C., (1995);
- Acidez total titulável: foi determinado pela medida de acidez realizada por titulação com NaOH a 0,1 M, 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);
- Sinérese: foi realizado com base no método da centrifugação utilizado por Gauche et al, (2009) – 10 g foram centrifugadas sob refrigeração a 3000 rpm por 10 minutos. 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.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de ácido láctico durante a fermentação do leite é responsável pela elaboração do iogurte.

A acidez exerce grande influência sobre os atributos de qualidade sobre produtos lácteos fermentados e é um dos fatores que limita sua aceitação. Durante a estocagem refrigerada das bebidas lácteas elaboradas, pode haver aumento da acidez titulável e estas mudanças na acidez do produto ocorrem, em maior ou menor grau, dependendo da temperatura de refrigeração, do tempo de armazenamento e do poder de pós-acidificação das culturas utilizadas (GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, 2002). Os resultados obtidos em análise da acidez titulável das formulações de bebida láctea fermentada são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Valores de acidez total titulável nos dias 3, 5 e 7 de vida de prateleira.

Formulação	Dia	Acidez Total Titulável	
		com MTG	sem MTG
GO/GE/AM	3	6,012 ± 0,367 ^{abA}	6,434 ± 0,495 ^{bA}
	5	7,395 ± 0,159 ^{abB}	8,015 ± 0,254 ^{bB}
	7	7,947 ± 0,050 ^{abB}	7,772 ± 0,400 ^{bB}
GE/AM	3	6,099 ± 0,264 ^{abA}	6,482 ± 0,377 ^{bA}
	5	8,005 ± 0,088 ^{abB}	7,676 ± 0,273 ^{bB}
	7	8,210 ± 0,044 ^{abB}	8,395 ± 0,241 ^{bB}
GO/AM	3	5,525 ± 0,293 ^{aA}	5,622 ± 0,297 ^{abA}
	5	7,471 ± 0,228 ^{abB}	7,672 ± 0,240 ^{abB}
	7	7,555 ± 0,116 ^{abB}	7,937 ± 0,138 ^{abB}
GO/GE	3	6,016 ± 0,382 ^{abA}	6,090 ± 0,235 ^{abA}
	5	7,673 ± 0,102 ^{abB}	7,779 ± 0,295 ^{abB}
	7	7,653 ± 0,284 ^{abB}	8,396 ± 0,234 ^{abB}
AM	3	5,424 ± 0,282 ^{aA}	5,879 ± 0,349 ^{abA}
	5	6,895 ± 0,165 ^{abB}	7,157 ± 0,105 ^{abB}
	7	7,458 ± 0,342 ^{abB}	8,282 ± 0,432 ^{abB}

Onde: GO = goma guar; GE =gelatina; AM = amido de milho modificado.

Formulações com letras minúsculas na vertical e horizontal idênticas não diferem entre si ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$). Letras maiúsculas na vertical e horizontal idênticas não diferem entre si ao nível de 5 % de significância ($p < 0,05$).

Observa-se que as formulações com e sem adição da enzima transglutaminase não apresentam diferença quanto ao teor de ácido láctico significativamente ($p < 0,05$) entre si ao terceiro dia de análise após a produção das bebidas. Mostrando que a enzima não interfere no processo de fermentação para produção do iogurte. O mesmo ocorre ao avaliar os valores obtidos nos dias posteriores, sendo que a partir do quinto dia, não se tem diferença nos teores de acidez titulável para todas as formulações, demonstrando assim que o consumo de

substrato pelos cultivos lácticos e conversão em ácidos, principalmente em ácido láctico, apresenta um início de estabilização e redução.

Condizente com o que foi apresentado pelos valores de acidez, tem-se que o teor de ácido láctico das formulações aumenta gradualmente com o tempo. Isto ocorre por que as bactérias lácticas acidificam o meio pela conversão de açúcares em ácido láctico, sendo o percentual deste ácido apresentado na Tabela 5.

Tabela5 – Percentual de ácido láctico das formulações avaliado nos dias 3, 5 e 7.

Formulação	Dia	% Ácido Láctico	
		com MTG	sem MTG
GO/GE/AM	3	0,571 ± 0,033 ^{abA}	0,579 ± 0,045 ^{bA}
	5	0,666 ± 0,014 ^{bB}	0,721 ± 0,023 ^{aB}
	7	0,715 ± 0,004 ^{abcdB}	0,729 ± 0,036 ^{abcdB}
GE/AM	3	0,549 ± 0,024 ^{abA}	0,583 ± 0,034 ^{bA}
	5	0,720 ± 0,008 ^{aB}	0,691 ± 0,025 ^{abB}
	7	0,739 ± 0,004 ^{bcdeB}	0,756 ± 0,022 ^{deB}
GO/AM	3	0,497 ± 0,026 ^{aA}	0,506 ± 0,027 ^{abA}
	5	0,672 ± 0,021 ^{bB}	0,690 ± 0,022 ^{abB}
	7	0,680 ± 0,010 ^{abB}	0,714 ± 0,012 ^{abcdB}
GO/GE	3	0,541 ± 0,034 ^{abA}	0,548 ± 0,021 ^{abA}
	5	0,691 ± 0,009 ^{abB}	0,700 ± 0,027 ^{abB}
	7	0,699 ± 0,026 ^{abcB}	0,753 ± 0,021 ^{eB}
AM	3	0,488 ± 0,025 ^{aA}	0,491 ± 0,031 ^{aA}
	5	0,621 ± 0,015 ^{cB}	0,634 ± 0,009 ^{cB}
	7	0,671 ± 0,031 ^{aB}	0,675 ± 0,039 ^{abB}

Onde:GO = goma guar; GE =gelatina; AM = amido de milho modificado.

Formulações com letras minúsculas na vertical e horizontal idênticas não diferem entre si ao nível de 5% de significância (p<0,05). Letras maiúsculas na vertical e horizontal idênticas não diferem entre si ao nível de 5 % de significância (p<0,05).

Apesar da etapa de fermentação ter sido encerrada e iniciado o resfriamento em pH 4,6, a ação das bactérias lácticas continua lentamente em temperatura baixa, o que proporciona o aumento do percentual de ácido láctico, principalmente pela atividade do microrganismo *L. bulgaricus* que pode tolerar valores de pH mais ácidos, na faixa de 3,5 a 3,8, (ANDRADE, 2010).

Observa-se que em todas as amostras os valores de ácido láctico no dia 3 apresenta diferença significativa ($p < 0,05$), comparado aos valores obtidos nos dias 5 e 7, entretanto estes últimos não diferem entre si, o que pode indicar o início de uma estabilização da produção de ácido láctico devido queda no teor de substrato, principalmente a lactose, açúcar presente no leite e soro.

A produção de ácido láctico, é característica de todos os leites fermentados, age como conservante natural, além de tornar os componentes do leite mais digeríveis. O aumento no teor de ácido láctico contribui para a desestabilização das micelas de caseína e, conseqüentemente, para a formação do gel, além de proporcionar o seu sabor ácido característico, acentuando o aroma do produto.

Dentre as formulações, aquelas que possuíam amido e goma (GO/AM e AM) apresentaram menor teor de ácido láctico no 3º dia, tanto para as amostras com adição como para as sem adição da enzima transglutaminase. Isto pode ser explicado pela maior dificuldade de metabolização desses açúcares pelas bactérias lácticas devido as cadeias moleculares destes polissacarídeos apresentarem ramificações que necessitam de enzimas específicas para hidrólise. Em contrapartida as bactérias lácticas possuem maior capacidade de metabolizar lactose devido a ação da permease, enzima que atua no processo de transporte ativo de substâncias através da membrana celular, facilitando a absorção deste açúcar.

Alves et al. (2014) avaliaram as bactérias lácticas *L. bulgaricus* e *S. termophilus* com capacidade amilolítica, ou seja, que produzem enzimas capazes de hidrolisar o amido para posteriormente conversão em ácido láctico. Estes autores relataram que estas bactérias empregadas na fermentação das bebidas lácteas apresentaram capacidade amilolítica reduzida. Porém, segundo os resultados da Tabela 5, observa-se ao decorrer dos dias 5 e 7 que nas formulações que continham goma e amido, os valores de menor teor de ácido láctico produzido se torna menos discrepante quando comparado às demais amostras. Isto se deve à queda no teor de lactose primeiramente consumida, passando assim as bactérias a metabolizarem mesmo que em menor quantidade, os demais açúcares presentes, como a sacarose, a goma e o amido, a fim de manterem suas necessidades energéticas.

Faria (2010) que fez análises físico-químicas após 7 dias de fabricação de uma bebida láctea fermentada com 97,98% de base (leite e soro em pó e água), 2% de fermento e 0,02% de transglutaminase, observou para este produto o valor de 0,63% de ácido láctico. Na literatura são encontrados diversos estudos que encontraram valores entre 0,5 e 0,7% para ácido láctico em iogurtes (ALMEIDA; BONASSI; ROÇA, 2001; OLIVEIRA et al., 2006; SANTOS et al., 2006; ANDRADE, 2010; MENEZES, 2011).

Os valores de pH são apresentado na Tabela 6. Observa-se uma queda gradual no pH para todas as formulações, devido ao aumento do teor de ácido láctico como apresentado anteriormente. Ao decorrer das análises a formulação GO/GE/AM com e sem adição de MTG e a formulação GE/AM com a enzima não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores obtidos nas análises do quinto e sétimo dia, demonstrando assim uma possível estabilização na produção de ácidos, semelhante na avaliação da acidez titulável. Porém, as demais formulações apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores obtidos ao decorrer dos três dias de análise, portanto, nestas ainda ocorreu uma produção de ácidos mais expressiva.

Tabela6 – pH das formulações avaliado nos dias 3, 5 e 7.

Formulação	Dia	pH	
		com MTG	sem MTG
GO/GE/AM	3	4,45 ± 0,013 ^{abA}	4,41 ± 0,018 ^{aA}
	5	4,20 ± 0,009 ^{abB}	4,24 ± 0,049 ^{aB}
	7	4,16 ± 0,007 ^{abB}	4,16 ± 0,016 ^{abB}
GE/AM	3	4,45 ± 0,027 ^{abA}	4,42 ± 0,017 ^{aA}
	5	4,22 ± 0,011 ^{abB}	4,23 ± 0,020 ^{aB}
	7	4,19 ± 0,007 ^{bcB}	4,13 ± 0,011 ^{aC}
GO/AM	3	4,49 ± 0,011 ^{bdA}	4,34 ± 0,022 ^{cA}
	5	4,25 ± 0,018 ^{bdB}	4,14 ± 0,011 ^{cC}
	7	4,20 ± 0,007 ^{cC}	4,09 ± 0,016 ^{dC}
GO/GE	3	4,42 ± 0,022 ^{aA}	4,44 ± 0,022 ^{abA}
	5	4,25 ± 0,011 ^{aB}	4,23 ± 0,018 ^{abB}
	7	4,20 ± 0,011 ^{cC}	4,16 ± 0,020 ^{abC}
AM	3	4,40 ± 0,013 ^{dA}	4,34 ± 0,016 ^{cA}
	5	4,34 ± 0,018 ^{dB}	4,17 ± 0,011 ^{cB}
	7	4,26 ± 0,009 ^{eC}	4,09 ± 0,022 ^{dC}

Onde: Onde: GO = goma guar; GE = gelatina; AM = amido de milho modificado.

Formulações com letras minúsculas na vertical e horizontal idênticas não diferem entre si ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$). Letras maiúsculas na vertical e horizontal idênticas não diferem entre si ao nível de 5 % de significância ($p < 0,05$).

Segundo Fiszman, Lluch e Salvador (1999) o teor de sólidos do leite exerce grande influência na acidez titulável, sendo o pH o melhor critério para se expressar a acidez do iogurte, e portanto este parâmetro pode expressar melhor a acidez das formulações.

O pH tem grande influência nas características de bebidas lácteas fermentadas, pois interfere no aspecto visual do produto final, sendo fundamental um controle rigoroso para que não ocorram possíveis separações de fases, devido acidificação elevada, que também provoca

alterações nas características sensoriais tornando o produto indesejável. Além disto, o pH interfere no número total de bactérias lácticas viáveis presentes durante todo o prazo de validade, que segundo a legislação deve ser no mínimo de 10^6 UFC/g, pois uma acidificação excessiva pode levar à lise celular (BRASIL, 2005; GURGEL e OLIVEIRA, 1995).

Os resultados entre 4,09 e 4,45 obtidos neste estudo encontram-se dentro dos valores usuais para bebidas lácteas fermentadas que são entre 3,7 a 4,6 (SOUZA, 1991). Muguruma e colaboradores (2003) obtiveram pH de 4,49 em análise após sete dias de produção de queijo petit suisse contendo 0,375% de goma guar e carragena em sua composição. Valor acima do apresentado pelas formulações com goma (GO/GE/AM, GO/AM e GO/GE) ao sétimo dia de vida de prateleira. A Tabela 7 abaixo contém o teor proteico e o teor de sólidos das formulações. Analisando os dados estatisticamente pelo teste de Tukey teve-se que as formulações não diferem quanto ao percentual de proteínas e sólidos ($p < 0,05$).

Tabela 7 – Teor proteico e de sólidos totais.

Formulação	% Proteína (m/m)		% Sólidos (m/m)	
	com TG	sem TG	com TG	sem TG
GO/GE/AM	$1,86 \pm 0,065^a$	$1,81 \pm 0,086^a$	$18,012 \pm 0,634^a$	$18,706 \pm 0,440^a$
GE/AM	$1,86 \pm 0,049^a$	$1,85 \pm 0,057^a$	$18,435 \pm 0,882^a$	$18,512 \pm 0,152^a$
GO/AM	$1,76 \pm 0,077^a$	$1,74 \pm 0,083^a$	$18,446 \pm 0,103^a$	$18,285 \pm 0,120^a$
GO/GE	$1,81 \pm 0,035^a$	$1,86 \pm 0,047^a$	$18,537 \pm 0,998^a$	$18,385 \pm 0,020^a$
AM	$1,73 \pm 0,094^a$	$1,74 \pm 0,015^a$	$18,475 \pm 0,060^a$	$17,629 \pm 0,473^a$

Onde: GO = goma guar; GE = gelatina; AM = amido de milho modificado.

Formulações com letras idênticas não diferem entre si ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

Observa-se que os menores valores em relação a proteína são apresentados pelas formulações contendo goma e amido (GO/AM) e contendo só amido (AM), com e sem adição de transglutaminase, o que pode ser explicado por estas serem as formulações que não continham gelatina. A gelatina utilizada bloom 220 contém cerca de 86% de proteínas em sua composição, o que representa 2,58 gramas de proteína por litro de bebida láctea fermentada.

Ao retirar este componente da composição, substituía-a por um acréscimo proporcionalmente por leite e soro em pó, os quais apresentam um teor proteico abaixo do

encontrado na gelatina. Isto pode ser observado ao analisar que todas as demais amostras contendo gelatina apresentaram valores maiores quanto ao percentual proteico.

Todas as formulações apresentaram teor de proteínas entre 1,73 e 1,86 gramas em 100 gramas de produto, valores de acordo com a legislação que determina que bebidas lácteas fermentadas devem conter no mínimo 1,2 gramas de proteína em 100 gramas de bebida láctea. Thamer e Penna (2006) obtiveram valores entre 1,93 e 2,26% em bebida láctea fermentada com avaliação do teor de soro. Faria (2011) encontrou teores de 2,26% de proteína em formulação de bebida láctea fermentada contendo proporção de 1:1 entre leite e soro em pó, valor este acima dos encontrados neste estudo, apesar de a proporção ter sido a mesma.

Devido à presença de soro sabe-se que o teor proteico de bebidas lácteas fermentadas é menor do que o teor presente em iogurtes. Farsworth e colaboradores (2005) determinaram teor de 3,06 g/100 g de proteínas em iogurte com adição de transglutaminase. Já Bonisch et al. (2007) determinou teor de 3,43 g/100 gramas de proteína em iogurte sem fortificação e de 4,69 g/100 gramas em iogurte com 1,25% de fortificação em proteínas.

Com relação ao teor de sólidos totais, quanto maior a porcentagem de sólidos dos ingredientes usados para o preparo das bebidas lácteas maior será seu teor. Os percentuais de sólidos não apresentaram diferença entre as formulações com e sem enzima, variando entre 17,629 e 18,706%, o que se explica por todas as formulações que não contenham algum componente (goma, gelatina e/ou amido), terem o percentual deste acrescido em leite e soro em pó. Gallina e colaboradores (2009) ao caracterizarem bebida obtida a partir de leite fermentado simbiótico adicionado de polpa de goiaba obtiveram valores de 16,06 % de sólidos em sua formulação, valor este próximo aos observados neste trabalho. Thamer e Penna (2006) obtiveram valores entre 15,68 e 18,97% de sólidos no estudo da caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas acrescidas de prebióticos. Os valores mais elevados apresentados por estes autores foi de 18,95 e 18,97%, os quais continham na formulação a concentração máxima de 8% sacarose, percentual igual ao utilizado no preparo das formulações do presente trabalho.

Na elaboração e avaliação de uma bebida láctea fermentada à base de soro de leite fortificada com ferro, Silva et al. (2012) encontraram um teor de 18,16% de sólidos totais. Esse valor corresponde a uma composição de 58,0% de leite cru, 24,8% de soro de queijo, 8,2% de sacarose, 7,0% de polpa de manga e 2% de cultura mista, valores estes próximos aos apresentados neste estudos.

Na Tabela 8 estão os valores do estudo de sinérese das amostras no 5º dia. Observa-se que as formulações GO/GE com e sem adição da enzima MTG não apresentaram separação de líquido. A goma guar é bastante empregada em produtos lácteos por conferir espessamento, estabilização, controle reológico e de viscosidade, modificação de textura e consistência e retenção de água (SANDERSON, 1981). Já a gelatina é normalmente empregada em produtos lácteos fermentados como estabilizante devido a suas características reológicas desejáveis na formação de gel, além de propiciar o aumento da viscosidade, da firmeza e evitar a separação do soro (KEOGH; O’KENNEDY, 1998; FISZMAN; LLUC; SALVADOR, 1999), empregada em associação com hidrocolóides, como a goma guar, devido ação sinérgica.

A legislação estabelece para leites fermentados, que espessantes e estabilizantes como são classificadas os aditivos goma guar e gelatina podem ser adicionados “*quantum satis*” (quanto baste), ou seja, não há um limite (BRASIL, 2000), assim maiores teores destes componentes é possível para estabelecer melhores características físico-químicas.

Tabela 8 – Percentuais de sinérese ao quinto dia de vida de prateleira.

Formulação	Sinérese (%)	
	com TG	sem TG
GO/GE/AM	12,724 ± 3,042 ^b	12,185 ± 1,238 ^b
GE/AM	14,589 ± 1,478 ^b	17,887 ± 2,773 ^c
GO/AM	18,834 ± 4,003 ^c	21,101 ± 2,218 ^c
GO/GE	0,000 ± 0,000 ^a	0,000 ± 0,000 ^a
AM	30,347 ± 2,645 ^d	30,742 ± 3,310 ^d

Onde: GO = goma guar; GE =gelatina; AM = amido de milho modificado.

Formulações com letras idênticas não diferem entre si ao nível de 5% de significância (p<0,05).

Estudos de Keogh e O’Kennedy (1998) e Fiszman, Lluch e Salvador (1999) relatam a ausência de sinérese em iogurtes contendo 0,5% de gelatina em suas formulações. Supavititpatana et al. (2008) constataram que a adição de 0,4% de uma gelatina comercial ocasionou boa aceitabilidade para o produto, com pouca sinérese dos géis produzidos, percentuais estes próximos ao empregado neste estudo de 0,3% de gelatina.

Em contrapartida as formulações sem a adição de goma guar, mas com gelatina e amido apresentaram liberação de líquido, sendo que as que continham apenas amido apresentaram os maiores percentuais de sinérese. O que pode ser associado ao processo de retrogradação do amido em que ocorre um rearranjo das moléculas por ligações de hidrogênio, causando a liberação de moléculas de água devido a contração da rede de gel (LAPASIN; PRICL, 1999).

Costa e colaboradores (2013) no desenvolvimento de bebida láctea fermentada com diferentes espessantes/estabilizantes (goma guar, concentrado proteico de soro, gelatina, amido e goma xantana) obtiveram que as três formulações contendo respectivamente 0,50% de proteína e 0,50% de concentrado proteico de soro; 1,00% de gelatina em pó e uma com 1,00% de goma guar, não apresentaram sinérese. As amostras que mais apresentaram separação de soro foram as que continham amido, nas proporções de 0,50 e 1,00%.

Analisando as formulações com e sem adição da enzima MTG a amostra GE/AM foi a única que apresentou diferença significativa ($p < 0,05$), sendo que a formulação contendo a enzima apresentou menor sinérese. Isto pode ser associado à ação da transglutaminase sobre as proteínas, uma vez que as ligações cruzadas catalisadas pela MTG formam uma microestrutura do gel mais compacta (FAERGMAND et al., 1999) o que diminui a contração do gel e, conseqüentemente, ocasiona uma menor sinérese. Esta formulação continha um teor de proteínas maior por conter gelatina e um acréscimo de soro e leite em pó para compensar a não adição de goma, favorecendo a ação da MTG.

Porém, Faria (2011) relata que bebidas lácteas com baixa concentração enzimática (0,02%) assim como foi empregado nas formulações deste trabalho, não formam ligações cruzadas suficientes para minimizar a contração do gel, ao início da vida de prateleira do produto. E em seu estudo o autor pode observar que apenas após 21 e 28 dias todas as formulações analisadas apresentaram níveis de sinérese significativamente menor ($p < 0,05$) do que o controle, indicando que mesmo em baixas concentrações a TG pode reduzir a sinérese em bebidas lácteas fermentadas após 21 dias de vida de prateleira o que se deve as ligações cruzadas catalisadas pela transglutaminase ocorrerem gradativamente durante o armazenamento.

A amostra GO/AM apresentou maior valor de sinérese quando comparada à formulação em igual composição, porém com a presença da enzima transglutaminase. Quanto a isto, observa-se que esta formulação sem a enzima no 5º dia de vida de prateleira, período em sinérese foi avaliada, apresentou um pH de 4,14, abaixo do pH de 4,25 apresentado pela formulação GO/AM com a adição da enzima. O abaixamento excessivo do pH favorece

sinérese devido a redução capacidade de retenção de água das proteínas e contração do coágulo, fator portanto, diretamente relacionada a separação do soro.

6 CONCLUSÃO

Os valores de acidez titulável e o percentual de ácido láctico demonstraram que todas as formulações tendem a estabilizar quanto à produção de ácidos e consequente redução do pH à partir do quinto dia de vida de prateleira.

Os resultados obtidos para análise de pH demonstra que todas as formulações encontram-se dentro dos valores apresentados na literatura para este tipo de produto.

O menor teor proteico é apresentado pelas formulações que não contêm gelatina (GE), sendo que os valores determinados encontraram-se acima do mínimo estabelecido pela legislação de 1,2 g de proteína/100 gramas de produto.

Em relação à sinérese, a formulação contendo goma e gelatina (GO/GE) com e sem adição da enzima MTG não apresentou sinérese nos dias de análise, o que demonstra a formação de uma rede de gel com maior capacidade de retenção de água. Em contrapartida as formulações contendo amido foram as que mais apresentaram sinérese devido retrogradação do amido. A única amostra em que a adição da transglutaminase de origem microbiana pode ter atuado de forma benéfica atuando sobre as proteínas e fortalecendo a rede de gel, consequentemente diminuindo a sinérese quando comparada à amostra sem a enzima foi a formulação contendo gelatina e amido (GE/AM). O que pode estar associado ao maior teor proteico desta formulação devido à presença da gelatina, composta por cerca de 86% por proteínas. Porém, de forma geral o percentual de MTG empregado não afetou de forma significativa os resultados obtidos, o que pode demonstrar que em quantidade pequena como empregado, esta enzima não possui a capacidade de atuar como apresentado em outros estudos, melhorando características desejáveis como a redução da sinérese.

• Trabalhos futuros

Posteriormente será realizada análise de vida de prateleira do produto para uma avaliação mais ampla das características físico-químicas das bebidas lácteas fermentadas em relação a sua composição, assim como análise sensorial do produto.

Deve ser feita avaliação econômica do emprego da enzima MTG em bebidas lácteas fermentadas, comparando ao custo de outros componentes que podem dar características desejáveis ao produto, como a gelatina, amidos e gomas.

REFERÊNCIAS

AGYARE, K. K., ADDO, K. e XIONG, Y. L. (2009). **Emulsifying and foaming properties of transglutaminase-treated wheat gluten hydrolysate as influenced by pH, temperature and salt**. Food Hydrocolloids, 23(1), 72–81.

ALI, N. A. et al. (2010). **Effect of transglutaminase cross linking on the functional properties as a function of NaCl concentration of legumes protein isolate**. International Journal of Biological and Life Sciences, 6(1), 8–13. Disponível em: <http://waset.org/publications/14575/effect-of-transglutaminase-cross-linking-on-the-functional-properties-as-a-function-of-nacl-concentration-of-legumes-protein-isolate>. Acesso em: 11 de outubro de 2017.

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**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 21, n. 2, p. 187-192, 2001. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612001000200012. Acesso em: 3 de junho de 2017.

ALVES, M. L. F, et al. **AValiação da condição amilolítica de bactérias lácticas em meios com batata na produção de ácido láctico**, p. 1185-1192. In: **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2014 [= Blucher Chemical Engineering Proceedings, v.1, n.2]**. São Paulo: Blucher, 2015. ISSN 2359-1757. Disponível em: DOI 10.5151/chemeng-cobeq2014-0785-23927-159266. Acesso em: 27 de outubro de 2017.

ANDO, H. et al. (1989). **Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms**. Agricultural and Biological Chemistry, 53(10), 2613–2617. Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb1961/53/10/53_10_2613/_article. Acesso em: 17 de junho de 2017.

ANDRADE, R. L. P.; MARTINS, J. F. P. **Influência da adição da fécula de batata-doce (Ipomoea batatas L.) sobre a viscosidade do permeado de soro de queijo**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, [s.l.], v. 22, n. 3, p.249-253, dez. 2010. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: http://scihub.tw/http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612002000300009&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 11 de junho de 2017.

ANVISA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. RDC N° 45, de 03 de novembro de 2010. **Dispõe sobre aditivos alimentares autorizados para uso segundo as**

Boas Práticas de Fabricação (BPF). Brasília, 2005. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388779/Resolu%25C3%25A7%25C3%25A3o%2Bda%2BDiretoria%2BColegiada%2B%2BRDC%2Bn%2B%2B45%2Bde%2B03%2Bde%2Bnovembro%2Bde%2B2010.pdf/c87cda6e-ba1a-4313-bb41-efaf50135eb0>. Acesso em: 11 de junho de 2017.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO. ABIC. **Aproveitamento industrial do soro de queijo cresce em Minas Gerais.** 2014. Disponível em: https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjltvaqgrvYAhXIC5AKHfcVCkAQFggoMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.abiq.com.br%2Fnoticias_ler.asp%3Fcodigo%3D314%26codigo_categoria%3D6%26codigo_subcategoria%3D3&usg=AOvVaw1kfNL-9KUjB-AVn9Atiup7 Acesso em: 11 de junho de 2017.

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. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19780443856>. Acesso em: 14 de junho de 2017.

BABIKER, E. F. E. (2000). **Effect of transglutaminase treatment on the functional properties of native and chymotrypsin-digested soy protein.** Food Chemistry, 70(2), 139–145. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19780443856>. Acesso em: 14 de junho de 2017.

BÖNISCH, M. P. et al. **Transglutaminase cross-linking of milk proteins and impact on yoghurt gel properties.** International Dairy Journal, [s.l.], v. 17, n. 11, p.1360-1371, nov. 2007. Elsevier BV. Disponível em: . Acesso em: 13 de outubro de 2017.

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. Disponível em: <https://www2.cead.ufv.br/sgal/files/apoio/legislacao/legislacao6.pdf>. Acesso em: 3 de junho de 2017.

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. Disponível em: <http://www.leitebrasil.org.br/legislacao.htm>. Acesso em: 3 de junho de 2017.

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. Disponível em: <https://www2.cead.ufv.br/sgal/files/apoio/legislacao/legislacao6.pdf>. Acesso em: 3 de junho de 2017.

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. Disponível em: <http://www.cidasc.sc.gov.br/inspecao/files/2012/08/instru%C3%87%C3%83o-normativa-n%C2%BA-46-de-23-de-outubro-de-2007.pdf>. Acesso em: 3 de junho de 2017.

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. Disponível em: http://www.agais.com/normas/leite/leite_po.htm. Acesso em: 11 de outubro de 2017.

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.** Disponível em: <https://www2.cead.ufv.br/sgal/files/apoio/legislacao/legislacao6.pdf>. Acesso em: 3 de junho de 2017.

BULLAR, Y. S., UDDIN, M. A., e SHAH, N.P. 2002. **Effects of ingredients supplementantation on textural characteristics and microstructure of yogurt.** *Milchwissenschaft* 57, 328-332. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/279559904_Effects_of_ingredients_supplementantation_on_textural_characteristics_and_microstructure_of_yoghurt Acesso em: 12 de outubro de 2017.

CAMARGO, P.J.C.C. **Influência da Transglutaminase (ACTIVA® TG-B) e de Parâmetros de Processo na Textura de um Reestruturado Empanado de Carne de Peru.** 1999. 86f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/cr/2015nahead/1678-4596-cr-0103_8478cr20131440.pdf. Acesso em: 11 de outubro de 2017.

CAPITANI, C. D. et al. **Recuperação de proteínas do soro de leite por meio de coacervação com polissacarídeo.** *Pesquisa, agropecuária brasileira*, Brasília, v.40, n.11, p.1123-1128. 2005. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/107509/1/Recuperacao-de-proteinas.pdf>. Acesso em: 27 de outubro de 2017.

CARUSO, J. G. B.; OLIVEIRA, A. J. **Leite: obtenção, controle de qualidade e processamento**. São Paulo: Secretaria da Indústria e Comércio, Ciência e Tecnologia do Estado de São Paulo, 1999. Disponível em <http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=583876&biblioteca=vazio&busca=autoria:%22CARUSO,%20J.G.B.%22&qFacets=autoria:%22CARUSO,%20J.G.B.%22&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1>. Acesso em: 11 de outubro de 2017.

CEREDA, M.P. **Propriedades gerais do amido**. São Paulo, Fundação Cargill, 221 p. (Série: Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino-americanas, v. 1; 2002. Disponível em: <http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=250398&biblioteca=vazio&busca=autoria:%22CEREDA,M.P.%22&qFacets=autoria:%22CEREDA,M.P.%22&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1>. Acesso em: 28 de outubro de 2017.

CHO, S.M. et al. **Processing optimization and functional properties of gelatin from shark (*Isurus oxyrinchus*) cartilage**. Food Hydrocolloids, v.18, n.4, p.575-579, 2004. Disponível em: doi: 10.1016/j.procbio.2005.09.001. Acesso em: 17 de outubro de 2017.

COLLAR C. e BOLLAÍN C. (2005). **Relationships between dough functional indicators during breadmaking steps in formulated samples**. European Food Research and Technology 220: 372—379. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X03001681>. Acesso em: 15 de outubro de 2017.

COSTA, A. V.S. et al. **Desenvolvimento e caracterização físico-química, microbiológica e sensorial de bebida láctea fermentada elaborada com diferentes estabilizantes/espessantes**. Ciências Agrárias, Londrina, v. 34, p.209-226, fev. 2013. Universidade Estadual de Londrina. Disponível em: <httphttps://repositorio.bc.ufg.br/xmlui/bitstream/handle/ri/12470/Artigo%20-%20Alexsandra%20Val%C3%A9ria%20Sousa%20Costa%20-%202013.pdf?sequence=5&isAllowed=y>. Acesso em: 6 de outubro de 2017.

DALGLEISH, D. G. **On the structural models of bovine casein micelles – Review and possible improvements**. Soft Matter, v. 7, p. 2265–2272, 2011. Disponível em: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2011/sm/c0sm00806k#!divAbstract>. Acesso em: 3 de outubro de 2017.

Damodaran, S. (2010). **Aminoácidos, peptídeos e proteínas**. In S. Damodaran, K. L. Parkin, & O. R. Fennema (Eds.), Química de alimentos de Fennema (4th ed., pp. 179–262). Porto Alegre: Artmed. Disponível em: doi: 10.1016/j.procbio.2005.09.001. Acesso em: 15 de outubro de 2017.

DATAMARK Ltda. **Análise de mercado – bebida láctea fermentada**. Indústria brasileira. ed. 32. São Paulo, 2016. Disponível em: doi:<http://www.datamark.com.br/analise-de-mercado/iogurtes-e-sobremesa/bebida-lactea-466/>. Acesso em: 28 de outubro de 2017.

DE PAULA, A. C., et al. **Estudo da utilização da enzima Activa transglutaminase na fabricação de iogurte**. 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. Disponível em: <https://www.prp.unicamp.br/pibic/congressos/xviiicongresso/cdrom/FSCOMMAND/pdfN/201.pdf>. Acesso em: 3 de outubro de 2017.

DUBE, M., et al. R. (2007). **Texturisation and modification of vegetable proteins for food applications using microbial transglutaminase**. European Food Research and Technology, 225(2), 287–299. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00217-006-0401-2>. Acesso em: 21 de outubro de 2017.

FAERGEMAND, M., et al. (1999). **Transglutaminase: Effect on instrumental and sensory texture of set style yoghurt**. Milchwissenschaft, 54, 563–566. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/279892990_Transglutaminase_Effect_on_instrumental_and_sensory_texture_of_set_style_yoghurt. Acesso em: 15 de outubro de 2017.

FAKHOURY, F. M., et al. (2012). **Edible films made from blends of manioc starch and gelatin – influence of different types of plasticizer and different levels of macromolecules on their properties**. LWT – Food Science and Technology, 49, 149-154. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00217-006-0401-2>. Acesso em: 21 de outubro de 2017.

FARIA, D. S. **Estudo dos efeitos de aplicação de transglutaminase em bebida láctea fermentada com alto conteúdo de soro**. 2010. 118f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de processos Químicos e Bioquímicos) – Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, 2010. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00217-006-0401-2>. Acesso em: 21 de outubro de 2017.

FARNSWORTH, J.P. et al. **Effects of transglutaminase treatment on functional properties and probiotic culture survivability of goat milk yogurt**. Small Ruminant Research, [s.l.], v. 65, n. 1-2, p.113-121, set. 2006. Elsevier BV. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921448805002117>. Acesso em: 27 de outubro de 2017.

FERREIRA, M. S., et al. (2012). **Comparação das características físico-químicas e sensoriais de hambúrgueres de carne bovina elaborados com cloreto de sódio, polifosfato e transglutaminase**. Revista Brasileira de Medicina Veterinária, 34(1), 52–60. Disponível em: http://www.rbmv.com.br/pdf_artigos/13-06-2012_12-32RBMV%20010.pdf. Acesso em: 27 de outubro de 2017.

FISZMAN, S. M.; LLUCH, M. A.; SALVADOR, A. **Effect of addition of gelatin on microstructure of acidic milk gels and yoghurt and on their rheological properties**. International Dairy Journal, Barking, v. 9, n. 12, p. 895- 901, dez. 1999. Disponível

em:<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921448805002117>. Acesso em: 13 de outubro de 2017.

FOLK J. E. (1980). **Transglutaminases**. *Annu. Rev. Biochem.* Disponível em:<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921448805002117>. Acesso em: 27 de outubro de 2017.

GABIATTI, A. R.; CORTI, D. **Avaliação da adequação de leites fermentados probióticos comercializados na região oeste do Paraná quanto aos requisitos estabelecidos na legislação federal brasileira**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curso Superior de Tecnologia em Alimentos, Medianeira, 2010. Disponível em:<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921448805002117>. Acesso em: 11 de junho de 2017.

GAUCHE, C. et al. **Physical properties of yoghurt manufactured with milk whey and transglutaminase**. *Lwt - Food Science And Technology*, [s.l.], v. 42, n. 1, p.239-243, jan. 2009. Elsevier BV. Disponível em: . Acesso em: 2 de novembro de 2017.

GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S. C. et al. **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. Disponível em:<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224402001607>. Acesso em 03 de julho de 2017.

GUO, M.R., 2003. **Goat milk**. In: Caballero, B., Trugo, L., Finglas, P. (Eds.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Academic Press, London, UK, pp. 2944–2949. Disponível em:<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224402001607>. Acesso em 03 de julho de 2017.

GURGEL, M. S. C. C. A.; OLIVEIRA, A. J. **Avaliação das características físico-químicas do iogurte**. *Leite & Derivados*, v. 4, n. 22, p. 38-43, mai/jun, 1995. Disponível em:<http://www.scielo.br/pdf/cta/v25n3/27010.pdf>. Acesso em 03 de julho de 2017.

GÜVEN, M. **Effects of stabilizer usage on some quality characteristics of yoghurt**. *Gida*. v. 23, n. 2, p. 133-139, 1998. . Disponível em:<http://www.gidadernegi.org/EN/Genel/BelgeGoster.aspx?17A16AE30572D313A79D6F5E6C1B43FF1D0C78595477C54E>. Acesso em 27 de outubro de 2017.

GUZMAN-GONZALEZ, M., et al. (1999). **Influence of skimmed milk concentrate replacement by dry dairy products in a low fat set-type yoghurt model system. I: Use of whey protein concentrates, milk protein concentrates and skimmed milk powder**. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 1117–1122. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224402001607>. Acesso em 13 de outubro de 2017.

HAN, M., et al. (2009). **Effect of microbial transglutaminase on NMR relaxometry and microstructure of pork myofibrillar protein gel**. European Food Research and Technology, 228(4), 665–670. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00217-008-0976-x>. Acesso em 15 de setembro de 2017.

HERRERO, A. M., et al. (2008). **Raman spectroscopy study of the structural effect of microbial transglutaminase on meat systems and its relationship with textural characteristics**. Food Chemistry, 109(1), 25–32. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814607012605>. Acesso em 03 de julho de 2017.

HINZ, K. et al. **Comparison of the principal proteins in bovine, caprine, buffalo, equine and camel milk**. Journal Of Dairy Research, [s.l.], v. 79, n. 02, p.185-191, 27 fev. 2012. Cambridge University Press (CUP). Disponível em: . Acesso em: 13 de junho de 2017.

HONG, G. P. e XIONG, Y.L. (2012). **Microbial transglutaminase-induced structural and rheological changes of cationic and anionic myofibrillar proteins**. Meat Science, 91(1), 36–42. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224402001607>. Acesso em 19 de julho de 2017.

IKURA, K. et al. (1988) **Amino acid sequence of guinea pig liver transglutaminase from its cDNA sequence**. Biochemistry 27, 2898-2905. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00408a035>. Acesso em 27 de julho de 2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE: **Indicadores IBGE: estatística da produção pecuária**. 2013. Disponível em: ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Fasciculo_Indicadores_IBGE/abate-leite-couro-ovos_201701caderno.pdf. Acesso em 03 de julho de 2017.

JAROS, D., et al. 2006. **Transglutaminase in dairy products: chemistry, physics, applications**. J. Texture Stud. 37, 113–155. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1745-4603.2006.00042.x/abstract>. Acesso em 15 de setembro de 2017.

KANAJI, T., et al. (1993). **Primary structure of microbial transglutaminase from Streptovercillium sp. strain s- 8112**. Journal of Biological Chemistry, 268. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8099353>. Acesso em 29 de outubro de 2017.

KEOGH, M.k.; O'KENNEDY, B.t. **Rheology of Stirred Yogurt as Affected by Added Milk Fat, Protein and Hydrocolloids**. Journal Of Food Science. [s.l.], v. 63, n. 1, p.108-112, jan.

1998. Wiley-Blackwell. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.1998.tb15687.x/abstract>. Acesso em: 3 de novembro de 2017.

KURAISHI, C., SAKAMOTO, J., SOEDA, T., 1996. **The usefulness of transglutaminase for food processing**. In: Biotechnology for Improved Foods and Flavors, ACS Symposium Series 637, American Chemical Society, Washington, DC, pp. 29–38. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bk-1996-0637.ch003>. Acesso em: 27 de outubro de 2017.

KURAISHI, C., YAMAZAKI, K. e SUSAKI, Y. (2001). **Transglutaminase: Its utilization in the food industry**. Food Reviews International, 17(2), 221–246. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/FRI-100001258>. Acesso em: 13 de outubro de 2017.

KURTH L. e ROGERS P. J. (1984) **Transglutaminase catalyzed cross-linking of myosin to soya protein, casein and gluten**. J. Fd Sci. 49, 573-576. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.1984.tb12471.x/abstract>. Acesso em: 27 de outubro de 2017.

LAPASIN, R.; PRICL, S. **Rheology of industrial polysaccharides – theory and applications**. Gaithersburg: Aspen Publishers. 1999. p. 620. Disponível em: <http://www.springer.com/gp/book/9781461359159>. Acesso em: 28 de outubro de 2017.

LORAND L., GRAHAM R. M. (2003). **Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions**. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4 140–156 10.1038/nrm1014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12563291>. Acesso em: 27 de outubro de 2017.

LORENZEN, P. C. (2007). **Effects of varying time/temperature-conditions of preheating and enzymatic cross-linking on techno-functional properties of reconstituted dairy ingredients**. Food Research International, 40(6), 700–708. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996906002237>. Acesso em: 2 de novembro de 2017.

MALI, S. et al. **Influence of pH and hydrocolloids addition on yam (*Dioscorea alata*) starch pastes stability**. Lebensm.-Wiss. u-Technol. v. 36, p. 475-481, 2003. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643803000434> Acesso em: 27 de outubro de 2017.

MARUYAMA, L.Y. et al. **Avaliação de textura em queijo tipo petit-suisse probiótico**. Trabalho não publicado, Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo, 2004. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612006000200022 Acesso em: 28 de outubro de 2017.

MC GLINCHEY, N. **Functional native starch for fresh yoghurt products.** DeutscheMilchwirtschaft. v. 48, n.16, p.598-600, 1997.Disponível em: http://www.ingredion.us/content/dam/ingredion/pdf-downloads/US-Assets/brochures/Novation_CleanLabel_BR.pdfAcesso em: 13 de outubro de 2017.

MISHRA, H. N. **Mango soy fortified set yoghurt: effect of stabilizer addition on physicochemical, sensory and textural properties.** Food Chem., v. 87, p. 501-507, 2004.Disponível em: . Acesso em: 21 de outubro de 2017.

MOREIRA, G. M. M. et. al. **Efeito da adição de transglutaminase e gelatina na viscosidade de bebidas lácteas fermentadas fabricadas com soro de queijo de coalho.** Revista Insituto Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, v. 69, n. 5, p. 334-340, set/out, 2014. Disponível em: <https://revistadoilct.com.br/rilct/article/view/313/336>. Acesso em 29 de julho de 2017.

MOTOKI, M. e SEGURO, K. (1998). **Transglutaminase and its use for food processing.** Trends in Food Science & Technology, 9(5), 204–210.Disponível em: . Acesso em: 27 de outubro de 2017.

MOTOKI, M.; KUMAZAWA, Y. **Recent research trends in transglutaminase technology for food processing.** Food Science Technology Research, v. 6, p. 151-160, 2000.Disponível em:https://www.jstage.jst.go.jp/article/fsr/6/3/6_3_151/_article. Acesso em: 2 de novembro de 2017.

MUGURUMA, M. et al. **Soybean and milk proteins modified by transglutaminase improves chicken sausage texture even at reduce levels of phosphate.** Meat Science, v.63, p.191-197, 2003. Disponível em:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22062179>. Acesso em: 3 de outubro de 2017.

MUNHOZ, M. P.; WEBER, F. H.; CHANG, Y., K. **Influência de hidrocolóides na textura de gel de amido de milho.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 24, n. 3, p. 403–406, 2004.Disponível em:http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612004000300018. Acesso em: 29 de outubro de 2017.

NGEMAKWE, P. et al. **Effects of yeast, carboxymethylcellulose, yoghurt, transglutaminase and cyclodextrinase on mixing properties of oat dough.** Journal Of Food Science And Technology, [s.l.], v. 52, n. 10, p.6266-6277, 8 mar. 2015. Springer Nature. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26396372>. Acesso em: 2 de novembro de 2017.

NOGUCHI T. et al. **Fibroblast circadian rhythms of PER2 expression depend on membrane potential and intracellular calcium.** Chronobiol Int. Disponível em:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22734566>. Acesso em: 27 de outubro de 2017.

NONAKA S. et al. **Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein.** Cell. 1998;95:829–837. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9865700>. Acesso em: 28 de outubro de 2017.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos: alimentos de origem animal.** v.2. Porto Alegre: Artmed, 2005.

PARDI, M.C. et al. **Ciência, higiene e tecnologia da carne.** Goiânia: CEGRAF/EDUF, 1996. V2. Disponível em:

https://projetos.extras.ufg.br/joomla_proec/revista_ufg/dezembro2006/textos/ciencia_higiene_tec.pdf. Acesso em: 3 de outubro de 2017.

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. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1745-4603.2003.tb01058.x/full>. Acesso em: 17 de junho de 2017.

RENZETTI, S., BELLO, F. D. e ARENDT, E. K. (2008). **Microstructure, fundamental rheology and baking characteristics of batters and breads from different glutenfree flours treated with a microbial transglutaminase.** Journal of Cereal Science, 48(1), 33–45. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521007001506> Acesso em: 21 de outubro de 2017.

RODRIGUES, E. N. L. et al. 2014. **Spider diversity responds strongly to edge effects but weakly to vegetation structure in riparian forests of Southern Brazil.** ArthropodPlant Interactions 8:123-133. Disponível em: . Acesso em: 2 de outubro de 2017.

ROMEIH, H.; WALKER, G. **Recent advances on microbial transglutaminase and dairy application.** Trends In Food Science & Technology, [s.l.], v. 62, p.133-140, abr. 2017. Elsevier BV. Disponível em: . Acesso em: 13 de junho de 2017.

ROSELL, C.M. et al. Arroz. **De tales harinas, tales panes: granos, harinas y productos de panificación en iberoamérica.** Córdoba: Hugo Baéz Editor, 2007. p. 123-160. Disponível em: . Acesso em: 27 de outubro de 2017.

RUFINO, J. S. et al. **Elaboração de bebida láctea fermentada sabor mel.** Revista Brasileira de Agrotecnologia (Brasil). V. 5, n. 1 (2015) páginas 42 – 48. Disponível em: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/viewFile/13815/13703>. Acesso em: 27 de outubro de 2017.

SANDERSON, G. R. **Applications of Xanthan gum**. British Polymer Journal, [s.l.], v. 13, n. 2, p.71-75, jun. 1981. Wiley-Blackwell. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141391097001808>. Acesso em: 11 de outubro de 2017.

SEGURO, K., et al. (1995). **ϵ -(gGlutamyl) lysine: Hydrolysis by g-glutamyltransferase of different origins, when free or protein bound**. Journal of Agricultural & Food Chemistry, p. 43. Disponível em: . Acesso em: 21 de outubro de 2017.

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. Disponível em: http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/artigo06_2015_2.pdf. Acesso em: 28 de outubro de 2017.

SILVA, D. J. P. **Resíduos na indústria de laticínios**. Universidade Federal de Viçosa- Departamento de Tecnologia de Alimentos. 2011. Disponível em: <https://www2.cead.ufv.br/sgal/files/apoio/saibaMais/saibaMais2.pdf>. Acesso em: 27 de outubro de 2017.

SOUZA, G. **Fatores de qualidade do iogurte**. Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Piracicaba, v. 21, n. 1, p. 20-27, 1991.

SUDHAKAR, V.; SINGHAL, R.S.; KULKARNI, P.R. **Effect of sucrose on starch hydrocolloid interactions**. Food Chemistry v. 207, n. 2, 1998. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814695928244>. Acesso em: 3 de outubro de 2017.

SUPAVITITPATANA P. et al. **Characteristics and shelf-life of corn milk yogurt**. Chiang Mai University J Nat Sci. 2010;9:133–149. 2008. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/285984721_Characteristics_and_shelf-life_of_Corn_Milk_Yogurt. Acesso em 3 de outubro de 2017.

TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS. **TACO**. 2011. 4ª edição revisada e ampliada. Universidade Estadual De Campinas – Unicamp. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação – Nepa. Disponível em: . Acesso em: 3 de junho de 2017.

TAMIME, A.Y.; BARRANTES, E.; SWORD, A.M. **The effect of starch based fat substitutes on the microstructure of set-style yogurt made from reconstituted skimmed milk powder**. J. Soc. Dairy Technol. London, v. 49, n. 1, p. 1-10, 1996. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1471-0307.1996.tb02612.x/abstract>. Acesso em: 2 de novembro de 2017.

TAMIME, A. Y.; ROBINSON, R. K. **Yoghurt: science and technology**. 2nd ed. Boca Raton: Woodhead Publishing Ltd, 1999. 619p. Disponível em:

https://books.google.com.br/books/about/Yoghurt.html?id=e7PCh9APKYUC&redir_esc=y. Acesso em: 11 de outubro de 2017.

TRUONG, Y. et al. (2008),” **Status and Conspicuousness – Are They Related**. Strategic Marketing Implications for Luxury Brands,” Journal of Strategic Marketing, July, Vol. 16 No. 3, pp. 189-203. Disponível em: . Acesso em: 2 de outubro de 2017.

WASTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy science and technology**. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2006. 782p. Disponível em: <http://www.springer.com/food+science/journal/13594>. Acesso em: 21 de outubro de 2017.

WINTERTON, D.; MEIKLEJOHN, P.G. **A modified starch stabilizer for low cost production of fruit yogurt**. Aust. J. Dairy Technol. Victoria, p. 55-56, 1978. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/320584003_Yoghurt_Synersis_and_gelation. Acesso em: 11 de outubro de 2017.

XIONG, R. et al. **Characterization of a PIAS4 homologue from zebrafish: Insights into its conserved negative regulatory mechanism in the trif, mavs, and IFN signaling pathways during vertebrate evolution**. The Journal Of Immunology, [s.l.], v. 188, n. 6, p.2653-2668, 17 fev. 2012. The American Association of Immunologists. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22345667>. Acesso em: 29 de outubro de 2017.

YANG, H. et al. **Step optimization of the extraction and subsequent physical properties of channel catfish (Ictalurus punctatus) skin gelatin**. Food Chemistry and Toxicology, v.72, n.4, p.188-195, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17995759>. Acesso em: 3 de outubro de 2017.

YOKOYAMA, K.; NIO, N.; KIKUCHI, Y. Properties and applications of microbial transglutaminase. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 64, n. 4, p.447-454, 1 maio 2004. Springer Nature. Disponível em: . Acesso em 21 de outubro de 2017.

ZHU, Y. et al. (1995). **Microbial transglutaminase: A review of its production and application in food processing**. Applied Microbiology and Biotechnology, 44(3-4), 277-282. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00169916>. Acesso em: 13 de outubro de 2017.

ZOBEL, H. F. **Starch Crystal Transformations and Their Industrial Importance**. Starch - Stärke, [s.l.], v. 40, n. 1, p.1-7, 1988. Wiley-Blackwell. Disponível em: . Acesso em 3 de outubro de 2017.