

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS**

Celeide Pereira

**PROPRIEDADES FUNCIONAIS DE SORVETE DE MORANGO
DIET COM ADIÇÃO DA ENZIMA LACTASE E
TRANSGLUTAMINASE OTIMIZADA ATRAVÉS DA
METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA**

Florianópolis
2014

Celeide Pereira

**PROPRIEDADES FUNCIONAIS DE SORVETE DE MORANGO
DIET COM ADIÇÃO DA ENZIMA LACTASE E
TRANSGLUTAMINASE OTIMIZADA ATRAVÉS DA
METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, para obtenção do título de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Ernani Sebastião Sant' Anna.

Co-orientador: Prof. Dr. Pedro Luiz Manique Barreto

Florianópolis
2014

Catálogo na fonte elaborada pela biblioteca da
Universidade Federal de Santa Catarina

Pereira, Celeide

Propriedades funcionais de sorvete de morango *diet* com adição da enzima lactase e transglutaminase otimizada através da metodologia de superfície de resposta / Celeide Pereira; Orientador, Ernani Sebastião Sant' Anna; Co-orientador, Pedro Luiz Manique Barreto - Florianópolis, SC, 2014.
232 p.: il., grafs, tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós- Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. Sorvete. 3. Enzima lactase e transglutaminase. 4. Edulcorante. 5. Superfície de resposta. I. Sant' Anna, Ernani Sebastião. II. Barreto, Pedro Luiz Manique. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. IV. Título

Celeide Pereira

**PROPRIEDADES FUNCIONAIS DE SORVETE DE MORANGO
DIET COM ADIÇÃO DA ENZIMA LACTASE E
TRANSGLUTAMINASE OTIMIZADA ATRAVÉS DA
METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de
“Doutor em Ciência dos Alimentos”, e aprovada em sua forma final pelo
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Prof. Dr. Ernani Sebastião Sant’Anna
Presidente Orientador
UFSC – SC

Banca Examinadora:

Prof. Dr. André Wüst Zibetti
Membro
UFSC - SC

Profa. Dra. Eliana Badiale Furlong
Membro
UFRGS - RS

Profa. Dra. Rozangela Curi Pedrosa
Membro
UFSC – SC

Prof. Dr. Pedro Luiz Manique Barreto
Membro
UFSC-SC

Pesquisador Dr. Fabiano Bertoldi
Membro
EPAGRI-SC

Profa. Dra. Edna Regina Amante
Suplente
UFSC – SC

Florianópolis, 21 de Julho de 2014.

Ao meu querido pai, Carlos Pereira de Jesus (*in memoriam*), homem simples, analfabeto, humilde e trabalhador, o mais profundo agradecimento pelos exemplos de força e coragem, sempre me incentivando a superar as minhas decepções, a lutar por meus objetivos e aplaudindo as minhas conquistas. Minha saudade e minha gratidão serão eternas.

À minha querida mãe, Maria da Conceição Souza Pereira (*in memoriam*) pela incansável luta. Mesmo com sua pouca leitura e sua infindável simplicidade, sempre esteve presente com suas orações na minha caminhada. Minha saudade e minha gratidão serão eternas.

Aos meus queridos irmãos, Selma, Célia, Beatriz, Geralda Antônia, Graça e José Carlos, pelo constante apoio nos momentos difíceis, e sem os quais nada seria possível.

Aos meus queridos sobrinhos, Ana Paula, Fernanda Maria, Maria Cecília, Mateus, Pedro Felipe, Maria Isabel e Tainá.

AGRADECIMENTOS

Ao Sagrado Coração de Jesus, por estar sempre presente em minha vida, iluminando, abençoando e protegendo, e por me dar força para suportar as provações e seguir sempre em frente.

À Universidade Federal de Santa Catarina - SC e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias pela oportunidade concedida de realizar o curso de Doutorado.

Ao Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná - Unidade de Medianeira, pela oportunidade concedida.

Às empresas Frimesa, Alibra – Sooro, Ajinomoto, Novozyme, Candon Aditivos, Kerry do Brasil, Merck Millipore e Gemacon, pelas doações para a realização deste projeto.

Ao Prof. Dr. Ernani Sebastião Sant’Anna, do PGCAL/UFSC, pela oportunidade de realizar o Doutorado.

Ao Prof. Dr. Pedro Luiz Manique Barreto, do PGCAL/UFSC, pela oportunidade de realizar o Doutorado.

Ao Prof. Dr. Paulo José Ogliari (*in memoriam*), do Departamento de Informática e Estatística – Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo inestimável apoio e orientação no delineamento experimental do projeto.

À Profa. Dra. Rozangela Curi Pedroza, do Laboratório de Bioquímica Experimental do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, pela inestimável ajuda, por haver-me recebido em seu laboratório e pela orientação nas análises de eletroforese.

À Profa. Dra. Suzana Lucy Nixdörf, do Laboratório de Bioquímica Experimental do Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Londrina, pela inestimável ajuda, por haver-me recebido em seu laboratório e pela orientação e apoio nas análises de HPLC.

Ao Prof. Dr. Dachamir Hotza, do Departamento de Engenharia Química, pela inestimável ajuda, por disponibilizar para uso no trabalho o aparelho Termo Haake DC-10 no laboratório CERMAT (Núcleo de Pesquisa em Materiais Cerâmicos e Compósitos) do Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Santa Catarina.

Ao Prof. Dr. André Wüst Zibetti, do Laboratório de Controle de Processos do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, pela inestimável ajuda, por haver-me recebido em seu laboratório e pela orientação na tabulação, interpretação dos dados e análises estatísticas.

Ao Prof. Dr. José Luís Contado, da Universidade Federal de Lavras – MG, pela inestimável ajuda e orientação, cuidado e disponibilidade nas horas difíceis, além da amizade e do constante incentivo.

Ao Prof. Dr. Waldemar Padilha Feltrin e à Profa. Dra. Carla Adriana Schmidt, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus de Medianeira, pela inestimável ajuda e orientação, cuidado e disponibilidade nas horas difíceis, além da amizade e do constante incentivo.

Aos Profs. Drs. Anicleto Poli, Profa. Roseane Fett, Profa. Edna Regina Amante (UFSC), Prof. Dr. Jaime Vilela de Resende (UFLA-MG), Profa. Dra. Marinês Paula Corso (UTFPR-MD) e Profa. Dra. Cristiane Canan (UTFPR-MD), pelo inestimável apoio e orientação.

À Profa. Dra. Flavia Maria Neto (UNICAMP), pela orientação, apoio e amizade.

À Dra. Mirelle Sinfroni Farias, do Laboratório Labioex – UFSC, pela inestimável ajuda nas análises de eletroforese, apoio e orientação.

Às Doutorandas Fabiana Ourique e Valdelúcia Grinevicius, do Laboratório Labioex – UFSC, pela inestimável ajuda nas análises de eletroforese, apoio e orientação.

Ao Doutorando Leonel Vinícius Constantino, da UEL – PR, do laboratório DIA (Laboratório de Desenvolvimento de Instrumentação,

Automação e Metodologia Analítica) da Universidade Estadual de Londrina – PR, pela inestimável ajuda nas análises de HPLC e apoio.

Aos Doutorandos Eduardo, Nádia Mota, Luiza, bolsistas e estagiários do Labioex da UFSC, pela acolhida no seu ambiente laboral (UFSC-SC).

Ao Prof. Dr. Maicon Roberto Kwiecinski, da UNISUL - SC, e Profa. Dra. Tânia Mara Gunther, do Departamento de Bioquímica da UFSC – SC.

Ao funcionário João Correia, do laboratório Labioex (UFSC-SC).

Aos funcionários Luciano Valdemiro Gonzaga, Sérgio, Sr. Bento do CCA (UFSC-SC).

Ao funcionário Tales Márcio de Oliveira, do laboratório de Microscopia (UFLA/MG).

Aos funcionários Chirle Ferreira e Demétrio Gomes Alves, do laboratório de Multiusuários de Estudos em Biologia – LAMBEB II (UFSC- SC).

Aos funcionários Ruth Womer, Ademir Mattana e Elé Womer, da UTFPR – Câmpus de Medianeira.

Aos bolsistas Daiane Corti, Mônica Stobienia e André Andrejewski, da UTFPR – Câmpus de Medianeira.

Aos queridos amigos Eric Batista, Fabiana de Oliveira Martins, Solange Terezinha Carpes, Ornella Maria Porcu, Ellem Waleska Nascimento da Fonseca, Genilso de Proença, Camille de Proença, Leonardo de Proença, Daiane Lenhardt e Ayrton de Melo, obrigada pela amizade, apoio e carinho.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho,

Muito obrigada!

“Há pessoas que desejam saber só por saber, e isso é curiosidade;
Outros, para alcançarem a fama, e isso é vaidade;
Outros, para enriquecerem com a sua ciência, e isso é um negócio torpe;
Outros, para serem edificados, e isso é prudência;
Outros, para edificarem os outros, e isso é caridade”.

São Tomás de Aquino, 1270

PEREIRA, Celeide. Propriedades Funcionais de sorvete de morango diet com adição da enzima lactase e transglutaminase otimizada através da metodologia de superfície de resposta. 2014. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC.

RESUMO

O sorvete é um sistema coloidal complexo composto por uma emulsão constituída de gotículas de gordura, proteínas, bolhas de ar e de cristais dispersos em uma fase aquosa. O produto desejado deve ter alto *overrun* (aeração), textura macia, baixa taxa de derretimento e poucos cristais e açúcar, obtido pela aplicação das enzimas, uma alternativa inovadora e funcional na fabricação de sorvetes. Nesta pesquisa objetivou-se otimizaras condições operacionais da produção de sorvete *diet* de morango pela adição de ingredientes (concentrado proteico de soro de leite e edulcorantes) e das enzimas lactase e transglutaminase, utilizando a metodologia de superfície de resposta para avaliar seus efeitos sob diferentes parâmetros físico-químicos (*overrun*, textura, taxa de derretimento e formação de cristais) e químicos (lactose e proteínas) na formulação do sorvete. A enzima lactase β -galactosidase (EC. 3.2.1.23) é a responsável pela hidrólise de ligações β -galactosídicas da lactose, resultando em sua redução pela conversão em glicose e galactose. Já a enzima transglutaminase (EC 2.3.2.13) apresenta a capacidade de catalisar reações de transferência de grupos acil, formando ligações cruzadas (intra e intermoleculares) entre proteínas, peptídeos e aminas primárias, principalmente ligações covalentes entre resíduos de glutamina e lisina (ligações G-L), aumentando a fração das proteínas de alta massa molar. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar pelo planejamento experimental central composto as condições ideais de temperatura e concentração de transglutaminase e lactase, visando a uma formulação de sorvete *diet* com características físico-químicas adequadas, considerando ainda as propriedades microbiológicas e sensoriais. Para tanto, foram preparadas 18 formulações de sorvetes por processo descontínuo empregando diferentes concentrações das enzimas e temperaturas de incubação, segundo delineamento fatorial 2³, com quatro repetições no ponto central, para averiguar o efeito das enzimas na qualidade do sorvete.

Foram realizadas determinações de: *overrun*, textura, índice de derretimento, reação de polimerização das proteínas do soro de leite pela formação de bandas de proteínas, hidrólise da lactose e enumerações de cristais. Nas análises estatísticas dos resultados das superfícies de contorno empregou-se a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey em 5% de probabilidade para todos os tratamentos. A formação de cristais nos sorvetes foi verificada utilizando ANOVA unicaldal, seguida do teste de Kruskal-Wallis (não paramétrico) e do pós-teste de Dunn comparando todos os tratamentos, em nível de significância de 5%. O planejamento experimental e a análise de desejabilidade auxiliaram-na escolha do tratamento 2 como ideal, empregando as enzimas lactase (0,4 g L⁻¹) e transglutaminase (2,0 U g⁻¹ proteína) a 40 °C. Este foi o tratamento que apresentou melhor textura; alto *overrun*; menor índice de derretimento; formação de bandas de eletroforese de proteínas de alta massa molar evidenciando a formação de polímeros por ligações cruzadas pela ação da enzima transglutaminase; e a atuação mais eficiente da enzima lactase, avaliada pela hidrólise da lactose por determinação cromatográfica, confirmados pela formação de pequenos cristais e açúcar, observados pela micrografia, contribuindo para uma textura mais lisa. Pela análise sensorial, o sorvete elaborado em tais condições foi o que obteve maior aceitabilidade entre os provadores não treinados. Dessa forma, a adição das enzimas lactase e transglutaminase produziu melhora nas propriedades de textura, pelo aumento da cremosidade e suavidade, produzindo um alimento funcional com maior digestibilidade e menos calorias.

Palavras-chave: edulcorantes, *overrun*, textura, micrografia de cristais, eletroforese, HPLC

PEREIRA, Celeide. Functional properties of diet strawberry ice cream with addition of the enzymes lactase and transglutaminase optimized using the surface response methodology. 2014. Thesis (Doctorate in Food Science) – Postgraduate program in Food Science, Federal University of Santa Catarina State, Florianópolis, Santa Catarina State, Brazil.

ABSTRACT

Ice cream is a complex colloidal system comprised of an emulsion consisting of fat droplets, proteins, air bubbles and crystals dispersed in an aqueous phase. The desired product should have a high overrun (degree of aeration), soft texture, slow melting rate and a low amount of crystals and sugar, obtained through the application of enzymes, an innovative and functional alternative used in the production of ice creams. The aim of this research was to optimize the operational conditions for the production of diet strawberry ice cream through the addition of ingredients (milk whey protein concentrate and sweeteners) and enzymes (lactase and transglutaminase), using the response surface methodology to evaluate their effects on different physico-chemical (overrun, texture, melting rate and formation of crystals) and chemical (lactose and proteins) parameters of the ice cream formulation. The enzyme lactase (β -galactosidase (EC 3.2.1.23)) is responsible for the hydrolysis of lactose β -galactoside bonds, resulting in their reduction through conversion to glucose and galactose. The enzyme transglutaminase (EC 2.3.2.13) is able to catalyze acyl transfer reactions, forming cross-links (intra and intermolecular) between proteins, peptides and primary amines, mainly covalent bonds between residues of glutamine and lysine (G-L bonds), increasing the fraction of proteins of high molecular mass. However, the objective of this research was to evaluate, through a central composite experimental design, the ideal conditions of temperature and transglutaminase and lactase concentrations, aimed at obtaining a diet ice cream formulation with suitable physico-chemical characteristics, considering also the microbiological and sensory properties. A total of 18 ice cream formulations were prepared by a discontinuous process employing different concentrations of enzymes and incubation temperatures, according to a 23 factorial design, with four repetitions at the central point, to investigate the effect of the enzymes on the ice cream quality. Analysis was carried out to determine the overrun, texture, melting

index, milk whey protein polymerization reaction through the formation of protein bands, lactose hydrolysis and number of crystals. In the statistical analysis of the results for the response surfaces, analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test (5% probability) was used for all treatments. The formation of crystals in the ice cream samples was verified using one-tailed ANOVA followed by the Kruskal-Wallis test (non-parametric) and the Dunn's post-hoc test comparing all treatments, at the 5% significance level. The experimental design and the desirability analysis aided the selection of the ideal treatment (treatment 2), in which the enzymes lactase (0.4 g L^{-1}) and transglutaminase (2.0 U g^{-1} protein) and a temperature of $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ were employed. This was the treatment which provided the best texture, high overrun, the lowest melting index, formation of electrophoresis bands of proteins of high molecular mass evidencing the formation of polymers through cross-links due to the action of the enzyme transglutaminase and the most efficient action of the enzyme lactase, evaluated through the lactose hydrolysis determined by chromatography, verified by the formation of small crystals and sugar, observed on the micrograph, contributing to a smoother texture. The sensory analysis indicated that the ice cream prepared under these conditions had the greatest acceptability according to the untrained tasters. Thus, the addition of the enzymes lactase and transglutaminase improved the textural properties by increasing the creaminess and smoothness, producing a functional food with greater digestibility and reduced calories.

Keywords: sweeteners, overrun, texture, crystal micrographs, electrophoresis, HPLC

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Reações catalisadas pela enzima transglutaminase	48
Figura 2 - Representação tridimensional da enzima transglutaminase microbiana	50
Figura 3 - Estrutura da enzima transglutaminase	55
Figura 4 - Reação de hidrólise da lactose	60
Figura 5 - Hidrólise da lactose pelo método enzimático	62
Figura 6 - Estrutura química da lactose	71
Figura 7 - <i>Layout</i> do delineamento composto central (CDD) para três variáveis em 5 níveis	85

CAPÍTULO 2

Figura 1 - Fluxograma da formulação do sorvete de morango <i>diet</i> I com concentrado proteico de soro (CPS) e edulcorantes e sorvete com leite em pó integral sem adição de edulcorantes.	116
Figura 2 - Fluxograma de formulação do sorvete de morango <i>diet</i> II com concentrado proteico de soro (CPS) e sorvete com leite em pó. integral, ambas com adição de sucralose/acesulfame-k.....	117
Figura 3 - Fluxograma de fabricação da formulação de sorvete de morango <i>diet</i> I e II por processo descontínuo.	118
Figura 4 - Distribuição das frequências para as cinco formulações de sorvete de morango <i>diet</i> I.....	126

CAPÍTULO 3

Figura 1 - Fluxograma de fabricação de sorvete <i>diet</i> de morango com adição de concentrado proteico de soro (CPS), sucralose/acesulfame-k e enzima lactase e enzima transglutaminase.....	144
Figura 2 - Gráfico da análise da superfície de resposta para o <i>overrun</i> referente às variações da concentração das enzimas transglutaminase e lactase adicionadas às formulações sorvete de morango <i>diet</i> preparadas à temperatura de 20 °C.	154
Figura 3 - Gráfico da análise da superfície de resposta para o <i>overrun</i> referente às variações da concentração das enzimas transglutaminase e lactase adicionadas nas formulações sorvete de morango <i>diet</i> preparadas na temperatura de 30 °C.	157
Figura 4 - Gráfico da análise da superfície de resposta para o <i>overrun</i> referentes variações da concentração das enzimas transglutaminase e enzima lactase adicionadas às formulações sorvete de morango <i>diet</i> na temperatura de 40 °C.	160

Figura 5- Gráfico das análises estatísticas do <i>overrun</i> nos tratamentos T1 a T18 dos sorvetes de morango <i>diet</i>	163
Figura 6 - Gráfico da análise da superfície de resposta para textura referentes às variações da concentração das enzimas transglutaminase e lactase adicionadas às formulações sorvete de morango <i>diet</i> preparadas na temperatura de 20 °C..	165
Figura 7 - Gráfico da análise da superfície de resposta para textura referente às variações da concentração das enzimas transglutaminase e lactase adicionadas às formulações sorvete de morango <i>diet</i> preparadas sob temperatura de 30 °C.	168
Figura 8 - Gráfico da análise da superfície de resposta para textura referente às variações de concentração das enzimas transglutaminase e lactase adicionadas às formulações sorvete de morango <i>diet</i> preparadas sob temperatura de 40 °C.	171
Figura 9 – Gráfico das análises estatísticas da textura nos tratamentos T1 a T18 dos sorvetes de morango <i>diet</i> .	173
Figura 10 - Gráfico da análise da superfície de resposta para a taxa de índice de derretimento referente às variações da concentração das enzimas transglutaminase e lactase adicionadas às formulações de sorvete de morango <i>diet</i> preparadas na temperatura de 20 °C.	175
Figura 11 - Gráfico da análise da superfície de resposta para a taxa de derretimento para a concentração da enzima transglutaminase combinada com diferentes concentrações da enzima lactase adicionadas a sorvete de morango <i>diet</i> na temperatura de 30 °C.	178
Figura 12 - Gráfico da análise superfície de resposta para a taxa de índice de derretimento para a concentração da enzima transglutaminase combinada com diferentes concentrações da enzima lactase adicionadas a sorvete de morango <i>diet</i> na temperatura de 40 °C.	181
Figura 13- Gráfico da análise estatística da taxa do índice de derretimento nos tratamentos T1 a T18 dos sorvetes de morango <i>diet</i> .	183
Figura 14 - Gráfico da análise do desvio de cor (ΔE^*_{ab}) dos tratamentos de sorvete de morango <i>diet</i> , calculado com base nos valores de L^* , a^* e b^* do padrão produzidos a 40 °C.	184
Figura 15 - Gráfico da análise do perfil de desejabilidade.....	186
Figura 16 - Gráficos obtidos com base nos seis atributos avaliados pela escala do ideal nos 3 sorvetes comparados.....	190
Figura 17 - Gráficos obtidos com base nos resultados de avaliação por meio de escala do ideal.....	192
Figura 18 - Gráfico obtido com base nas notas dadas aos produtos segundo a escala hedônica.....	195
Figura 19 - Mapa de Preferência Interno para os tratamentos de sorvete de morango <i>diet</i> onde os tratamentos TP, T02 e TD representam as 3 formulações de sorvete de morango <i>diet</i> avaliados e os números de cada provador com sua respectiva opinião a respeito dos produtos	196

CAPÍTULO 4

Figura 1- Fluxograma das análises das formulações de sorvete de morango <i>diet</i> com adição das enzimas lactase e transglutaminase (T1 - T18) e sem adição de enzimas (TP1- TP18).....	218
Figura 2 - Fluxograma das análises das formulações de sorvete de morango <i>diet</i> com adição da enzima lactase e transglutaminase (TA2, TA4, TA6, TA8), e com adição da enzima lactase (TALC), com adição da enzima transglutaminase (TAT) e sem adição de enzimas (TP).....	219
Figura 3 - Fluxograma de fabricação de sorvete de morango <i>diet</i> com adição de concentrado protéico de soro, sucralose/acessulfame-k e enzima lactase e enzima transglutaminase.....	220
Figura 4 - Eletroforese dos tratamentos dos sorvetes de morango <i>diet</i> com concentrações iguais da enzima lactase, diferentes concentrações da enzima transglutaminase e sem adição das enzimas na temperatura de 40 °C.....	224
Figura 5 - Gráfico das área das bandas (%) dos tratamentos dos sorvetes de morango <i>diet</i> com concentrações iguais da enzima lactase, diferentes concentrações da enzima transglutaminase e sem adição das enzimas na temperatura de 40 °C.....	225
Figura 6 - Gráfico da análise da superfície de resposta para a hidrólise da glicose, referentes as variações da concentração das enzimas transglutaminase e lactase adicionadas nas formulações sorvete de morango <i>diet</i> na temperatura de 20 °C.....	233
Figura 7 - Gráfico da análise da superfície de resposta para a hidrólise da lactose, referentes as variações da concentração das enzimas transglutaminase e lactase adicionadas nas formulações sorvete de morango <i>diet</i> na temperatura de 20 °C.....	235
Figura 8 - Gráfico da análise da superfície de resposta para a hidrólise da glicose, referentes as variações da concentração das enzimas transglutaminase e lactase adicionadas nas formulações sorvete de morango <i>diet</i> preparadas na temperatura de 30 °C.....	237
Figura 9 - Gráfico da análise da superfície de resposta para a hidrólise da lactose, referentes as variações da concentração das enzimas transglutaminase e lactase adicionadas nas formulações de sorvete de morango <i>diet</i> preparadas na temperatura de 30 °C.....	239
Figura 10 - Gráfico da análise da superfície de resposta para a hidrólise da glicose, referente às variações da concentração das enzimas transglutaminase e lactase adicionadas nas formulações sorvete de morango <i>diet</i> preparadas na temperatura de 40 °C.....	241
Figura 11 - Gráfico da análise da superfície de resposta para a hidrólise da lactose, referente às variações da concentração das enzimas transglutaminase e lactase adicionadas às formulações sorvete de morango <i>diet</i> preparadas na temperatura de 40 °C.....	243

Figura 12 - Gráfico da análise da superfície de resposta para a quantidade de cristais (cristais/mm ²), referente às variações da concentração das enzimas lactase e transglutaminase adicionadas às formulações de sorvete de morango <i>diet</i> sob temperatura de 20 °C.....	246
Figura 13 - Gráfico da análise da superfície de resposta da quantidade de cristais (cristais/mm ²) referente às variações da concentração das enzimas lactase e transglutaminase adicionadas às formulações de sorvete de morango <i>diet</i> na temperatura de 30 °C.....	250
Figura 14 - Gráfico da análise da superfície de resposta da quantidade de cristais (cristais/ mm ²) referente às variações da concentração da enzima lactase e da enzima transglutaminase adicionadas às formulações sorvete de morango <i>diet</i> na temperatura de 40 °C.....	254
Figura 15 - Fotomicrografias de esfregaço de sorvete de morango <i>diet</i> nos tratamentos T1 a T18 com concentrações crescentes da enzima lactase e da enzima transglutaminase, em diferentes temperaturas.....	258
Figura 16 - Fotomicrografias de esfregaço de sorvete de morango <i>diet</i> dos tratamentos-padrão TP1 a TP18 sem adição das enzimas lactase e transglutaminase em diferentes temperaturas.....	262
Figura 17 - Fotomicrografias de esfregaço de sorvete de morango <i>diet</i> nos tratamentos TP, TA2, TA4, TA6, TA8, TAT e TALC com concentrações iguais da enzima lactase, diferentes concentrações da enzima transglutaminase e sem adição das enzimas na temperatura de 40 °C.....	266
Figura 18 – Gráfico da análise das análises estatísticas das quantidades de cristais (cristais/mm ²) para os tratamentos TA4, TA6, AA8, TALC, TAT e TP referentes a concentrações iguais da enzima lactase, diferentes concentrações da enzima transglutaminase e sem adição das enzimas na temperatura de 40 °C.....	267

CONCLUSÃO FINAL DA TESE

Figura 1 - Parâmetros para formulação ideal de sorvete.....	283
---	-----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Atividade da enzima transglutaminase – relação entre a temperatura e tempo de reação	53
Tabela 2 - Reatividade da enzima transglutaminase para várias proteínas	54
Tabela 3 - Propriedades de algumas lactases microbianas	61
Tabela 4 - Composição média das caseínas do leite	64
Tabela 5 - Composição média das proteínas do soro	67
Tabela 6 - Poder adoçante relativo e solubilidade de vários açúcares	72
Tabela 7 - Composição físico-química mínima e densidade aparente de sorvetes	76
Tabela 8 - Composição dos concentrados proteicos de soro de leite (CPSs) em pó	81
Tabela 9 - Composição proteica dos concentrados proteicos de soro (CPSs) comerciais	82

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Percentual dos ingredientes utilizados nas cinco diferentes formulações de sorvete de morango <i>diet</i> I	119
Tabela 2 - Percentual dos ingredientes utilizados nas duas formulações de sorvete de morango <i>diet</i> II, adoçadas com sucralose/acessulfame-k, produzidas com leite em pó (F-LP) e concentrado proteico de soro (F-CPSs)	121
Tabela 3 - Resultado das análises microbiológicas do leite pasteurizado padronizado e do creme de leite utilizados na fabricação de sorvete de morango <i>diet</i> I e II	123
Tabela 4 - Resultados das análises microbiológicas das cinco formulações de sorvete de morango <i>diet</i> produzidas com concentrado protéico de soro (CPS) e adição de edulcorantes e leite em pó integral sem adição de edulcorante	124
Tabela 5 - Resultados dos testes sensoriais realizados com os 160 provadores para as cinco diferentes formulações de sorvete de morango <i>diet</i> I avaliadas	125
Tabela 6 - Resultados dos testes sensoriais realizados com os 163 provadores comparando as formulações de sorvete de morango <i>diet</i> adoçadas com sucralose /acessulfame-k, produzidas com leite em pó integral (F2-LP) e concentrado proteico de soro (F2-CPS)	127
Tabela 7 - Resultados das análises físico-químicas do leite pasteurizado e do creme de leite utilizados na fabricação dos sorvetes de morango <i>diet</i> I e II. ...	128
Tabela 8 - Resultados das análises físico-químicas da fabricação de sorvete de morango <i>diet</i> produzido com concentrado proteico de soro (CPS) com adição de edulcorantes e leite em pó integral sem adição de edulcorante	129

Tabela 9 - Resultados das análises físico-químicas da fabricação de sorvete de morango *diet* com adição de sucralose/acessulfame-k, produzido com leite em pó integral (F1-LP) e concentrado proteico de soro (F2-CPS) 131

CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Delineamento experimental (CCD) para elaboração dos sorvetes..	150
Tabela 2 - Dados do planejamento composto central e as respostas: <i>overrun</i> , textura e taxa de derretimento para cada um dos tratamentos (sendo 1º, 2º e 3º os ensaios realizados)	152
Tabela 3 - Resultado das análises microbiológicas dos tratamentos T02, TD e TP	187
Tabela 4 - Resultados médios das notas atribuídas aos diferentes atributos sensoriais avaliados na análise sensorial por meio da escala do ideal de 5 pontos, realizada com o sorvete de morango <i>diet</i> obtido em duas formulações diferentes em comparação com o produto padrão	189
Tabela 5 - Resultados do percentual de concordância das notas atribuídas aos diferentes atributos sensoriais avaliados na análise sensorial por meio da escala do ideal de 5 pontos, realizada com o sorvete de morango <i>diet</i> obtido em duas formulações diferentes em relação ao produto padrão.....	193
Tabela 6 - Resultados médios da avaliação hedônica e do percentual de concordância das notas atribuídas aos três sorvetes <i>diet</i> de morango obtidos em duas formulações diferentes, em comparação com o produto padrão.....	194

CAPÍTULO 4

Tabela 1 - Delineamento experimental para a elaboração dos sorvetes.....	217
Tabela 2 - Relação dos tratamentos de sorvete de morango <i>diet</i> selecionados do delineamento experimental com concentrações iguais da enzima lactase, diferentes concentrações da enzima transglutaminase, e sem adição das enzimas para a análise de eletroforese a temperatura de 40 °C.....	221
Tabela 3 - Porcentagem de glicose e lactose hidrolisada pela enzima lactase adicionadas nos sorvetes de morango <i>diet</i> nas temperaturas de 20, 30 e 40 °C, determinada por CLAE.....	231
Tabela 4 - Porcentagem de glicose e lactose hidrolisada pela enzima lactase em função das concentrações da enzima de transglutaminase adicionadas nos sorvetes de morango <i>diet</i> nas temperaturas de 20, 30 e 40°C, determinada por CLAE	231
Tabela 5 - Porcentagem de glicose e lactose hidrolisada pela enzima lactase em função das concentrações da enzima lactase adicionadas nos sorvetes de morango <i>diet</i> nas temperaturas de 20, 30 e 40°C, determinada por CLAE	232
Tabela 6 - Dados comparativos entre as médias (\pm desvio padrão) das quantidades de cristais em $22.489\mu\text{m}^2$, considerando os tratamentos do sorvete	

de morango <i>diet</i> com concentrações crescentes da enzima lactase e da enzima transglutaminase em diferentes temperaturas	256
Tabela 7 - Dados comparativos entre as médias (\pm desvio padrão) das quantidades de cristais em $22.489\mu\text{m}^2$, considerando os tratamentos-padrão dos sorvetes de morango <i>diet</i> sem adição das enzimas lactase e transglutaminase em diferentes temperaturas	261
Tabela 8 - Dados comparativos entre as médias (\pm desvio padrão) das quantidades de cristais em $22.489\mu\text{m}^2$, considerando os tratamentos de sorvete de morango <i>diet</i> com concentrações iguais da enzima lactase, diferentes concentrações da enzima transglutaminase e sem adição das enzimas na temperatura de $40\text{ }^\circ\text{C}$, referentes aos tratamentos submetidos a análise de eletroforese	265

LISTA DE EQUAÇÕES

CAPÍTULO 3

Equação 1 - Cálculo de <i>overrun</i> (%).....	145
Equação 2 - Cálculo do eixo chroma (C^*).....	147
Equação 3 - Cálculo do desvio da cor.....	147
Equação 4 - Modelo de superfície de reposta de segunda ordem.....	151

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIA - Associação Brasileira da Indústria de Alimentos
ABIS - Associação das Indústrias de Sorvete
ACTIVA TG-B - Mistura de enzima MTG, caseinato de sódio, sacarose, ácido graxo e maltodextrina
ACTIVA TG-BP - Mistura de enzima MTG, proteínas do leite, polifosfato, pirofosfato de sódio e dióxido de silicone
ACTIVA TG-S - Mistura de enzima MTG, lactose, maltodextrina, polifosfato, pirofosfato de sódio e L-ascorbato de sódio
ACTIVA STG – M - Mistura de enzima MTG e amido
ACTIVA MP - Mistura de enzima MTG, lactose e maltodextrina
a. C. - antes de Cristo
ADQ - Análise descritiva quantitativa
ANVISA - Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
ANOVA - Análise de variância
AOAC - *Association of Official Analytical Chemists*
APS - Persulfato de Amônio
A.S - Análise sensorial
APS - Ammonium per Sulfate
BRASEQ - Brasileira de Equipamentos Ltda.
BSA - Albumina de soro bovino
CCA - Centro de Ciências Agrárias
CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CPSs - Concentrado proteico de soro
DEP - Distribuição espectral da potência de soro
DIA - Laboratório de Desenvolvimento de Instrumentação, Automação e Metodologia Analítica
E. C - *Enzyme Commission*
ESD - Extrato seco não gorduroso
EST - Extrato seco total
FAO - *Food and agriculture organization of the United Nations*
G. L – Graus de liberdade
GMP - Glicomacropéptidos
GOS - Galatooligossacarídeos
IDA - Ingestão diária aceitável
IDFA - *International Dairy Foods Association*
ITAL - Instituto Adolfo Lutz
JECFA - *Joining Expert Committee of Food Additions*
KDa - Massa Molecular
LABIOEX - Laboratório de Bioquímica Experimental

LAMAG - Laboratório de Análises Microbiológicas de Alimentos e
Água
MERCOSUR/GMC - Mercado Comum Sul Americano
MEV - Microscópio eletrônico de varredura
MSR - Metodologia de superfície de resposta
MTG - Transglutaminase microbiana
NMP - Número mais provável
NOEL - *No effect level*
OMS - Organização Mundial da Saúde
PAGE - Gel de poliacrilamida
P.C. A - *Plate count agar*
M. M. - Massa molecular
RDC - Resolução de diretoria colegiada
RPM - Rotação por minuto
SAS - *Statistical analysis system*
SDS - Dodecil sulfato de sódio
SNGL - Sólidos não gordurosos do leite
TEMED - *Tetramety ethylenediamine*
TG - Transglutaminase
TGASE - Enzima transglutaminase
T.P.A. - *Texture profile analysis*
UEL - Universidade Estadual de Londrina
UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina
UFLA - Universidade Federal de Lavras
UTFPR - Universidade Tecnológica Federal do Paraná
WHO - *World Health Organization*

LISTA DE SÍMBOLOS

HCl - Ácido clorídrico
(Glu¹³⁴) - Ácido glutâmico
 α -La - Alfa-albumina
 α - Alfa
 α -caseína - Alfa-caseína
 b^* - Amarelo (+) ao azul (-)
(Asp¹³⁰) - Ácido aspártico
 β - Beta
 β -caseína - Beta-caseína
 β -Lg - Beta-globulina
cm - Centímetro
JBR13LcR1 - Código Millipore
FHLCO700 - Código Millipore
CaCl₂ - Cloreto de cálcio
C* - Croma
D - Dextrógiro
 ΔE^* - Diferencial total da cor
 β -galactosidase - enzima lactase
L* - Escala de 0 - 100 do preto ao branco
CIELAB, CIELUV - Espaços de cores uniformes
 $\alpha_{s0}, \alpha_{s1}, \alpha_{s2}, \alpha_{s3}, \alpha_{s4}, \alpha_{s5}$ - Frações da caseína
 γ - Gama caseína
g - Grama
G/L - Grama por litro
°C - Graus celsius
°D - Graus Dornic
h - Hora
Ig's - Imunoglobulinas
 κ - Kapa caseína
M - Lei de potência
L - Litro
G-L - Ligações glutamina e lisina
mg/kg - Micrograma por quilograma
l - Mililitro
 μ L - Microlitro
min - Minuto
nm - Nanometro
N - Normalidade

n. - Número
P.A. - Para análise
 $S\lambda$ - Potência do iluminante
% - Percentagem
pH - Potencial hidrogeniônico
P - Probabilidade
 $R\lambda$ - Radiância do objeto
TAXT2I - Texture analyzer
 H^* - Tonalidade
 μm - Unidade de medida 10^{-6} metro
 U.g^{-1} proteína – Unidade por grama de proteína
(X, Y, Z) - Valores triestímulos
 a^* - Vermelho (+) ao Verde (-)
 μ - micron

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	39
Objetivo Geral	42
Objetivos Específicos	42
CAPÍTULO 1	45
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	45
1.1 ENZIMAS	45
1.2 ENZIMA TRANSGLUTAMINASE	46
1.2.1 Mecanismos de reação	47
1.2.2 Transglutaminase microbiana (MTG)	49
1.2.3 Propriedades da transglutaminase MTG	52
1.2.4 Efeito da transglutaminase nas propriedades funcionais das proteínas do leite	55
1.2.5 Aplicação da transglutaminase em produtos lácteos	58
1.3 ENZIMA β -GALACTOSIDASE OU LACTASE	59
1.4 PROTEÍNAS DO LEITE.....	63
1.4.1 Caseína	64
1.4.2 Proteínas do soro	66
1.4.2.1. β -Lactoglobulina.....	67
1.4.2.2 α -Lactoalbumina.....	68
1.4.2.3 Albumina do soro	69
1.4.2.4 Proteose peptonas	69
1.4.2.5 Imunoglobulinas	69
1.4.2.6 Lactoferrina.....	70
1.4.2.7 Lactoperoxidase	70
1.4.2.8 Lisozima	70
1.5 LACTOSE	70
1.6 SORVETE	74
1.6.1 Processamento dos sorvetes	78
1.7 SORO	79
1.7.1 Concentrado proteico de soro (CPSs)	80
1.8 EDULCORANTE.....	82
1.9 SUPERFÍCIE DE RESPOSTA.....	84

1.10 ANÁLISE SENSORIAL	86
REFERÊNCIAS.....	89
CAPÍTULO 2	109
DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO DE SORVETE DE MORANGO <i>DIET</i> COM ADIÇÃO DE CONCENTRADO PROTÉICO DE SORO, LEITE EM PÓ INTEGRAL E EDULCORANTES: ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS, SENSORIAIS E FÍSICO-QUÍMICOS.....	109
RESUMO	109
2.1 INTRODUÇÃO.....	113
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	115
2.2.1 Materiais.....	115
2.2.2 Matérias-primas.....	119
2.2.3 Elaboração do sorvete	120
2.2.4 Análises microbiológicas	120
2.2.5 Análise sensorial	120
2.2.6 Análises físico-químicas.....	121
2.2.7 Análises estatísticas.....	122
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	122
2.3.1 Avaliação microbiológica	122
2.3.2 Avaliação sensorial	124
2.3.3 Avaliação físico-química	128
2.4 CONCLUSÃO.....	132
2.5 AGRADECIMENTOS	132
REFERÊNCIAS.....	133
CAPÍTULO 3	137
ENZIMAS LACTASE E TRANSGLUTAMINASE: OTIMIZAÇÃO FÍSICA, QUÍMICA EM SORVETE DE MORANGO <i>DIET</i>	137
RESUMO	137
3.1 INTRODUÇÃO.....	141
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	143
3.2.1 Materiais.....	143

3.2.2	Elaboração dos sorvetes	143
3.2.3	Análise de <i>overrun</i>	145
3.2.4	Análise da taxa de derretimento	145
3.2.5	Análises de textura.....	146
3.2.6	Análise de colorimetria.....	146
3.2.7	Análises microbiológicas	147
3.2.8	Análises sensoriais.....	148
3.2.9	Análises físico-químicas.....	149
3.2.10	Delineamento experimental e análise estatística.....	149
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	151
3.3.1	Avaliação do <i>overrun</i>	153
3.3.2	Avaliações da textura.....	163
3.3.3	Avaliação da taxa de derretimento (g/min)	173
3.3.4	Avaliação da colorimetria	184
3.3.5	Otimização.....	185
3.3.5.1	Análise do perfil de desejabilidade	185
3.3.5.2	Comparação das amostras	186
3.3.5.3	Análises microbiológicas	187
3.3.5.4	Análises sensoriais	188
3.4	CONCLUSÃO	197
3.5	AGRADECIMENTOS	198
	REFERÊNCIAS	199
	CAPÍTULO 4.....	209
	OTIMIZAÇÃO ENZIMÁTICA DA LACTASE E DA	
	TRANSGLUTAMINASE E ANÁLISE DOS CRISTAIS	
	FORMADOS NO SORVETE DE MORANGO <i>DIET</i>	209
	RESUMO	209
4.1	INTRODUÇÃO.....	213
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS	215
4.2.1.	Material	215
4.2.2	Matérias-primas.....	215
4.2.3	Delineamento Experimental e Análise Estatística	216

4.2.4	Elaboração dos sorvetes	219
4.2.5	Análises de eletroforese	221
4.2.7	Análises de microscopia	222
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	223
4.3.1	Análises de eletroforese	223
4.3.1.1	Análises de eletroforese dos tratamentos de sorvete de morango <i>diet</i> na temperatura de 40 °C	223
4.3.2	Análises da hidrólise de lactose por cromatografia líquida de alta eficiência	230
4.3.3	Análises de microscopia	245
4.3.3.1	Análises da superfície de resposta para as quantidades de cristais/mm ² nos tratamentos dos sorvetes de morango <i>diet</i> na temperatura de 20 °C	245
4.3.3.2	Análises da superfície de resposta para as quantidades de cristais/mm ² nos tratamentos de sorvetes de morango <i>diet</i> na temperatura de 30 °C são apresentadas na figura 13.	249
4.3.3.3	Análise da superfície de resposta para as quantidades de cristais/mm ² nos tratamentos dos sorvetes de morango <i>diet</i> na temperatura de 40 °C são apresentados na figura 14.	253
4.3.3.4	Análises das quantidades de Cristais/22µm ² nos tratamentos-padrão dos sorvetes de morango <i>diet</i> .	259
4.3.3.5	Análise das quantidades de cristais/mm ² nos tratamentos de sorvetes de morango <i>diet</i> com concentrações iguais da enzima lactase, concentrações diferentes da enzima transglutaminase e sem adição das enzimas na temperatura de 40 °C, que foram submetidos a análise de eletroforese.	263
4.4	CONCLUSÃO	267
	REFERÊNCIAS	271
5.	CONCLUSÃO FINAL DA TESE	283
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	285
6.1	PERSPECTIVAS	285
6.2	AGRADECIMENTOS	286
	APÊNDICES	287
	APÊNDICE A - Ficha para avaliação	289
	APÊNDICE B - Ficha para avaliação	290
	APÊNDICE C - Análise estatística	291
	APÊNDICE D - Análise estatística	292
	APÊNDICE E - Análise estatística	293

APÊNDICE F - Análise estatística.....	294
APÊNDICE G - Análise estatística	295
APÊNDICE H - Análise estatística	296
APÊNDICE I - Análise estatística.....	297
APÊNDICE J - Análise estatística	298
APÊNDICE K - Análise estatística	299
APÊNDICE L - Análise estatística.....	300
APÊNDICE M - Análise estatística	301
APÊNDICE N - Análise estatística	302
APÊNDICE O - Análise estatística	303
APÊNDICE P - Análise estatística.....	304
APÊNDICE Q - Análise estatística	305
APÊNDICE R - Análises físico-químicas	306
ANEXOS	307
ANEXO A - Comprovante de submissão de artigo	309
ANEXO B - Comprovante de submissão de artigo	310
ANEXO C - Submissão de artigo.....	313
ANEXO D - Submissão de artigo.....	314
ANEXO E - Resumo.....	315
ANEXO F - Resumo	316
ANEXO G - Resumo	317
ANEXO H - Resumo	318
ANEXO I - Resumo.....	319
ANEXO J - Parecer de aprovação	320

INTRODUÇÃO

Atualmente, o crescimento das tendências de saúde e bem-estar vem obrigando as indústrias de alimentos a buscarem alternativas que permitam satisfazer as necessidades e superar as expectativas do consumidor moderno (ALVES et al., 2008).

Com o intuito de atender tal necessidade, pesquisadores têm aumentando o interesse pelo desenvolvimento de ingredientes inovadores, como no caso da aplicação de enzimas em alimentos. As enzimas desempenham importante papel na tecnologia de alimentos, uma vez que podem ser utilizadas em praticamente todos os alimentos, promovendo melhorias significativas em diferentes parâmetros de qualidade dos produtos (NEVES; CASTRO; FAZANARO, 2007; PAULA et al., 2010).

A hidrólise da lactose, utilizando a enzima β -galactosidase [lactase. β -D- galactosidase galactohidrolase, EC 3.2.1.23], dá origem a uma mistura isomolecular de glicose e galactose nas condições ideais para a atividade dessa enzima, mantendo um rígido controle sobre a temperatura, pH, tempo de reação e concentração da enzima (GROSOVÁ; ROSENBERG; REBROS, 2008).

O grande potencial da utilização dessa enzima reside nos processos biotecnológicos na indústria de alimentos, por promover diversos benefícios e vantagens, como: produtos com baixo teor de lactose; melhoria da qualidade sensorial de sorvete; e produção de prebióticos, como os galactooligossacarídeos, entre outros (CARMINATTI, 2001; SANTIAGO et al., 2004; OLIVERIA, 2005).

A enzima transglutaminase (EC 2.3.2.13) se caracteriza por sua capacidade de catalisar reações de transferência de grupos acil formando ligações cruzadas intra e intermolecular entre proteínas, peptídeos e aminas primárias, principalmente através de ligações covalentes entre resíduos de glutamina e lisina. (ligações G-L). Através dessas ligações tal enzima pode modificar as propriedades de solubilidade, hidratação, gelificação, coagulação, estabilidade ao calor e propriedades reológicas de proteínas, mudando as propriedades físicas dos alimentos e melhorando seu valor comercial, sendo sua aplicação sugerida na fabricação de queijos, iogurtes e sorvetes, principalmente os de baixa caloria (LORENZEN; SCHILIMME; ROOS, 1998; JAROS et al., 2006).

A elaboração de formulações de sorvetes com a aplicação da enzima transglutaminase permite a produção de um produto com baixas

calorias, sem açúcar, com textura mais macia e mais suave (KURAISHI et al., 2001; JAROS et al., 2006).

A utilização dos edulcorantes representa uma alternativa para melhorar a palatabilidade de alguns produtos. Na composição de sorvetes *diet*, quando se acrescentam edulcorantes, busca-se reduzir o teor de açúcares, ocorrendo uma diminuição muito grande da sacarose. Há vários tipos de edulcorantes liberados para o consumo, entre os quais a sucralose e o acessulfame-k (VERMUNT; SCHAAFSMA; KARDINAAL, 2003; UMBELINO, 2005).

A sucralose é um adoçante não calórico de alto poder adoçante, 600 vezes mais doce do que a sacarose. Os valores de doçura relativa da sucralose dependem do pH, da temperatura e da sua concentração (GRICE; GOLDSMITH; CÂNDIDO, 2000).

O acessulfame-k é um edulcorante não calórico, cerca de 200 vezes mais doce do que a sacarose e sem apresentar gosto residual. Sua toxicidade e carcinogenicidade na reprodução foram estudadas por longo prazo, tendo sido demonstrado que o acessulfame-k é um edulcorante seguro, não metabolizado pelo organismo (MENDONÇA et al., 2005).

Os concentrados proteicos de soro de leite têm sido incluídos nas formulações de sorvetes devido a sua contribuição favorável para as qualidades sensoriais e de textura do produto e ainda fonte alternativa de sólidos não gordurosos do leite (SNGL) de mais baixo custo. (PARSONS; DYBING; CODER, 1985; TIRUMALESHA; JAYAPRAKASHA, 1998). Entre as principais vantagens tecnológicas do uso do concentrado proteico de soro na produção de sorvete destaca-se o uso das proteínas lácteas, que atuam como emulsificante e estabilizante, prevenindo a aglomeração dos glóbulos de gordura e permitindo a estabilidade da aeração durante o congelamento do sorvete (ORDÓÑEZ et al., 2005).

Considerado alimento completo e de elevado valor nutricional, o sorvete é rico em vitaminas A, B1, B2, B6, C, D, E e K, cálcio, fósforo e outros minerais (TRGO, 2003).

O sorvete é considerado uma mistura muito complexa. Do ponto de vista físico-químico, é estruturalmente considerado uma espuma, na qual bolhas de ar estão cobertas por cristais de gelo, glóbulos de gordura individualizados ou parcialmente fundidos e cristais de lactose. A estrutura dos glóbulos parcialmente fundidos e sua união às bolhas de ar dão ao sorvete firmeza residual depois da fusão dos cristais de gelo (CLARKE, 2004, GILLES, GREENLEY; SUTCLIFFE, 2006).

Para obter novas formulações de sorvetes e buscando-se otimizar processos e produtos, tem sido utilizada a metodologia de planejamento fatorial, associada à análise de superfície de resposta. Essa técnica é considerada a mais popular para estudos de otimização da ciência de alimentos, por sua teoria compreensiva, alta eficiência e simplicidade. (ARTEAGA et al., 1994; ALIZADEH; HAMED; KHOSROSHAHI, 2005). Tal metodologia corresponde a um conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas empregadas para modelar e analisar problemas nos quais a resposta de interesse pode ser influenciada pelas variáveis analisadas, com o objetivo de otimizar o processo em desenvolvimento. A principal vantagem é a redução do número de experimentos necessários para fornecer informações suficientes com resultados estatisticamente aceitáveis (RODRIGUEZ-NOGALES, 2006; PINTERITS; ARNTFIELS, 2008).

Assim sendo, este trabalho apresenta vários aspectos relevantes em termos de ciência e tecnologia de alimentos, entre os quais destacam-se as vantagens tecnológicas apresentadas para desenvolver novas formulações de sorvete que possam ser disponibilizados para o consumo, tendo em vista o crescente interesse dos consumidores por produtos mais saudáveis, de qualidade e características desejáveis, tais como melhor sabor, textura, consistência e corpo.

O objetivo deste trabalho foi avaliar, através da metodologia de superfície de resposta, as melhores condições de utilização simultânea das enzimas lactase e transglutaminase no desenvolvimento de sorvete de morango *diet* com vistas a produzir um alimento que seja uma alternativa tecnológica viável com propriedades funcionais compatíveis com perfil de consumidores mais conscientes e exigentes.

Esta tese foi desenvolvida na forma de capítulos, com os seguintes tópicos:

Capítulo 1 – Revisão Bibliográfica

Capítulo 2 – Desenvolvimento da formulação do sorvete de morango *diet* com adição de concentrado proteico de soro, leite em pó integral e edulcorantes: Aspectos microbiológicos, sensoriais e físico-químicos.

Capítulo 3 – Enzima lactase e transglutaminase adicionada em sorvete de morango *diet*: Avaliação das propriedades físicas, químicas e reológicas através da metodologia de superfície de resposta.

Capítulo 4 – Otimização enzimática da lactase e da transglutaminase e análise dos cristais formados no sorvete de morango *diet*

Este projeto foi submetido ao CEP – UFSC (Conselho de ética em pesquisa com humanos) para avaliação, sendo aprovado no dia 10 de março de 2014, sob número CAAE: 22049413.0.0000.0121.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Estudo das características microbianas, físico-químicas e sensoriais da enzima lactase e transglutaminase utilizando a metodologia de superfície de resposta na obtenção das melhores condições para desenvolver novas formulações de sorvete de morango *diet*.

Objetivos Específicos

Determinar as melhores condições de processo (concentração/tempo/temperatura) de atuação da enzima lactase e transglutaminase utilizando a metodologia de superfície de resposta como ferramenta matemática e estatística.

Selecionar dentre os edulcorantes stévia, sucralose/acesulfame-k, sacarina/ciclamato e frutose, o edulcorante mais aceito pelos provadores através de análises sensoriais;

Elaboração de formulação de sorvete de morango *diet* com leite em pó integral e com concentrado proteico de soro de leite e selecionar a melhor formulação através de análises microbiológicas, sensoriais e físico químicas;

Determinar o efeito das enzimas lactase e transglutaminase nas propriedades físico-químicas do sorvete, através da análise de *overrun*, textura, taxa de derretimento e colorimetria;

Avaliar as características sensoriais microbiológicas e físico-químicas da formulação de sorvete com melhor resposta matemática e estatística ao modelo de superfície de resposta;

Determinar a expressão da caseína e outras proteínas sobre a ação da enzima transglutaminase na formação de bandas de proteína no sorvete de morango diet;

Avaliar a atividade da enzima lactase na presença e na ausência da enzima transglutaminase e seus efeitos sobre a microestrutura das formulações;

Avaliar ação enzimática da lactase na presença e na ausência da enzima transglutaminase e seus efeitos sobre a microestrutura das formulações, quantificando os cristais formados na microestrutura do sorvete, averiguando a presença de glóbulos de gordura, micelas de caseína, bolhas de ar e cristais.

CAPÍTULO 1

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 ENZIMAS

As enzimas são catalisadores biológicos de enorme variedade de reações bioquímicas para o sistema vivo. Essas macromoléculas catalisam as transformações químicas que ocorrem no metabolismo celular. Sua atividade catalítica se deve primeiramente à estrutura tridimensional da proteína enovelada, que é determinada pela sequência de aminoácidos que formam a enzima, e pelas interações intermoleculares entre grupamentos dos átomos de aminoácidos e as moléculas dos reagentes (BLANCH; CLARK, 1997).

As enzimas são proteínas globulares solúveis sintetizadas pelos organismos vivos com a finalidade específica de catalisar as reações bioquímicas que, de outro modo, não ocorreriam sob as condições fisiológicas habituais. As vantagens de utilizar enzimas na elaboração de alimentos decorrem de sua capacidade de catalisar determinadas reações, devido à sua grande especificidade, sem causar reações secundárias (ÓRDOÑEZ, 2005).

Diversos fatores afetam a velocidade das reações catalisadas pelas enzimas, dentre os quais se destacam: a concentração da enzima, a concentração de ligantes (substratos, inibidores, ativadores), pH, força iônica e temperatura. A análise de todos esses fatores é importante no conhecimento da natureza da reação enzimática (BLANCH; CLARK, 1997).

Algumas fontes de enzimas podem ser encontradas na natureza, distribuídas entre vegetais, particularmente em amêndoas, pêssego, damasco, maçã, em órgãos animais, como: intestino, cérebro, testículos, placenta e também são produzidas por grande quantidade de microorganismos, como fungos filamentosos, bactérias e leveduras (HOSINGER; LÓPEZ-VEIGA, 1997; ALMEIDA, 2001; GEKAS; SANTIAGO et al., 2004), sendo as leveduras e fungos as fontes preferidas da enzima β -galactosidase para aplicações comerciais (JURADO et al., 2002; SANTIAGO, 2004). Há várias fontes de β -galactosidase, mas nem todas são aceitas ou recomendadas como seguras. A produção de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* e de *Saccharomyces lactis* ou *S. fragilis* é considerada fonte segura de utilização, por sua história de uso e por haver sido submetida a numerosos testes (GEKAS, 1985; TOMÁS, 1998).

A produção comercial de enzimas teve origem com a introdução de glicamilase em 1960, e a seguir com o restabelecimento da hidrólise ácida ou enzimática do amido (BLANCH; CLARK, 1997).

As enzimas têm ampla variedade de aplicação nas indústrias químicas, de alimentos e farmacêuticos. Também são extensivamente utilizadas para fins analíticos.

Enquanto alguns processos envolvem o uso de enzima em grande escala, outros requerem uma quantidade modesta (MACEDO, 2004).

A utilização de enzimas para modificar as propriedades funcionais de proteínas é promissora na indústria de alimentos. A grande vantagem do uso de enzimas comparado com outros agentes é a sua especificidade e o fato de serem efetivas em baixas concentrações. As enzimas proteolíticas promovem a hidrólise parcial da proteína, alterando suas propriedades funcionais, como solubilidade, emulsificação, geleificação, viscosidade, hidratação, sabor e outros (MAHAJAN; DUA, 1998).

A enzima transglutaminase microbiana (TGs) tem a propriedade de atuar sobre diversas proteínas, como globulinas de soja, glúten, caseínas, actina e miosina e em proteínas de ovos, com a mesma eficiência da enzima de mamíferos. É ampla a potencialidade para aplicá-la em indústrias de alimentos, como de carnes, embutidos, laticínios e produtos derivados de soja e pescado (YOKOYAMA et al., 2004; HUINONG et al., 2005). O aumento da escala de produção dessa enzima é fundamental para aprimorar o rendimento do processo e redução de custos, elevando a viabilidade de sua aplicação industrial (HUINONG et al., 2005).

1.2 ENZIMA TRANSGLUTAMINASE

As TGs foram primeiramente introduzidas em 1959 para descrever enzimas responsáveis pela atividade de transaminação em fígados de porquinhos-da-índia. Pesquisas sobre a aplicação de TGs começaram pelo isolamento de enzimas de tecidos de mamíferos e de fluidos corpóreos. TG do fígado de porquinhos-da-índia era a única TG comercialmente disponível até o final dos anos 80. Embora seu uso como melhorador de textura em alimentos estivesse sendo discutido, sua fonte escassa e o complicado processo de purificação encareciam significativamente a enzima, resultando em baixo interesse para potenciais aplicações industriais. Adicionalmente, a TG requeria íon cálcio para ativá-la, o que levava à precipitação de proteínas em alguns

alimentos com caseína, globulina de soja ou miosina (JAROS et al., 2006).

As TGs estão largamente distribuídas na maioria dos tecidos animais e fluidos corpóreos e envolvem vários fenômenos biológicos, como coagulação do sangue, cicatrização de ferimentos, queratinização epidérmica e endurecimento da membrana eritrócita. As TGs são responsáveis pela regulação do crescimento e diferenciação e proliferação celular. Transglutaminases também são encontradas em plantas, peixes, e micro-organismos (MOTOKI; SEGURO, 1998). No sangue de humanos transglutaminase é conhecida como fator XIII, um dos responsáveis pela coagulação sanguínea (KURASHI, YAMAZAKI; SUSU, 2001)

Os estudos da aplicação dessa enzima em alimentos começaram com a transglutaminase extraída de mamíferos; no entanto, recentemente foi isolada a transglutaminase de origem microbiana (MTG), produzida em grande escala por fermentação. A transglutaminase derivada de micro-organismos (MTG) é geralmente muito utilizada na indústria de alimentos (FOLK, 1980; ANDO et al., 1989; KURASHI, 1996).

A enzima transglutaminase microbiana (TGs) tem a propriedade de atuar sobre diversas proteínas, como globulinas de soja, glúten, caseínas, actina e miosina e em proteínas de ovos, com a mesma eficiência da enzima de mamíferos. É ampla a potencialidade para aplicá-la em indústrias de alimentos, como de carnes, embutidos, laticínios e produtos derivados de soja e pescado (YOKOYAMA et al., 2004; HUINONG et al., 2005). O aumento da escala de produção dessa enzima é fundamental para aprimorar o rendimento do processo e redução de custos, elevando a viabilidade de sua aplicação industrial (HUINONG et al., 2005).

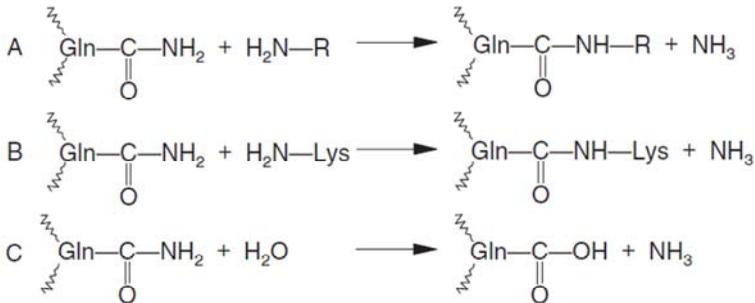
1.2.1 Mecanismos de reação

A Transglutaminase TG (EC 2.3.2.13) é uma transferase que catalisa a reação de acil-transferência entre resíduos de proteína, ou seja, ao contrário da maioria das enzimas que hidrolisam o substrato em pequenos compostos, como amilases e proteases, a transglutaminase catalisa a polimerização de pequenos substratos proteicos em moléculas maiores. A transglutaminase forma ligações covalentes – crosslinks – entre resíduos dos aminoácidos Glutamina e Lisina (ligações G-L). Ela catalisa reação de acil transferência entre o grupo γ -carboxilamida da glutamina ligada a peptídeos (doador de acil) e aminas primárias

(receptores de acil), incluindo o grupo ϵ -amino de resíduos de lisina em proteína. Quando o grupo ϵ -amino de lisina ligada a proteína age como um acil receptor, ligações cruzadas covalentes, chamadas de cross-linking, intra e/ou intermoleculares são formadas (ligação isopeptídica (glutamil-lisina), resultando na polimerização de proteínas (LORENZEN; SCHILIMME; ROOS, 1998; JAROS et al., 2006).

Como resultado da ligação cruzada dos resíduos de glutamina e lisina de ligações peptídicas, são formadas ligações isopeptídicas ϵ -(γ -glutamil) lisina polímeros de alto peso molecular (HINZ et al., 2007). As ligações dentro de e entre proteínas catalisadas pela TG permitem modificar sua estrutura em nível molecular, o que afeta as propriedades funcionais dessas proteínas, possibilitando novas formações estruturais (MOTOKI; SEGURO, 1998). A estrutura molecular original das proteínas determina se a ligação cruzada por TG é possível e em que extensão (HAN; DAMODARAN, 1997). Na figura 1, são apresentadas as reações catalisadas pela TG.

Figura 1 - Reações catalisadas pela enzima transglutaminase.



(A) Reação de acil transferência; (B) Reação de ligação cruzada entre resíduos proteicos de glutamina e lisina (Reação cross-linking; (C) Deamidação

Fonte: Kuraishi et al. (1996).

Nos sistemas alimentícios que contêm proteínas, a reação de ligação cruzada (B) (figura 1) ocorre antes das outras reações. As ligações ϵ -(γ -Glu)-Lys (inter e intramolecular) são covalentes, portanto mais estáveis do que as ligações iônicas e hidrofóbicas. Essas ligações causam mudanças significativas nas propriedades dos alimentos que contêm proteínas, e mesmo em pequenas quantidades tais ligações têm um efeito significativo nas propriedades dos alimentos (KURAISHI;

SAKAMOTO; SOEDA, 1996; KURAISHI; YAMAZAKI; SUSA, 2001), alterando drasticamente a funcionalidade das proteínas (MOTOKI; SEGURO, 1998). As ligações cruzadas covalentes de proteínas catalisadas por TGs podem causar mudanças dramáticas no tamanho, conformação, estabilidade e outras propriedades das proteínas (TRUONG et al., 2004).

A capacidade da TG de introduzir ligações cruzadas inter e intraproteínas tem sido aplicada para aumentar o valor e as propriedades nutricionais e funcionais de proteínas de alimentos (CHISTENSEN et al., 1996; JAROS et al., 2006). As proteínas mais comumente modificadas pela TG são as provenientes do leite bovino (O' SULLIVAX; KELLY; FOX, 2002; WROBLEWSKA et al., 2008; ZHANG, H. et al., 2009;) da soja (BABIKER, 2000; WALSH et al., 2003) e do glúten (AGYARE; XIONG; ADDO, 2008).

Através dessas reações, a TG pode modificar as propriedades de solubilidade, hidratação, gelificação, coagulação e estabilidade ao calor, e propriedades reológicas de proteínas (DICKINSON; YAMAMOTO, 1997; LORENZEN; SCHLIMME, 1998; MOTOKI; SEGURO, 1998; LORENZEN, 2000). Existem patentes sobre a aplicação da TG na modificação de produtos cárneos, pescados, de panificação, derivados de soja e laticínios (DE JONG; KOPPELMAN, 2002; JAROS et al., 2006).

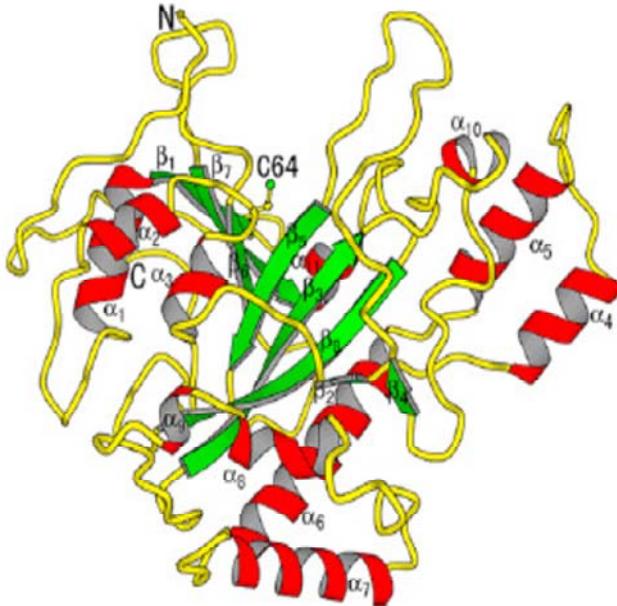
1.2.2 Transglutaminase microbiana (MTG)

O estudo da transglutaminase derivada de micro-organismos iniciou-se em 1989, quando foi descoberta a principal espécie de micro-organismo produtor da transglutaminase (*Streptoverticillium mobaraense*). Para produzir a transglutaminase, o processo de fermentação exige fontes de carbono (glicose, sacarose, amido, glicerina, dextrina) e de nitrogênio orgânico e inorgânico (ureia, aminoácidos, NaNO₃), minerais e vitaminas. A cultura deve ser agitada para incorporação de ar, porque o processo de fermentação é aeróbio.

O crescimento do micro-organismo e produção de MTG demandam temperatura entre 25 e 35 °C; o tempo de fermentação depende das condições do meio da cultura e é determinado pela maior atividade da transglutaminase que pode ser alcançada normalmente entre 2 e 4 dias. A MTG é uma enzima extracelular dissolvida no caldo de fermentação, daí ser necessário purificar a enzima utilizando álcool ou solventes orgânicos, processos de ultrafiltração, entre outros métodos, para recuperar a MTG pura no final do processo. A MTG pode ser

misturada com estabilizantes de enzima com vários sais, açúcares, proteínas, lipídeos e surfactantes (ZHU et al.,1995). Na figura 2, é apresentada a estrutura tridimensional da transglutaminase microbiana.

Figura 2 - Representação tridimensional da enzima transglutaminase microbiana.



Fonte: Yokoyama, Nio e Kikuchi (2004)

A representação tridimensional da MTG está organizada predominantemente em segmentos desenrolados (Amarelo), alguns trechos em folha pregueada (Verde) e segmentos em α -hélice (Vermelho-representados por espirais). A empresa Ajinomoto detém a patente mundial para produzir a transglutaminase microbiana (MTG) para aplicação em alimentos. No Brasil, sua utilização ainda é restrita aos setores de carnes, frutos do mar e farináceos, sendo menos conhecidas suas possibilidades de aplicação em produtos lácteos. A enzima transglutaminase empregada em alimentos recebe o nome de ACTIVA TG, em vários tipos de preparações que diferem segundo o tipo de aplicação a que se destina, como por exemplo:

a) Para carnes e embutidos:

- ACTIVA[®] TG-B; ACTIVA[®] TG-BP; ACTIVA[®] TG-S: mistura de enzima MTG, caseinato de sódio, sacarose, ácido graxo e maltodextrina, proteínas do leite, polifosfato, pirofosfato de sódio e dióxido de silício, lactose, L-ascorbato de sódio. É utilizada para emulsionados em geral, presuntos e injetados em geral, principalmente para carnes reestruturadas e embutidos.

b) Massas:

- ACTIVA[®] STG-M: mistura de enzima MTG e amido. É utilizada em massas em geral como: massas secas e frescas, pães e massas de pizza, entre outros.

c) Leite e derivados:

- ACTIVA[®] TG-MP: mistura de enzima MTG, lactose e maltodextrina. É utilizada em produtos derivados de leite, como iogurtes e queijos.

As ligações G-L formadas pela transglutaminase causam efeitos significativos nas proteínas, mudando as propriedades físicas dos alimentos. A seguir, algumas mudanças na estrutura proteica produzidas pela adição da transglutaminase (KURAISHI et al., 1996).

- Capacidade de gelificação: em soluções proteicas não formadoras de gel, o uso de TG pode reverter essa situação. No caso de soluções (suspensões) que formam gel com auxílio de MTG, o gel fica ainda mais firme. A força de ruptura do gel varia com o aumento do número de ligações ϵ -(γ -Glu) Lys. O excesso de MTG causa um decréscimo na força do gel, deixando-o mais fraco e perdendo sua capacidade de retenção de água, podendo ocorrer a sinerese. O excesso de ligações ϵ -(γ -Glu) Lys pode inibir o desenvolvimento uniforme da rede proteica (KURAISHI et al., 1996).
- Viscosidade: quando a proteína é polimerizada e aumenta sua massa molecular, a solução normalmente apresenta um aumento na sua viscosidade (NIELSEN, 1995).

- Estabilidade térmica: as ligações covalentes formadas pela MTG são termicamente estáveis, aumentando a estabilidade térmica do alimento que a recebe (NIELSEN, 1995; KURAIISHI *et al.*, 1996).
- Capacidade de retenção de água: o gel formado por ligações ϵ -(γ -Glu) Lys retém mais água. Mesmo a 2 % de concentração proteica, o gel de gelatina, por exemplo, consegue adquirir uma boa estabilidade com o uso da MTG; géis alimentícios com boa capacidade de retenção de água podem ser produzidos sem adição de gelatina (KURAIISHI *et al.*, 1996).

1.2.3 Propriedades da transglutaminase MTG

De acordo com Ando et al. (1989), a massa molecular da MTG, avaliada por SDS-PAGE, é em torno de 40 kDa, e seu ponto isoelétrico é 8,9, com faixa de pH ótimo, entre 5 e 8. Entretanto, a MTG mostra alguma atividade em pH 4 e 9, sendo estável em larga faixa de pH. A TG de origem microbiana é amplamente utilizada como enzima funcional em vários setores da indústria de alimentos devido à baixa especificidade de substrato e possibilidade de obtê-la em grande quantidade por baixo custo, através do processo de fermentação (JAROS et al., 2006).

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

Na Tabela 1, são apresentados os tempos necessários para as reações em temperaturas diferentes para obter o mesmo resultado de uma reação a 50 °C por 10 minutos em pH 6,0.

A MTG possui especificidade de substrato mais baixa do que a obtida de animais (ANDO et al., 1989). A maioria dos alimentos com proteínas, como as globulinas de leguminosas, glúten de trigo, gema e clara de ovo, albuminas, miosinas, fibrinas, caseínas, α -lactalbuminas e β -lactoglobulinas pode formar ligações cruzadas (NONAKA et al., 1989; YOKOYAMA, NIO; KIKUCHI, 2004).

Tabela 1 - Atividade da enzima transglutaminase – relação entre a temperatura e tempo de reação.

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

Fonte: Ando et al. (1989)

Proteínas com muitas estruturas aleatórias, como a caseína e a gelatina, são bons substratos para a MTG. Proteínas com muitos resíduos de lisina e glutamina, como as proteínas de soja e de trigo, são também bons substratos. A reatividade das proteínas pode, muitas vezes, ser otimizada por aquecimento ou mudança de pH para desnaturar parcialmente a conformação do substrato. Os diferentes substratos também apresentam diferentes temperaturas, concentração enzimática, pH e tempos de incubação ótimos (SAKAMOTO; KUMAZAWA; MOTOKI, 1994). Na Tabela 2, é apresentada a reatividade da MTG para vários substratos.

Tabela 2 - Reatividade da enzima transglutaminase para várias proteínas.

Alimento	Proteína	Reatividade
Leite	Caseína	◉
	Caseína de sódio	◉
	α -lactalbumina	○
	β -lactoglobulina	Δ
Ovos	proteína da clara	Δ
	proteína da gema	○
Carnes	Mioglobina	Δ
	Colágeno	○
	Gelatina	◉
	Miosina	◉
	Actina	X
Soja	Globulina 11S	◉
	Globulina 7S	◉
Trigo	Gliadina	○
	Gluteína	○

◉: reage muito bem ○: reage bem Δ : reage dependendo das condições x: em geral não reage

Fonte: Sakamoto, Kumazawa e Motoki (1994); Sharma, Lorenzen e Qvist (2001).

A MTG tem estrutura monomérica, com 331 aminoácidos e com uma sequência muito diferente da derivada de tecido de mamífero. Contém um único resíduo de cisteína com um grupo tiol livre que é essencial para sua atividade catalítica, indicando que a MTG faz parte da família das tiol-proteases. A sua análise estrutural sugere que ela tenha uma conformação globular, típica de proteínas secretoras, e sua hidropatia indica que a enzima é hidrofílica, mas com muitas regiões hidrofóbicas distribuídas em intervalos específicos ao longo da cadeia

(KANAJI et al., 1993). Na figura 3, é apresentada a estrutura primária da MTG com o possível resíduo ativo da cisteína.

Figura 3 - Estrutura da enzima transglutaminase; (*) indica o possível resíduo ativo da cisteína.



Fonte: Motoki e Seguro (1998)

1.2.4 Efeito da transglutaminase nas propriedades funcionais das proteínas do leite

Indústrias alimentícias de todo o mundo estão em busca de ingredientes ou produtos lácteos com novas características físicas e funcionais, com vistas a alterar as propriedades dos produtos lácteos pela modificação das proteínas do leite utilizando a transglutaminase (SHARMA; LORENZEN; QVIST, 2001; RODRIGUEZ-NOGALES, 2006). Dentre as proteínas do leite destacam-se as caseínas (COZZOLINO et al., 2003; O'CONNELL; KRUIF, 2003), consideradas bons substratos para a transglutaminase. A incubação de soluções de β - e κ - caseínas com transglutaminase leva à formação de ligações intramoleculares nas micelas de caseína, sendo o efeito das ligações cruzadas mais pronunciado na κ -caseína (KRUIF et al., 2002). A maior reatividade das κ -caseínas se deve a sua localização na superfície da micela; além disso, os macropéptídeos das κ -caseínas são muito acessíveis ao ataque da transglutaminase (RODRIGUEZ-NOGALES, 2005).

A forte reatividade da κ -caseína já foi esclarecida pela sua posição externa na micela de caseína, cuja estrutura permite o acesso da transglutaminase à β -caseína, mais acessível que a α -caseína

(SHARMA; LORENZEN; QVIST, 2001). Enquanto a β -caseína apresenta estrutura aberta, desordenada e flexível, a α -caseína forma estrutura fechada, dificultando a ação da transglutaminase (RODRIGUEZ-NOGALES, 2005).

Os resíduos de glutamina localizados na região N-terminal (hidrofílica) da β -caseína são preferencialmente modificados pela transglutaminase, sendo a especificidade à região N-terminal dos resíduos de glutamina da β -caseína consequência da exposição ao solvente ou da carga dos aminoácidos adjacentes à glutamina. Quando incubada a 35°C por 100 minutos, a região N-terminal hidrofílica da β -caseína torna-se disponível no solvente aquoso, ocorrendo polimerização pela transglutaminase (O'CONNEL; KRUIF, 2003). As alterações associadas à transglutaminase nas propriedades físico-químicas da β -caseína podem representar aumento na hidrofobicidade da molécula e estabilidade do cálcio das micelas de β -caseína tratadas com transglutaminase.

A formação de gel induzido pela transglutaminase é possível pela polimerização enzimática de micelas de caseína (SCHORSCH; CARRIE; NORTON, 2000a). O gel de proteínas do leite se forma tradicionalmente pelo tratamento de caseína com ácido ou enzima proteolítica (renina), ou por desnaturação térmica das proteínas do soro. Outra alternativa seria a polimerização enzimática das moléculas de proteína, produzindo uma rede de ligações covalentes. Devido às diferentes ligações cruzadas formadas, espera-se que a rede proteica apresente propriedades reológicas completamente diferentes do gel de proteínas de leite convencional (DICKINSON; YAMAMOTO, 1996).

As caseínas nativas, altamente hidratadas e de grande volume, são encontradas no leite (pH 6,8) como micelas coloidais em associação com fosfato de cálcio. Quando a transglutaminase é adicionada ao leite não ocorre a formação de gel, sugerindo que tal incapacidade se deva à repulsão eletrostática e/ou estérica entre as moléculas de κ -caseína na superfície. Espera-se o efeito da transglutaminase quando a estabilização eletrostática e/ou estérica das proteínas é removida, como, por exemplo, pela acidificação do leite (SCHORSCH, CARRIE; NORTON, 2000b).

As proteínas do soro de leite – β -lactoglobulina e α -lactoalbumina – tendem a formar reações cruzadas menos efetivas com a transglutaminase por apresentarem estrutura globular. Estudos mostram que a adição de agentes redutores ao sistema facilita a reação das proteínas com a transglutaminase por manter o sítio ativo sulfidril no estado reduzido, aumentando o acesso da enzima aos grupos NH₂

(KURAIISHI, YAMAZAKI; SUSA, 2001; WILCOX; SWAISGOOD, 2002).

A transglutaminase produz ligações cruzadas que reduzem a exposição das moléculas hidrofóbicas mediante impedimento estérico e a formação de moléculas compactas, o que afeta as interações físicas entre as proteínas, diminuindo a viscosidade da solução (LORENZEN; SCHILIMME; ROOS, 1998; JAROS et al., 2006).

A susceptibilidade das proteínas de leite desnatado à reação cruzada com transglutaminase, avaliada por eletroforese capilar após seu aquecimento a 85 °C por 15 minutos, demonstra a polimerização enzimática das proteínas do soro pela diminuição da área do pico obtido pela eletroforese. A α -lactoalbumina reage tanto no leite aquecido quanto no leite que não sofreu o processo de pré-aquecimento. A β -lactoglobulina reage com a transglutaminase somente quando o leite é submetido ao tratamento térmico (SHARMA; LORENZEN; QVIST, 2001).

As modificações nos resíduos de glutamina e lisina da α -lactoalbumina após a reação enzimática com transglutaminase microbiana ocorre em no máximo cinco lisinas e cinco glutaminas, dependendo da temperatura, pH, presença e ausência de cálcio. Cinco glutaminas (39, 43, 54, 65 e 117) e cinco lisinas (5, 13, 16, 108 e 114) estão disponíveis para modificação por transglutaminase na apo- α -lactoalbumina, enquanto que nenhuma glutamina e quatro lisinas (13, 16, 108, 114) estão disponíveis na holo- α -lactoalbumina (NIEUWENHUIZEN et al., 2003). A polimerização das proteínas pela transglutaminase é afetada pela disponibilidade dos resíduos de glutamina e lisina na superfície da proteína, como também pode ser potencialmente influenciada pela compatibilidade termodinâmica da mistura de substratos proteicos pelo centro ativo da enzima (HAN; DAMODARAN, 1996).

A estabilidade térmica do leite é sensível a vários fatores de sua composição (pH, sais e proteínas do leite) e processos de tratamento (pré-aquecimento, concentração, homogeneização) que podem causar coagulação parcial ou completa durante o processamento, ou gelificação durante o armazenamento (SINGH; 1992 apud O'SULLIVAN, KELLY; FOX, 2002). O tratamento de proteínas com transglutaminase pode modificar suas propriedades de hidratação, gelificação, reologia, emulsificação e estabilidade térmica (FAERGEMAND; OTTE; QVIST, 1998; PIETRASIK, 2003; ANEMA et al., 2005), por incorporação de aminas, ligações cruzadas e reações de desaminação (MOTOKI; SEGURO, 1998).

O tratamento do leite com transglutaminase afeta sua estabilidade térmica. No leite cru, a formação de ligações cruzadas entre as caseínas individuais é responsável por evitar a dissociação da κ -caseína das micelas em valores de pH na região de mínima estabilidade. Em leites pré-aquecidos, antes da incubação com transglutaminase, a desnaturação das proteínas do soro pode permitir a formação de ligações cruzadas pela transglutaminase entre as proteínas desnaturadas do soro e as caseínas individuais que (em combinação com as ligações cruzadas das caseínas) contribuem para o melhoramento da estabilidade térmica do leite em $\text{pH} > 6,5$ (O'SULLIVAN; KELLY; FOX, 2002). O tratamento enzimático com transglutaminase para gerar géis ácidos a partir de leite produz gel com maior rigidez e tensão de quebra e menor permeabilidade que o leite não-tratado, indicando que a introdução de ligações covalentes cruzadas na rede de proteínas modifica marcadamente a estrutura do gel ácido (ANEMA et al., 2005).

1.2.5 Aplicação da transglutaminase em produtos lácteos

Na área de laticínios, a TG tem sido aplicada em iogurtes, queijos e sorvetes. A formação de ligação cruzada nas proteínas do leite pode aprimorar as propriedades tecnológicas e funcionais relacionadas a textura, formação do gel e redução da sinérese no produto final (JAROS et al., 2006).

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

A incorporação de até 2 g de proteínas do soro de leite ao coágulo do queijo pela adição da transglutaminase não altera a textura nem deforma o produto final (COZZOLINO et al., 2003).

Lorenzen et al. (2002) verificaram que iogurte tratado com TG apresentou aumento de firmeza, viscosidade e cremosidade em relação às amostras não tratadas com a enzima, além de maior capacidade de ligação com a água, que resultou em redução da sinérese. Com relação às propriedades sensoriais, os iogurtes tratados com TG apresentaram menor acidez, além de sabor e odor menos intensos do que os das amostras controle. O uso da TG reduziu a sinérese e melhorou a estabilidade térmica de queijos processados e de sorvetes, além de

conferir maior maciez, principalmente em produtos de baixa caloria e sem açúcar (KURASHI et al., 2001; JAROS et al., 2006).

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 (sem enzima) e de 25,8 % com o tratamento enzimático (3 U/g). A polimerização intermolecular das caseínas induzidas por transglutaminase melhora a gelificação, produzindo mudanças significativas nas propriedades funcionais das proteínas do leite (LAUBER, HENLE; KLOSTERMEYER, 2000).

Na fabricação de 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; KURASHI; YAMAZAKI; 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 (O'KENNEDY, 2003).

A enzima transglutaminase também tem potenciais aplicações comerciais como aditivo para alimentos, capaz de melhorar a estabilidade do leite (O'SULLIVAN; KELLY; FOX, 2002), conferindo resistência à coagulação em temperaturas de esterilização ou gelificação durante o armazenamento. Na ligação enzimática tem também aplicações em potencial no controle da estabilidade das proteínas do leite contendo emulsões e espumas (DICKINSON; YAMAMOTO, 1996).

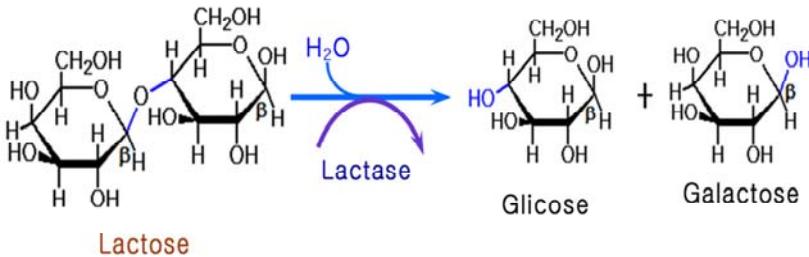
O enriquecimento da matéria seca (sólidos totais) e/ou conteúdo proteico, como também a adição de hidrocoloides (como gelatina e amido), são maneiras comuns de evitar problemas como a sinérese no processamento de iogurte (LORENZEN et al., 2002). A polimerização das cadeias de proteínas do leite para a estabilização da rede tridimensional do iogurte surge como nova tecnologia na prevenção de problemas comuns no processamento de produtos lácteos.

1.3 ENZIMA β -GALACTOSIDASE OU LACTASE

A enzima β -galactosidase (EC. 3.2.1.23) (Lactase) é a responsável pela hidrólise de ligações β -galactosídicas, como a que está presente na lactose. O resultado dessa hidrólise é uma molécula de glicose e outra de galactose (figura 4), que são açúcares com maior poder adoçante, mais facilmente digeridos e, além disso, são mais

solúveis do que a lactose e, por esse motivo, menos propensas a cristalização (GROSOVÁ; ROSENBERG; REBROS, 2008).

Figura 4 - Reação de hidrólise da lactose.



Segundo SHUKLAL, citado por Carminatti (2001), as possíveis fontes de lactase são: plantas, como pêssego, amêndoa e algumas espécies de rosas selvagens; organismos animais, como intestino, cérebro e tecido da pele; leveduras como *Kluyveromyces lactis*, *K. fragilis* e *Candida pseudotropicalis*; bactérias como *Escherichia coli*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Bacillus sp* e *Streptococcus lactis*; e fungos, como *Aspergillus foetidus*, *A. niger*, *A. oryzae* e *A. phoenecis*. Na Resolução RDC n. 348/2003b, a legislação brasileira especifica que a enzima lactase utilizada na indústria de alimentos deve ser de origem microbiana, proveniente da levedura *Kluyveromyces lactis*. Microrganismo bem conhecido e usado na produção de certos tipos de iogurte, essa levedura foi descrita pela primeira vez por Beijerinck em 1889.

As enzimas de leveduras do gênero *Kluyveromyces lactis* são ativas a pH neutro e, portanto, convenientes para a hidrólise do leite e do soro doce. Menos estáveis que as fúngicas, devem ser usadas somente em temperaturas moderadas. São completamente dependentes de metais como Mn, Mg e K (cofatores necessários). Os metais e as enzimas são envolvidos numa reação reversível que forma um complexo enzimático. Esse complexo enzima-íon metálico é 50 % mais ativo do que a enzima sozinha (LADERO et al., 2000; VIEIRA, 2009); há relatos de que enzimas desse gênero são inibidas na presença de produtos da reação (MATEO et al., 2007; VIEIRA, 2009).

As lactases apresentam diferenças marcantes em várias de suas propriedades, como resultado das diferentes fontes de obtenção,

conforme pode ser observado na tabela 3, e de acordo com o método de preparação comercial (GEKAS; LOPEZ-LEIVA, 1985).

Tabela 3 - Propriedades de algumas lactases microbianas.

Fonte	pH ótimo	pH estabilidade	Cofatores necessários	Temperatura ótima (°C)	Massa molecular (Kda)
<i>Aspergillus Niger</i>	3-4	2,5-8	Nenhum	55-60	124000
<i>Aspergillus oryzae</i>	4,5	3,5-8	Nenhum	50-55	90000
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	6,6	6,5-7,5	Mn+2, K+	37	201000
<i>Kluyveromyces lactis</i>	6,9-7,3	7-7,5	Mn+2, Na+	35	135000
<i>Escherichia coli</i>	7,2	6-8	Na+, K+	40	540000
<i>Lactobacillus thermophilus</i>	6,2	N.d.	N.d.	55	540000
<i>Leuconostox citrovorum</i>	6,5	N.d.	Nenhum	60	N.d.

Fonte: Mariotti (2000)

A lactase age sobre a lactose presente no leite, quebrando suas ligações e produzindo D-glicose e D-galactose, que são açúcares mais solúveis e de mais rápida absorção. Durante a reação é usada uma molécula de água. Na hidrólise da lactose, merece especial atenção a influência da temperatura, do pH, do tempo de reação e da concentração da enzima, pois esses fatores determinam a velocidade da reação (EVANGELISTA, 1998; GIST-BROCADES, 2004; PROZYN, 2004).

É um processo promissor para a indústria de alimentos porque possibilita o desenvolvimento de novos produtos sem lactose em sua composição (LONGO, 2006), ou com reduzido teor desse carboidrato, para pessoas com intolerância à lactose, além de prevenir a cristalização da lactose na produção de sorvetes, produtos fermentados como o iogurte, leite condensado e doce de leite (CARMINATTI, 2001; SANTIAGO et al., 2004; OLIVERIA, 2005).

A lactase é empregada na elaboração de produtos lácteos como o doce de leite e o leite sem lactose ou com baixo teor de lactose. No caso do doce de leite, a lactase minimiza os problemas de arenosidade

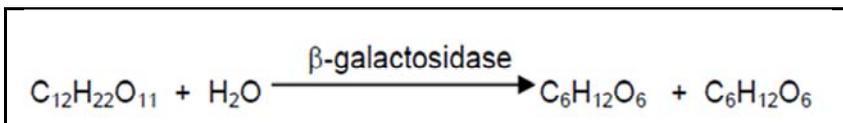
causada pela cristalização da lactose. A enzima pode atuar também na produção de cremes para evitar a formação de cristais de lactose e hidrolisar a lactose do soro, para formar açúcares de maior poder adoçante e de maior solubilidade (EVANGELISTA, 1998; VITOLLO, 2001; ANDRADE; BRANDÃO; ALVIM, 2004). A temperatura ótima é de até 40 °C, mas essa temperatura é ideal para proliferação de microrganismos patogênicos no leite. Portanto, o tempo de reação não deve ultrapassar 4 horas (KOCIÁN, 1988; PROZYN, 2004).

Segundo Schlimme e Buchheim (2002), a hidrólise da lactose é cada vez mais importante para seu uso alimentar, pois modifica sua solubilidade, o sabor doce, o poder redutor e a fermentabilidade, conseguindo-se, sobretudo, sua digestão pelos consumidores intolerantes a esse carboidrato. Devido ao elevado teor de lactose no leite, seu consumo é restrito para pessoas intolerantes, daí a importância nutricional e comercial de reduzi-la no leite e nos seus derivados (SILVA; CARDOSO, 2007).

Existem dois métodos principais para a hidrólise da lactose: o método químico e o método enzimático (LADERO; SANTOS; GARCÍA-OCHOA, 2000). O método químico depende do uso de altas temperaturas, que podem variar de 90 a 150 °C, e alta acidez (pH de aproximadamente 1,5), controlada pela adição de ácidos fortes, como o ácido clorídrico ou ácido sulfúrico, em altas concentrações. Nesse caso, ocorrem problemas tecnológicos, como a desnaturação das proteínas do leite, podendo os produtos apresentar coloração e odor que impeçam sua utilização nos alimentos. Portanto, não existem aplicações industriais conhecidas.

A hidrólise enzimática pode ser aplicada no leite ou no soro sem tratamento prévio, e os produtos obtidos preservam as propriedades nutricionais da matéria-prima, melhorando sua doçura. A hidrólise pelo método enzimático é catalisada pela enzima lactase (β -galactosidase) (LADERO; SANTOS; GARCÍA OCHOA, 2000; OBÓN et al., 2000), conforme figura 5.

Figura 5 - Hidrólise da lactose pelo método enzimático.



Fonte: Goursaud (1985)

A vantagem da hidrólise enzimática reside no fato de a reação se processar a temperatura relativamente baixa: de 4 a 40 °C, sendo ótima a temperatura de 30 a 40 °C, o que permite maior economia energética, além de não formar produtos colaterais (LADERO; SANTOS; GARCÍA-OCHOA, 2000; VITOLO, 2001). A hidrólise da lactose realizada com a lactase é processo usado em escala industrial, por permitir fabricação de produtos mais facilmente digeríveis por pessoas com intolerância à lactose; mais doces; e evitar a cristalização da lactose na produção, por exemplo, de sorvetes, doces de leite ou produtos fermentados, como o iogurte (OBÓN et al., 2000; ANDRADE; BRANDÃO; ALVIM, 2004).

A hidrólise da lactose pode também originar um xarope doce contendo glicose e galactose, que apresenta vantagens nutricionais em algumas aplicações. Xaropes de lactose hidrolisada a partir de permeados e soros podem ser usados em produtos de confeitaria e sorvetes (GOFF, 2002). Recentemente vem merecendo muita atenção a aplicação de lactase para hidrólise enzimática da lactose em produtos lácteos. Em particular, estudos clínicos têm mostrado que pessoas intolerantes à lactose podem consumir produtos lácteos hidrolisados com redução considerável dos sintomas desagradáveis (BAKKEN; HILL; AMUNDSON, 1992; SHAH; FEDORAK; JELEN, 1992; FERRONATO et al., 2004).

1.4 PROTEÍNAS DO LEITE

O leite de vaca tem aproximadamente 30 a 35 g L⁻¹ de proteínas, divididas em proteínas insolúveis, denominadas caseínas e proteínas solúveis, as chamadas proteínas do soro. A caseína representa 80 % das proteínas do leite e pode ser definida como a proteína precipitada por acidificação do leite desnatado com enzima renina a pH 4,6 por 20 °C. O líquido remanescente é o lactossoro, que tem 20 % de proteínas solúveis, como a α -lactoalbumina (α -La) e (β -Lg) que perfazem 70 a 80 % das proteínas de tal fração. Além dessas, são encontradas: soro-albumina (BSA), lactoferrina, imunoglobulinas, proteose-peptonas, transferrina e enzimas (SGARBIERE, 1996; WAL, 2004).

É imprescindível conhecer as diferenças estruturais e as propriedades físico-químicas das várias formas de caseínas (tabela 5) para compreender o comportamento tecnológico, funcional e nutritivo

dessas proteínas como parte de um sistema alimentício (SGARBIERI, 2005).

Tabela 4 - Composição média das caseínas do leite.

Proteína	g/kg leite ⁻¹	g/100g Proteína ⁻¹	Massa Molecular (KDa)
Caseínas	26	78,1	
α s1- Caseína	10,7	32	≈ 23,6
α s2- Caseína	2,8	8,4	≈ 25,3
β - Caseína	8,6	26	≈ 23,9
κ - Caseína	3,1	9,3	≈ 19,5
γ - Caseína	0,8	2,4	≈ 20,5

Fonte: Peter, Wouters e Geurts, (2006)

1.4.1 Caseína

As caseínas são um grupo de fosfoproteínas específicas do leite que apresentam baixa solubilidade em pH 4,6. São constituídas de micelas com 40 a 300 nm de diâmetro. As micelas são formadas por submicelas, grosseiramente esféricas; essas micelas são compostas por duas frações distintas: uma precipita na presença de cálcio, composta principalmente por α s1 e α s2 e β -caseínas; e outra que não precipita na presença desse íon, representada pela κ -caseína, que se caracteriza pela solubilidade na presença de cálcio e pela capacidade de associar-se ao cálcio, estabilizando o complexo formado, denominado micela (SILVA, 2004).

A micela de caseína é formada por submicelas com diâmetro de 10 a 20 nm apresentando regiões hidrofóbicas, orientadas em direção ao interior da micela, e regiões hidrofílicas, orientadas para sua superfície. Na superfície encontram-se a κ -caseínas associadas com outras κ -caseínas, e áreas ricas em carboidratos e fosfato, interagindo com o cálcio para formar ligações de pontes de fosfato de cálcio (VARNAM; SUTBERLAND, 1994).

As α -caseínas constituem 50 a 55 % das caseínas do leite, além de um componente majoritário (α s1-caseína) e mais cinco frações (α s0-caseína, α s2-caseína, α s3-caseína, α s4-caseína, α s5-caseína); a sequência dos aminoácidos na cadeia polipeptídica depende de suas

variantes genéticas (polimorfismo); são encontradas em maiores proporções no leite bovino.

A $\alpha 1$ constitui 40 % das frações de caseínas do leite bovino, tem hidrofobicidade média, sendo insolúvel nas condições de pH, temperatura e força iônica que ocorrem naturalmente no leite; sua massa molecular é de 23,6 kDa. As cargas e as cadeias laterais hidrofóbicas são muito irregulares na $\alpha 1$, o que confere à molécula um comportamento dipolar com um polo globular muito mais hidrofóbico e um polo carregado, podendo-se estabelecer três partes hidrofóbicas, compreendidas entre os resíduos 1-44, 30-113 e 132-199, e uma parte fosforilada (resíduos 41-80), que representa quase a totalidade da carga negativa (-20,6) a pH 6,6 (VARNAM; SUTBERLAND, 1994 FENNEMA, 1999).

A $\alpha 2$ -caseína consiste de uma sequência de 207 resíduos de aminoácidos, com massa molecular de 25.230 kDa; é mais hidrofílica e constitui 10 % das caseínas de leite bovino, porque é a mais fosforilada (10 a 13 resíduos fosfoseril/mol) e a mais rica em resíduos catiônicos. Outros componentes, denominados $\alpha 3$ -caseína, $\alpha 4$ -caseína, $\alpha 5$ -caseína e $\alpha 6$ -caseína, parecem ser componentes da família $\alpha 2$ -caseína. As evidências demonstram que todos possuem a mesma sequência de aminoácidos, diferindo apenas no grau de fosforilação (conteúdo de fosfato). As partes hidrofóbicas se limitam às frações 160-207 (sequência C- Terminal) e 90-120 (sequência central) (FENNEMA, 1999; PRATA, 2001).

A família das caseínas β constitui cerca de 45 % das caseínas de leite bovino, tem peso molecular de 24 kDa e uma cadeia polipeptídica formada de 209 resíduos de aminoácidos; é a mais hidrofóbica das caseínas. A β -caseína é uma fosfoproteína sensível ao Ca^{2+} , com cinco serinas fosforiladas e 35 resíduos de prolina (MIKHEEVA et al., 2003). É uma proteína alifática com uma região hidrofílica na porção N-terminal e uma região C-terminal hidrofóbica com carga quase zero. Nos sítios de ligação com o cálcio, os resíduos de serina-fosfato têm carga -2 na ausência de cálcio.

Uma característica da β -caseína é sua dependência da temperatura, formando grandes polímeros a 20 °C, mas não a 4 °C (GOFF, 2006). A adsorção de β -caseína aos núcleos de fosfato de cálcio limita seu crescimento desses (FOLLOWS et al., 2004). Segundo Horne (2003), a β -caseína ligada ao núcleo de fosfato de cálcio atua como um elo de ligação a outras caseínas.

A κ -caseína corresponde a 15 % do total das caseínas, sendo a fração mais solúvel. O seu polipeptídeo é constituído por 169 aminoácidos, 1 resíduo de fosfato, e seus monômeros possuem massa molecular de 19.550 kDa; mas no leite as moléculas encontram-se agregadas em polímeros de massa molecular de 60 a 650 kDa formados via ligações de dissulfeto (WALSTRA, 1999; SGARBIERI, 2005). Possui apenas um grupo fosfo-serina, sendo, portanto, estável na presença dos íons de cálcio e assumindo importante papel na estabilidade da micela de caseína (DALGLEISH, 1998, WALSTRA, 1999). O fosfato de cálcio atua como agente cimentante, mas se não houver κ -caseína, a agregação continuará até formar um gel ou um precipitado (WALSTRA; JONKMAN, 1998). A κ -caseína se localiza na superfície da micela, com a zona hidrofóbica da molécula ligada à micela, enquanto a porção hidrofílica forma uma capa de filamentos altamente hidratados que se projetam na fase aquosa. Os filamentos de κ -caseína são os responsáveis pela estabilidade estérica das micelas de caseína (VARNAM; SUTHERLAND, 1994). Em estudo recente, Bansai et al. (2006) demonstraram que o peptídeo N-terminal da κ -caseína apresenta uma estrutura helicoidal irregular que pode contribuir para a estabilidade da caseína.

De todas as caseínas a κ -caseína é a menos fosforilada (1P), de estrutura mais estável e mais ordenada, embora contenha muitos resíduos proil. Possui apenas um resíduo fosforil (SerP-149), localizado no segmento glicomacropéptido (GMP). A estrutura secundária da κ -caseína é formada por cinco regiões em α -hélice (23 % do total), sete regiões em folhas β (31 % do total) e dez regiões em alças em conformação β (24 %).

A estrutura secundária do segmento para κ -caseína é muito ordenada, sobretudo as regiões em folhas β entre os resíduos de aminoácidos 22 - 32 e 40 - 56, e contém dois resíduos cisteinil (cysSH), provavelmente nas voltas β , suscetíveis à oxidação e à reação de intercâmbio sulfidrilo-dissulfeto (LORIENT, 1989; SGARBIERI, 2005).

1.4.2 Proteínas do soro

As proteínas do soro de leite bovino (tabela 5) cumprem papel importante na nutrição por serem rica fonte de aminoácidos, além de apresentarem ações fisiológicas específicas *in vivo*, como antioxidante, anti-hipertensiva, antitumoral, protetora da mucosa gástrica contra

agressão de agentes ulcerogênicos, virais e bacterianos (SGARBIERI, 2005).

Tabela 5 - Composição média das proteínas do soro.

Proteína	g/kg leite ⁻¹	g/100g Proteína ⁻¹	Massa Molecular (KDa)
Proteínas do soro	6,4	19,5	
β-Lactoglobulina	3,2	9,8	18,2
α-Lactoalbumina	1,2	3,7	14,1
Albumina do soro	0,4	1,2	66,1
Proteose-Peptona	0,8	2,4	4,0 - 40
Imunoglobulinas	0,81	2,32	53
Lactoferrina	0,1 - 0,6	0,002-0,02	80
Lactoperoxidase	0,003	0,003	78,4
Lisozima	0,00004	0,00004	15

Fonte: Pieter, Wouters e Geurts (2006)

Do ponto de vista aminoacídico, as proteínas de soro contêm quase todos os aminoácidos essenciais acima das recomendações da FAO/WHO (1991), exceto pelos aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina) que atendem às recomendações para todas as idades (PACHECO et al., 2005; SGARBIERI, 2005). As principais proteínas são β-lactoglobulina (55 - 65 %), α-lactalbumina (15 - 25 %), proteose-peptona (10 - 20 %), imunoglobulinas (10 - 15 %) e albumina do soro bovino (5 - 6 %); caseínas solúveis (1 - 2 %) e proteínas em menores quantidades (< 0,5 %), como lactoferrina, lactolina, glicoproteína, transferrina de sangue e enzimas, lisozima, lactoperoxidase.

1.4.2.1. β-Lactoglobulina

A β-Lactoglobulina (β-Lg) (massa molecular= 18 300g/mol ou 18,3 kDa) tem estrutura globular na forma nativa. Cada monômero da β-Lg contém um grupo sulfidril livre (-SH) e é estabilizada por ligações de hidrogênio internas e ligações covalentes de S-S, (C106-C119 e C66-C160) e uma cisteína livre (C121). A estrutura primária consiste de 162 resíduos de aminoácidos, dos quais 1 a 3 podem ter diferentes posições nas variantes genéticas da β-Lactoglobulina bovina. A estrutura secundária consiste em aproximadamente 15 % de α-hélice e 50 % de folha β (folha pregueada); o restante constitui estruturas inorgânicas

(SGARBIERI, 1996; RUTTEN; BOUWMAN; LEEDEN, 2002; HONG; CREAMER, 2002; LIVNEY; VERESPEJ; DALGLEISH, 2003).

É a proteína mais abundante do soro, representando cerca de 50 % do total das proteínas que constituem essa fração (MONACI et al., 2006). Em pH fisiológico e temperatura ambiente, a β -lactoglobulina encontra-se como dímero, devido à interação eletrostática entre ácido aspártico (Asp130) e glutâmico (Glu134) de determinado monômero, e o resíduo lisina de outro monômero (SAWYER et al., 2002). Seu ponto isoelétrico é em pH 5,2; em pH abaixo de 3,5 e acima de 7,5 apresenta-se como monômero (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006; MOUÉCOUCOU et al., 2007).

A β -lactoglobulina apresenta 169 aminoácidos em sua estrutura primária com massa molecular de 18 kDa; cada monômero da β -Lg contém um grupo sulfidril livre (-SH) e é estabilizada por ligações de hidrogênio internas e ligações covalentes de S-S, (C106-C119 e C66-C160) e uma cisteína livre (C121) (SAWYER, 2002; SGARBIERI, 2005).

A β -lactoglobulina é uma proteína termossensível: vários efeitos são produzidos por ação da temperatura, como a perda de solubilidade e a exposição de regiões da molécula devido à mudança conformacional, o que possibilita a interação com outros componentes (IAMETTI et al., 1996; FENNEMA, 1999; VASBINDER et al., 2003).

1.4.2.2 α -Lactoalbumina

A α -lactoalbumina corresponde de 22 a 25 % do total das proteínas do soro. É uma pequena e compacta metaloproteína (14.146 kDa) com 123 aminoácidos, rica em lisina, leucina, treonina, triptofano e cistina. A estrutura nativa da α -lactoalbumina consiste de 2 domínios (um domínio de cadeia α -hélice e outro de cadeia β -pregueada) conectados por um loop ligante de cálcio. A estrutura é estabilizada por 4 ligações dissulfeto nas posições 6-120, 61-77, 73-91 e 28-111.

O íon cálcio na α -lactoalbumina tem um papel estrutural, sendo requerido para o desdobraimento e a formação da ligação dissulfeto nativa da proteína desnaturada (CHRYSINA; BREW; ACHARYA, 2000). Removido o Ca^{2+} , a estrutura terciária torna-se menos rígida, embora a estrutura secundária da proteína permaneça intacta (NIEUWENHUIZEN et al., 2003). A α -lactoalbumina pode ser empregada como fonte de proteínas para alimentos infantis e para

desenvolver outros produtos para pessoas com limitada ou restrita admissão de proteína (BURRINGTON, 2002).

1.4.2.3 Albumina do soro

Tal como as imunoglobulinas, a albumina do soro acumula-se no leite a partir do soro sanguíneo. Sabe-se que essa proteína se liga aos ácidos graxos, mas não se conhecem funções biológicas específicas (WALZEM et al., 2002). Trata-se de uma proteína com 582 aminoácidos e massa molecular aproximada de 66,3 kDa. Possui 17 ligações dissulfeto que estabilizam a sua estrutura terciária. Essa proteína atinge o seu ponto isoelétrico a pH 4,8 (MULVIHILL; DONOVAN 1987).

1.4.2.4 Proteose peptonas

Andrews e Alichanidis identificaram 38 peptídeos da fração das proteínas do soro resistentes ao aquecimento (95 - 100 °C durante 30 minutos) e insolúveis em ácido tricloroacético (8 a 12 %), características químicas que definem as proteose peptonas. Muitos desses peptídeos resultam da proteólise das caseínas, nomeadamente da β -caseína, por ação de proteinases ou da plasmina do leite (ANDREWS; ALICHANIDIS 1983; MULVIHILL; DONOVAN 1987).

1.4.2.5 Imunoglobulinas

As imunoglobulinas (Igs) ou anticorpos são produzidas pelo linfócito B. Na sua estrutura, possuem uma ou mais unidades básicas compostas por duas cadeias leves (23 kDa) e duas cadeias pesadas (53 kDa). No leite bovino, existem essencialmente três classes de Igs: IgG, IgM e IgA. Embora com funções próprias, são proteínas que se ligam de forma específica ao agente invasor (antígeno), mediando a resposta imunológica.

Evitam ainda a adesão dos microrganismos às superfícies, aglutinam os microrganismos e inibem o seu metabolismo e toxinas (KORHONEN et al., 2000). Na vaca, durante as últimas semanas de gestação, ocorre o acúmulo seletivo de Igs a partir do sangue para o colostro. Nos primeiros 2 dias de lactação, as Igs podem atingir os 200 g.l⁻¹ no colostro (70 a 80 % do total de proteínas), caindo a sua concentração, abruptamente, para valores entre 0,7 e 1,0 g.l⁻¹ no leite com o decorrer da lactação (KORHONEN et al., 2000).

1.4.2.6 Lactoferrina

A lactoferrina é sintetizada pelos neutrófilos. Com uma cadeia de 689 aminoácidos e massa molecular de aproximadamente 80,0 kDa, essa glicoproteína está presente, além do leite, nas secreções das glândulas exócrinas da entrada do aparelho digestivo, respiratório e reprodutor, bem como no sangue, nas lágrimas e no líquido sinovial. Essa localização sugere que tal proteína esteja envolvida na primeira linha de defesa contra patógenos invasores (STEIJNS; VAN HOOIJDONK, 2000; SIMPSON; NICHOLAS, 2002).

A lactoferrina tem ponto isoelétrico de 9,4. A sua alta afinidade pelo ferro e a capacidade de ligação da sua extremidade N-terminal fortemente catiônica são características estruturais responsáveis pelas várias atividades biológicas apontadas por STEIJNS, VAN HOOIJDONK (2000) na sua revisão sobre a ocorrência, propriedades bioquímicas e características tecnológicas da lactoferrina bovina.

1.4.2.7 Lactoperoxidase

A lactoperoxidase pertence à família das peroxidases, um grupo de enzimas largamente distribuídas na natureza. As reações oxidativas que catalisa, em que o peróxido de hidrogênio é sempre um dos reagentes, originam espécies reativas com atividade antimicrobiana (KUSSENDRAGER; VAN HOOIJDONK 2000).

Em termos estruturais, trata-se de uma cadeia polipeptídica de 612 aminoácidos com massa molecular de 78,4 kDa. Tal como a lactoferrina, é uma proteína básica cujo ponto isoelétrico é de 9,6. Na sua revisão sobre a lacto-peroxidase, Kussendrager e Van hooijdonk (2000) realçam a aplicação desse composto como um antimicrobiano natural em produtos alimentares e não alimentares.

1.4.2.8 Lisozima

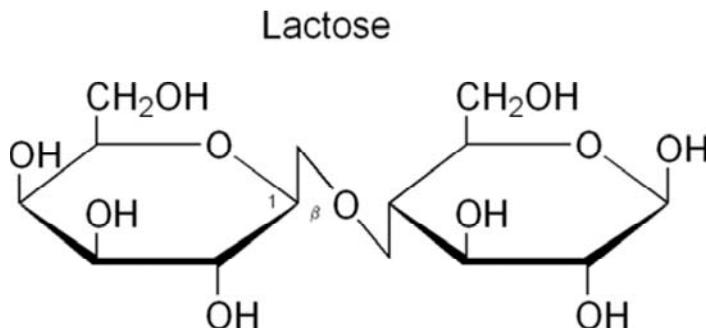
A lisozima (~15 kDa) é uma enzima que catalisa a hidrólise das ligações β -1,4 entre o ácido N-acetilmurâmico e a 2-acetilamino-2-desoxi-D-glucose, componentes da parede celular das bactérias, promovendo a lise celular (SHAH 2000).

1.5 LACTOSE

A lactose é o componente majoritário do extrato seco do leite, podendo variar de 4,5 a 5,2 % conforme a alimentação e intervalos de lactação bovina. É também o principal carboidrato do leite de vaca (SCHLIMME; BUCHHEIM, 2002). Sua concentração é relativamente constante e está pouco sujeita às variações sazonais (MAHAUT et al., 2004).

A lactose é um dissacarídeo constituído por um radical β -D-galactose e um radical D-glicose; é considerado um açúcar redutor, porque o grupo no carbono anomérico da porção glicose não está envolvido na ligação glicosídica, deixando-a livre para reagir com agentes oxidantes (CAMPBELL, 2000). Sua estrutura química é apresentada na figura 6.

Figura 6 - Estrutura química da lactose.



Fonte: Macedo (2003)

Naturalmente, a lactose é encontrada em alta concentração apenas no leite e em seus derivados lácteos. O leite de vaca contém de 4,5 a 5 % de lactose, o que perfaz mais de um terço do seu teor de sólidos totais; aproximadamente 20 % do teor de sólidos totais do sorvete e em torno de 72 % do teor de sólidos totais no soro do leite (MLICHOVA; ROSENBERG, 2006).

A lactose apresenta baixa solubilidade em água (15 a 20 %) e baixo poder adoçante, quando comparada a outros açúcares (TRONCO, 2003). É cerca de dez vezes menos solúvel do que a sacarose (VASECHI apud LONGO, 2006) e apresenta um poder edulcorante seis vezes inferior ao da sacarose (MAHAUT et al., 2004). Contudo, seus componentes monossacarídeos – glicose e galactose – possuem alto poder adoçante, além de outras características desejáveis. Na tabela 6, a doçura de vários açúcares e suas solubilidades.

Tabela 6 - Poder adoçante relativo e solubilidade de vários açúcares.

Poder adoçante relativo		Solubilidade (%)		
		10 °C	30 °C	50 °C
Sacarose	100	66	69	73
Lactose	16	13	20	30
D-Galactose	32	28	36	47
D-Glicose	74	40	54	70
D-Frutose	173	-	82	87

Fonte: Zadow (1984)

Do ponto de vista físico-químico, a lactose está presente no leite no estado molecular em solução verdadeira, com partículas de diâmetros inferiores a 1 μ m (CARMNINATI, 2001).

A lactose não é apenas uma fonte de energia, com valor nutritivo especial para crianças. Tradicionalmente, considera-se que a lactose favorece a retenção de cálcio, estimulando a ossificação e prevenindo a osteoporose. Atua interagindo com as vilosidades intestinais, sobretudo no íleo, aumentando sua permeabilidade ao cálcio. Portanto, a lactose minimiza, em parte, a deficiência de vitamina D, donde se infere que alto nível de lactose poderia ajudar a combater o raquitismo. A lactose não tem efeitos cancerígenos, não forma placa dentária e, no caso de diabetes, os níveis de glicemia são a metade do alcançado com o consumo de glicose; por isso, o uso de lactose é permitida, no caso de diabéticos, em torno de 35 a 50 g/dia (ÓRDÓNEZ et al., 2005).

A intolerância à lactose foi descrita pela primeira vez por Hipócrates por volta do ano 400 depois de Cristo, embora seus sintomas clínicos tenham sido identificados somente nos últimos 50 anos (MATTHEWS et al., 2005).

Aproximadamente 75 % da população mundial adulta sofre de alguma deficiência de β -galactosidase na mucosa do intestino delgado, resultando em diferentes níveis de intolerância à lactose. Menos comum em crianças de origem caucasiana (brancos originários da Europa), a intolerância a lactose ocorre mais frequentemente em crianças de outras origens, como africanos, asiáticos, aborígine da Oceania e ameríndios (ROBERFROID; DELZENNE, 1999).

Na população adulta humana os índices de intolerância a lactose são elevados, estimando-se em 70 % na América do Sul e África, podendo chegar a cerca de 100 % em alguns países da Ásia, como na

China e na Tailândia. Na Europa a intolerância a lactose é menor nos países escandinavos, em especial na Suécia e na Dinamarca, crescendo nas direções sul e leste do continente. Entre os suecos é de cerca de 2 %, chegando a 70 % nos italianos da Sicília. Nos Estados Unidos a intolerância a lactose prevalece nas comunidades afrodescendentes em cerca de 80 % e chega a 53 % em descendentes de latinos com origem pré-hispânica. Nos norte-americanos descendentes de caucasianos a intolerância atinge apenas 15 % da população, enquanto nos ameríndios descendentes das comunidades originais da América do Norte a incidência é de 100 %. Não existem dados oficiais sobre o percentual de brasileiros que sofrem desse problema, embora se estime em mais de 58 milhões a população intolerante a lactose (CUNHA et al., 2007).

Para essas pessoas, o consumo de leite e produtos lácteos pode causar dor abdominal, diarreia, flatulência, entre outros sintomas desagradáveis. Tal problema pode ser contornado se a lactose do leite e produtos lácteos for previamente hidrolisada em seus açúcares prontamente digeríveis, possibilitando assim o consumo de produtos nutricionalmente ricos e com reduzido teor de lactose por pessoas intolerantes a esse dissacarídeo (SIEBER; STRANSKY; DEVRESE, 1997). Outra vantagem da hidrólise enzimática da lactose é a simultânea formação de galactooligosacarídeos (GOS), usados como ingredientes prebióticos em alimentos.

Os GOS são produzidos simultaneamente durante a hidrólise da lactose, devido à atividade de transgalactosilação da β -galactosidase. Atualmente, tem aumentado significativamente a demanda pela produção de GOS e o desenvolvimento de produção efetiva e de baixo custo (TUOHY et al., 2003).

A alta concentração de lactose em produtos como sorvetes, leite condensado e doce de leite pode levar a uma excessiva cristalização da lactose resultando em produtos com textura arenosa. A utilização da β -galactosidase no processamento de tais produtos reduz a concentração de lactose a níveis aceitáveis e aumenta a concentração de glicose e galactose, que são açúcares mais solúveis quando comparados à lactose e, portanto, menos propensos a cristalizar. Dessa forma, a hidrólise enzimática da lactose ocasiona modificações físicas e químicas dos produtos, pois aumenta a solubilidade, o poder adoçante e a digestibilidade dos açúcares e a viscosidade, o corpo, a textura e o paladar dos produtos (VINHAL, 2001; LOUSERMA; ANDRADE, 2005).

1.6 SORVETE

A origem do sorvete é indefinida na história, mas há livros que relatam o seu desenvolvimento através de bebidas e sucos de frutas, congelados com gelo e neve e levados até a corte do imperador Nero no Século I. Muitas informações disponíveis sobre a origem do sorvete pairam ainda na esfera do folclore, indicando que esse produto não foi inventado ou criado, mas desenvolvido há séculos, até chegar ao produto que se conhece atualmente. Indícios mais antigos sobre o aparecimento do sorvete datam de 250 a.C., sugerindo que os chineses misturavam polpa de frutas e mel à neve para preparar uma iguaria apreciada pelos imperadores (MIKILITA, 2002).

A grande revolução na história do sorvete, no entanto, ocorreu em 1292, quando o mercador italiano Marco Polo levou do oriente para a Itália, numa de suas famosas viagens, uma receita com o segredo do preparo de sorvetes (ABIS, 2013; MARSHALL; 2007).

Desse momento em diante, o sorvete se difundiu por toda a Itália e restante da Europa. Quando Catarina de Médici se casou com Henrique II, levou para a França, em 1533, receitas de sorvete. Na Inglaterra, em 1640, o rei Carlos I pagou para que seu chefe de cozinha De Mirco, vindo da corte francesa, criasse um “creme gelado” cuja receita deveria ser mantida em segredo (CLARKE, 2004).

Nos estados Unidos, o sorvete chegou através das receitas levadas pelos colonizadores ingleses. A primeira máquina de fabricar sorvetes surgiu em Nova Jersey, quando Nancy Johnson, em 1843, inventou um congelador manual, revestido de gelo adicionado de sal, no qual a mistura era agitada até o congelamento (ABRAHÃO, 2008). A primeira fábrica de sorvete foi aberta em 1851, na cidade de Baltimore pelo comerciante Jacob Fussel, que se tornaria o primeiro a produzi-lo em larga escala.

No Brasil, os primeiros relatos datam de 1834, quando os comerciantes Derche e Fallas importaram de Boston 217 toneladas de gelo, que seria utilizado na produção de sorvetes e bebidas à base de frutas tropicais. Esse gelo foi armazenado em covas e envolto por serragem durante cinco meses. As confeitarias anunciavam, por meio de panfletos, o momento exato em que o sorvete seria servido, porque na época não havia como mantê-lo congelado por muito tempo, devendo ser consumido logo após o seu preparo.

Em 1941 foi inaugurada no Rio de Janeiro a primeira indústria de sorvetes do país, a US HARKSON do Brasil, que mais tarde passou a

chamar-se Kibon (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE SORVETE, 2012).

A Resolução RDC n. 266 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária define sorvete ou gelado comestível como “um produto alimentício obtido a partir de uma emulsão de gordura e proteínas, com ou sem adição de outros ingredientes e substâncias, ou de uma mistura de água, açúcares e outros ingredientes e substâncias que tenham sido submetidas ao congelamento, em condições tais que garantam a conservação do produto no estado congelado ou parcialmente congelado, durante a armazenagem, o transporte e a entrega ao consumo” (BRASIL, 2005).

Para Frost et al. (2005), o sorvete é uma matriz alimentícia altamente complexa contendo proteínas, gordura, açúcares, ar, minerais, etc. e relações incontáveis entre os diferentes constituintes, sofrendo mudanças de fase do sólido ao líquido durante seu consumo.

O sorvete é um dos derivados lácteos mais apreciados pela população em geral (ALVAREZ; WOLTERS; VODOVOTZ, 2005). A média de consumo no Brasil no ano de 2011 foi de 6,07 litros per capita, sendo 70,36 % das vendas ++concentradas durante o verão. Média relativamente baixa, quando comparada à dos Estados Unidos da América, que é de 15,4 litros per capita (SCHULTZ, 2010).

A Portaria n. 379 da ANVISA (BRASIL, 1999) estipula exigências quanto à composição centesimal mínima de nutrientes nos sorvetes, conforme a tabela 7, só podendo receber esse nome o produto alimentício que contiver o mínimo exigido.

Tabela 7 - Composição físico-química mínima e densidade aparente de sorvetes.

Componentes	% Mínima
Sólidos totais	28,0
Gordura láctea	3,0
Proteínas do leite	2,5
Densidade aparente (g/L)*	450,0

*Medida do ar incorporado ao sorvete (“*overrun*”) mediante batimento, expressa em gramas/litro. Fonte: Brasil (1999).

A composição química do sorvete determina vários parâmetros estruturais e sensoriais importantes para obter um produto final de qualidade, como firmeza, resistência ao derretimento e textura, entre outros (GRANGER et al., 2005). Os sorvetes diferem, principalmente, quanto ao teor de lipídeos, sendo chamados de sorvetes tipo Premium aqueles elaborados com grandes quantidades de lipídeos, baixo *overrun* (incorporação de ar) e saborizados com ingredientes naturais.

A qualidade do sorvete pode ser avaliada principalmente por seu sabor, textura, consistência e “corpo”. O tamanho dos cristais de gelo influencia o tipo de textura; cristais superiores a 55 μ m produzem uma textura grosseira (MOSQUIM, 1999).

Enquanto a consistência se refere à dureza ou maciez do produto, podendo ser afetada pela temperatura e viscosidade da mistura, entende-se por “corpo” o comportamento do sorvete quando a temperatura é elevada e começa a derreter, sendo classificado em viscoso e esponjoso ou aguado e compacto (CHARLEY; WEAVER, 1998a). Os ingredientes utilizados no mix, mistura dos ingredientes, têm extrema importância na qualidade do produto final. A gordura favorece o sabor, a textura e a consistência do sorvete. A sacarose confere “corpo” aos produtos congelados e influencia a formação dos cristais de gelo por causa do abaixamento do ponto de congelamento da água (FREELAND-GRAVES; PECKHAM, 1996; CHARLEY; WEAVER, 1998b; SOLER; VEIGA, 2001).

A Portaria ANVISA n. 379, de 26 de abril de 1999, classifica os gelados comestíveis em:

Sorvetes de massa ou cremosos – compostos basicamente de leite e derivados lácteos e ou outras matérias-primas alimentares, nos quais os teores de gordura e ou proteína são total ou parcialmente de origem não láctea, contendo no mínimo 3 % de gordura e 2,5 % de proteínas, podendo ser adicionados outros ingredientes alimentares;

Sherbets – são os produtos elaborados basicamente com leite e ou derivados lácteos e/ou outras matérias-primas alimentares e que contêm uma pequena porção de proteína e gordura, as quais podem ser total ou parcialmente de origem não láctea, contendo no mínimo 1 % de gordura e 1 % de proteína;

Sorbets – produto elaborado basicamente com polpa de fruta, sucos ou pedaços de frutas e açúcares;

Picolés – são porções individuais de gelados comestíveis de várias composições, geralmente suportadas por uma haste, obtidas por resfriamento até o congelamento da mistura, homogênea ou não, de ingredientes alimentares, com ou sem batimento.

O sorvete é uma mistura muito complexa. Trata-se de uma mistura heterogênea, ao mesmo tempo emulsão, gel, suspensão e espuma, cuja coesão é mantida graças ao congelamento. Estruturalmente trata-se de uma espuma na qual as bolhas de ar estão cobertas por cristais de gelo, glóbulos de gordura individualizados ou parcialmente fundidos (grânulos gordurosos) e cristais de lactose. A estrutura dos glóbulos parcialmente fundidos e sua união às bolhas de ar dão ao sorvete firmeza residual depois da fusão dos cristais de gelo, o que é muito importante para a mastigação (ORDÓÑEZ et al., 2005).

Atualmente os sorvetes são apontados como ingredientes funcionais relacionados à saúde. Contêm proteínas, açúcares, gordura vegetal e ou animal, vitaminas A, B1, B2, B6, C, D, K, cálcio, fósforo e outros minerais essenciais numa proporção equilibrada. A composição química do sorvete é basicamente os seguintes ingredientes: 10 a 17 % de gordura; 8 a 12 % de extrato seco desengordurado (ESD) do leite; 12 a 17 % de açúcares; 0,2 a 0,5 % de estabilizantes e emulsificantes e 55 a 65 % de água (TRGO, 2003).

1.6.1 Processamento dos sorvetes

A característica de qualidade dos sorvetes é influenciada pelos diferentes ingredientes utilizados na formulação da calda. A gordura confere cremosidade e proporciona uma textura suave, dando corpo e diminuindo a sensação de frio; as proteínas melhoram a estrutura, estabilizam as bolhas de ar e interferem na emulsificação e no batimento; os açúcares contribuem para aumentar a viscosidade, diminuindo o ponto de congelamento, aumentando o sabor e a fixação de compostos aromáticos; os estabilizantes e emulsificantes melhoram a estabilidade da emulsão, formando uma membrana protetora que facilita a incorporação de ar; sabor e cores são incorporados pelos aromatizantes e corantes (GOLF, 1997; COELHO; ROCHA, 2005; OLIVEIRA et al., 2005).

As etapas da elaboração de sorvetes variam de acordo com a técnica escolhida, sendo de uma forma geral agrupadas em três etapas fundamentais: (1) mistura dos ingredientes e seu aquecimento, seguida de pasteurização; (2) congelamento após a homogeneização com o propósito de aerar a mistura; (3) endurecimento, estágio em que a água não congelada do sorvete se deposita sobre os cristais de gelo, aumentando seu tamanho (NARAIN et al., 2006).

A elaboração de sorvete inicia com a mistura de ingredientes, previamente pesados e dosados, de acordo com a formulação. A seguir a mistura é pasteurizada entre 70 e 80 °C durante 20 a 40 segundos, com a finalidade de destruir os microrganismos patogênicos. Após a pasteurização, o profuto é homogeneizado produto para reduzir o tamanho dos glóbulos de gordura (diâmetro inferior a 2µm) e assim tornar a emulsão mais fina e estável. Posteriormente, faz-se um rápido resfriamento a 4 °C, seguido do armazenamento por 2 a 24 horas para que a gordura comece a cristalizar até o início da maturação (ORDÓÑEZ et al., 2005).

No processo de maturação, a solidificação da gordura e a hidratação das proteínas aumenta a viscosidade da calda (GOFF, 1997). Durante a maturação o sorvete adquire textura macia e suave e mais corpo, aumentando e melhorando a incorporação de ar (GOFF, 2006).

Etapas das que mais influem na qualidade final do sorvete, a batidura e o congelamento ocorrem simultaneamente. Quanto menor for a temperatura de congelamento, maior será a proporção de água congelada, formando minúsculos cristais de gelo (PEREDA et al., 2005), proporcionando a remoção do calor da mistura e estabilizando o ar incorporado (*overrun*) (GOFF, 1997).

Após o congelamento o sorvete é envasado, saindo da sorveteira com o aspecto mole e fluido à temperatura de - 6 °C, não devendo estar completamente congelado, de modo a possibilitar que se amolde em diferentes tipos de embalagens (VARNAM; SUTHERLAND, 1994; MADRID; CENZANO; VICENTE, 1996).

1.7 SORO

Estima-se que o soro líquido, subproduto da manufatura de queijo, tenha geração global de 145 bilhões de quilograma por ano, que, se descartados diretamente nos mananciais de água, representariam o mais sério problema de poluição causado pelos laticínios (LOW et al., 2001).

O desafio é agregar valor a tal subproduto de inestimável utilidade funcional e nutricional. Constituído de água, minerais, açúcares e proteínas (20 % das proteínas totais do leite), a concentração do soro gera produtos proteicos que, além de serem utilizados como ingredientes, melhorando as propriedades funcionais (viscosidade, solubilidade, gelificação, emulsificação, formação de espuma, estabilidade) dos alimentos, apresentam também potencial por possuírem componentes aos quais se atribuem algumas propriedades biológicas importantes (WALZEM, 2002).

É um líquido resultante da separação das caseínas e da gordura do leite no processo de elaboração do queijo. Antigamente o soro era tido como líquido residual inaproveitável, ou era utilizado na alimentação animal. Contudo, o conhecimento de sua composição e os avanços tecnológicos elevou seu status ao patamar de importante fonte de componentes lácteos de grande valor para a indústria alimentícia e farmacêutica (ORDÓÑEZ et al., 2005).

O soro é composto basicamente de 94 a 95 % de água, 3,8 a 4,2 % de lactose, 0,8 a 1, % de proteínas e 0,7 a 0,8 % de minerais. É subproduto de relevante importância na indústria de laticínios, pelo volume produzido e por sua composição nutricional (HUFFMAN, 1996). O componente mais valioso do soro são as proteínas, de reduzida concentração nesse líquido; e, para realçar suas propriedades funcionais, como solubilidade, emulsificação e formação de espuma, são necessárias etapas de concentração. Quando o teor de lactose é reduzido, obtém-se um produto com elevado teor de proteínas. Inúmeras pesquisas têm demonstrado as qualidades nutricionais das proteínas solúveis do soro de leite (também conhecidas como “whey protein”) por suas propriedades fisiológico-funcionais, e suas vantagens em relação a

outras fontes proteicas (MCINTOSH; LE LEU, 2001; HARAGUCHI; ABREU; PAULA, 2006; ROSANELI et al., 2004;).

1.7.1 Concentrado proteico de soro (CPSs)

Por suas propriedades funcionais, as proteínas do soro – os CPSs – são amplamente utilizadas na indústria alimentícia. Assim, por sua capacidade espumante, são empregados em confeitaria, como substitutos da clara de ovo na elaboração de cremes e merengues; por sua capacidade emulsificante, são empregados na indústria cárnea, sobretudo na elaboração de embutidos cozidos, substituindo proteínas da carne. Ao mesmo tempo, se estiverem desnaturadas, as proteínas do soro apresentam grande solubilidade, podendo ser incorporadas a bebidas como aquelas destinadas aos esportistas, e, sobretudo, a leites infantis, com prévia desmineralização. Na indústria láctea, podem ser incorporados a iogurtes para enriquecer seu conteúdo protéico; em sorvetes, para melhorar a textura; e na elaboração de queijos pelo procedimento *Centri-Whey*, que incorpora essas proteínas ao leite destinado ao fabrico de queijos, enriquecendo-o proteicamente (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005).

Os concentrados proteicos de soro (CPS) podem variar sua composição de proteínas de 34 a 80 %: quando contêm cerca de 53 % de proteína, terão em média 35 % lactose, 5 % de gordura e 7 % de cinzas; quando a concentração de proteínas aumenta para 80 %, o conteúdo de lactose decresce, ficando em média 7 %; gordura e cinzas entre 4 e 7 %, diminuindo gradativamente à medida que aumentam as lavagens com água durante o processo de filtração (ANTUNES, 2003; PACHECO *et al.*, 2005).

Os concentrados proteicos de soro (CPSs) são produtos de soro contendo de 25 a 90 % de proteína, mas sua composição varia muito, dependendo do método de manufatura. Os processos mais citados para obter o CPS são ultrafiltração (mais utilizado industrialmente), filtração em gel e precipitação com polifosfatos (ANTUNES, 2003). Os CPSs são reconhecidamente seguros para aplicação em produtos alimentícios e não existem padrões de restrição de identidade (MORR; FOEGEDING, 1990). Na tabela 8, é apresentada a composição de concentrados proteicos de soro em pó.

Tabela 8 - Composição dos concentrados proteicos de soro de leite (CPSs) em pó.

	CPS(g/100g)			
	35	50	65	80
Umidade	4,6	4,3	4,2	4,0
Proteína	36,2	52,1	63,0	81,0
Lactose	46,5	-	-	-
Gordura	2,1	3,7	5,6	7,2
Cinzas	7,8	6,4	3,9	3,1
Ácido láctico	2,8	2,6	2,2	1,2

Fonte: Milk Ingredients (2011)

(-) não determinado

As proteínas do soro do leite são utilizadas como ingredientes por seu valor nutritivo e por suas propriedades físico-químicas e funcionais, embora na seleção final pesem mais as melhores propriedades que a proteína promoverá no produto final com o menor custo possível (HARPER, 1994). A compreensão do comportamento físico-químico e funcional desses ingredientes e a alteração dessas propriedades em certas condições de processamento são essenciais para utilizá-los no processamento de novos produtos (DAMODARAN, 1997; JAYAPRAKASHA; BRUECKENER, 1999).

Essas proteínas apresentam estrutura globular com algumas ligações de dissulfeto que conferem certo grau de estabilidade estrutural. As frações são constituídas de: beta-lactoglobulina (β -Lg), alfa-lactoalbumina (α -La), albumina sérica do soro (BSA), imunoglobulinas (Ig's) e glicomacropéptídeos (GMP). Essas frações podem variar de tamanho, massa molecular e função, dando características especiais às proteínas do soro. Os dois grupos principais são o da β -Lg e α -La, que representam em torno de 70 a 80 % das proteínas do soro (ANTUNES, 2003). Na tabela 9, é apresentada a composição proteica dos CPSs comerciais.

Os sólidos do soro têm sido utilizados para substituir até um quarto dos sólidos não gordurosos do leite (SNGL) no sorvete (padrão da legislação nos Estados Unidos), e, sendo de baixo custo, são frequentemente utilizados para substituir sólidos do leite desnatado (MARSHALL; ARBUCKLE 1996). Na produção de sorvete as proteínas lácteas atuam como emulsificante e estabilizante, prevenindo a aglomeração dos glóbulos de gordura e permitindo a estabilidade da

aeração durante o congelamento. A formulação e o processamento influenciam o comportamento de uma proteína em aplicação alimentícia específica, não havendo procedimento único para otimizar a seleção dos ingredientes proteicos (HARPER,1994).

Tabela 9 - Composição proteica dos concentrados proteicos de soro (CPSs) comerciais.

Proteínas	CPS (g/100g)
B-Lactoglobulina	3,80 – 15,40
α - Lactoglobulina	14,5 – 24,80
Imunoglobulinas	3,80 – 15,40
Albumina do soro bovino	5,80 – 19,60

Fonte: Morr e Foegeding (1990)

Os produtos proteicos de soro de leite têm sido incluídos nas formulações de sorvetes devido a sua contribuição favorável para as qualidades sensoriais e de textura do produto, além de fonte alternativa de SNGL de mais baixo custo (PARSONS; DYBING; CODER, 1985; TIRUMALESHA; JAYAPRAKASHA, 1998).

As excelentes propriedades funcionais e nutricionais, aliadas a seu considerável potencial para mistura com vários produtos alimentícios, têm viabilizado a aplicação do CPS em diversos produtos nas indústrias de laticínios, como, por exemplo, iogurtes, bebidas lácteas, cremes, queijos e sorvetes (LEE *et al.*,1991; HUFFMAN, 1996; JAYAPRAKASHA; BRUECKENER, 1999; VOORBERGEN; ZWANENBERG, 2002).

1.8 EDULCORANTE

O termo edulcorante foi definido pela primeira vez pelo Decreto (Presidência da República) n. 55.871 de 20/03/1965 como “qualquer substância orgânica, que não glicídica, com a capacidade de conferir sabor doce aos alimentos” (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTOS, 1989). Com o passar dos anos a legislação foi modificada, e em 1988 a Portaria n. 25 da Secretaria Nacional da Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde conferiu a nomenclatura de adoçante *dietético* a todos os produtos à base de edulcorantes com ou sem adição de sacarose (BRASIL, 1988).

De acordo com a definição da Portaria 540/97 da Secretária da Vigilância Sanitária, edulcorantes são substâncias diferentes dos açúcares que conferem sabor doce ao alimento (BRASIL, 1997). A Resolução MERCOSUR / GMC n. 83/93 define os edulcorantes como substâncias diferentes dos açúcares, que conferem sabor doce ao alimento. Os limites de segurança de cada adoçante são definidos pelo *Joint Expert Committee of Food Additions (JECFA)*, da Organização Mundial da Saúde, e pela *Food and Agricultural Organization (FAO)*, das Nações Unidas. Tais limites são definidos em termos de ingestão diária admissível – IDA, medida em 15 mg/kg de peso corporal. Esses limites são estabelecidos a partir do NOEL (*no effect level*) e determinados em estudos sobre animais. O NOEL corresponde à quantidade de determinado aditivo que pode ser ingerida todos os dias por um animal sem causar-lhe nenhum dano detectável. Essa quantidade é então dividida por um fator de segurança – normalmente 100 – de cuja operação resulta a IDA para humanos.

Há vários tipos de edulcorantes liberados para consumo. Os sais de sacarina e ciclamato, aspartame, sucralose, acessulfame-k e o extrato de folhas de estévia são permitidos pela legislação brasileira para uso em bebidas e alimentos *dietéticos* com suas quantidades de ingestão diária aceitável definidas (BRASIL, 1995).

Adoçante não calórico de alto poder adoçante (GRICE; GOLDSMITH, 2000), A sucralose é 600 vezes mais doce do que a sacarose, podendo sua doçura variar de 400 a 800 vezes em relação à da sacarose e duas vezes à da sacarina. Os valores de doçura relativa para a sucralose dependem de: pH, temperatura e concentração.

O perfil tempo-intensidade é de elevada qualidade e muito semelhante ao da sacarose e do aspartame. A doçura é de percepção rápida, persistindo por um período ligeiramente maior do que a sacarose. Não possui residual amargo ou metálico. Possui alta solubilidade em água, alta estabilidade térmica, em meio aquoso e ácido e no armazenamento. Quimicamente inerte e não cariogênico, é um edulcorante não calórico que pode ser ingerido por diabéticos (CÂNDIDO, 2000).

O acessulfame-k é um sal de potássio do 6-metil-1,2,3-oxatiazina-4-ona-2,2-dióxido; trata-se de edulcorante não calórico cerca de 200 vezes mais doce do que a sacarose e sem gosto residual. Sua toxicidade e carcinogenicidade na reprodução foram estudadas por longo prazo, ficando demonstrado que o acessulfame-k é um edulcorante seguro com alto poder adoçante, não sendo metabolizado pelo organismo (MENDONÇA *et al.*, 2005).

Os adoçantes podem participar de formulação de alimentos e bebidas, com ganho na qualidade adoçante e sem problemas de instabilidade. Além disso, algumas propriedades sensoriais de alguns adoçantes sintéticos são conhecidas e têm seu uso limitado em bebidas de baixa caloria, embora a combinação de diferentes adoçantes possa superar tais limitações. Quando dois adoçantes são misturados, a intensidade do sabor da mistura pode ser igual (cumulativo), maior (sinergismo) ou menor (supressão) do que o uso individual do adoçante intenso (HUTTEAU *et al.*, 1998).

A utilização de edulcorantes em alimentos está condicionada a aprovação e autorização de órgãos como o JECFA (*Joint FAO/ WHO Expert Committee on Food Additives*), comitê formado pela FAO e OMS, responsável pela elaboração de normas que garantam que as quantidades de aditivos empregadas num produto são inócuas e que sua utilização se justifica por necessidades tecnológicas e de comercialização (UMBELINO, 2005).

1.9 SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

No planejamento experimental de superfície de resposta (MSR) é ferramenta efetiva regularmente usada para estudar e separar efeitos interativos de sistemas de fatores sobre determinada resposta estudada (ALIZADEH; HAMED; KHOSROSHAHI, 2005). Para Arteaga *et al.* (1994), a metodologia de superfície de resposta é presentemente a técnica mais popular em ciência de alimentos para estudos de otimização por sua teoria compreensiva, alta eficiência e simplicidade.

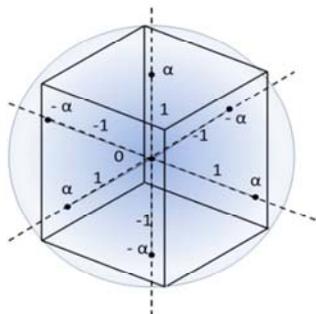
Vários autores têm utilizado a metodologia de superfície de resposta (MSR) para determinar as condições ótimas de atividade da enzima TG em diversos alimentos. (RODRIGUEZ-NOGALES, 2006; PINTERITS; ARNTFIELS, 2008). Essa metodologia corresponde a um conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas empregadas para modelar e analisar os problemas nos quais a resposta de interesse é influenciada pelas diversas variáveis, com o objetivo de otimizar a resposta (ABDULLAH; SALAMATNIA; KAMARUDDIN, 2009). Sua principal vantagem é a redução do número de experimentos necessários para fornecer informações suficientes para resultados estatisticamente aceitáveis (ZHANG *et al.*, 2009).

Utilizando um delineamento central composto, a MSR envolve a pesquisa fatorial completa para examinar a variação simultânea, sistemática e eficiente dos componentes importantes, identificando as possíveis interações, efeitos de maior ordem e as condições operacionais

(RORIZ *et al.*, 2009). Recentemente, no Brasil, vários são os trabalhos que utilizaram essa técnica de estudos de otimização de qualidade sensorial com a metodologia de superfície de resposta.

O planejamento composto central – CCD – é usado para construir um modelo experimental de segunda ordem (MYERS, 1976). Esse tipo de planejamento consiste de uma parte referente ao planejamento fatorial 2^k , com n corridas, 2^k corridas axiais (estrela) e n_c pontos centrais, Figura 7. CCD é um planejamento fatorial composto de um conjunto de pontos centrais e pontos axiais equidistantes do ponto central.

Figura 7 - Layout do delineamento composto central (CDD) para três variáveis em 5 níveis.



O componente de planejamento fatorial (CCD) é de classe fatorial 2^k , onde k representa o número de fatores relevantes ou variáveis. Cada uma das variáveis é feita em dois níveis significando que cada variável tem um baixo e um alto valor numérico. Um valor numérico codificado entre -1 e +1 é atribuído para representar variáveis de baixos e altos valores. A representação geométrica de um fatorial é um cubo em que cada vértice representa uma interação de fatores. Nessa perspectiva, 8 interações devem ser avaliadas e três variáveis do processamento são selecionadas para determinar a sua importância na resposta final (MYERS, 1976).

O componente axial do (CCD) se refere aos pontos equidistantes do centro do cubo formado pelo planejamento fatorial. Em razão do desenho esférico obtido, existe uma variância igual a partir do centro para todos os pontos da esfera. Em consequência, existe um valor

axial positivo (+ α) e um valor negativo axial (- α). Os pontos axiais adicionam mais dois níveis em cada variável. O valor α é calculado pela equação $\alpha = (n_i)^{1/4}$, onde, n_i representa o número de interações obtidas do planejamento fatorial. Sendo assim, para 8 interações $\alpha = 1,682$ (MYERS, 1976).

O componente do ponto central (CCD) é a média dos valores máximos e mínimos determinados no planejamento fatorial. O ponto central pode ser definido como a região em que as condições ótimas são supostamente satisfeitas.

1.10 ANÁLISE SENSORIAL

A análise sensorial (AS) é uma metodologia científica que estuda a forma como os sentidos humanos são evocados, percebidos, analisados e interpretados. Uma vez que o consumidor é quem experimenta tais sensações, estes estudos devem estar em conformidade com suas expectativas e necessidades, justificando e ampliando a atuação da análise sensorial em estudos do consumidor. É também uma ciência interdisciplinar na medida em que para alcançar estes objetivos utiliza várias ferramentas de outras disciplinas tais como estatística, físico-química e química, além da sociologia e da psicologia (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 1999; STONE; SIDEL, 2004; MINIM, 2006; DUTCOSKY, 2007; SENSORY RECEPTION, 2007).

Na indústria de alimentos, a Análise Sensorial é uma metodologia utilizada com várias finalidades (STONE; McDERMOTT; SIDEL, 1991), tais como:

- desenvolvimento de um novo produto;
- monitoramento da concorrência;
- melhoramento de um produto já existente;
- estudos do consumidor;
- alteração de processos;
- redução de custo e/ou nova fonte de matérias-primas;
- controle de qualidade;
- estabilidade de um produto e armazenamento;
- estabelecimento de padrões do produto;
- seleção e treinamento de provadores;
- correlação de medidas sensoriais com medidas físico-químicas.

Dentre os testes utilizados em Análise Sensorial encontram-se os descritivos tais como a Análise Descritiva Quantitativa (ADQ) e o Perfil Livre, os testes afetivos, referidos como teste de consumidor, de aceitação ou de preferência por Stone & Sidel (2004) e os testes discriminativos como o teste triangular, o duo-trio e a comparação pareada. Testes descritivos são aqueles que descrevem qualitativamente e quantitativamente as características sensoriais das amostras, enquanto os testes discriminativos têm por objetivo verificar se existe diferença perceptível ou não entre duas ou mais amostras. Os testes afetivos dizem respeito à opinião pessoal do julgador, isto é, de consumidores cuja percepção a respeito de um produto pode ser expressa em termos que variam do agradável ao desagradável (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 1999; STONE; SIDEL, 2004).

O sorvete oferece uma combinação de propriedades sensoriais altamente desejáveis, sendo estas classificadas em atributos como o de aparência, cor, maciez, regularidade, aroma, sabor e textura/preenchimento bucal (dureza, viscosidade, cremosidade (GUINARD, 1998).

Uma importante característica do sorvete está relacionada à aparência do produto, ou seja, ele deve apresentar uma textura macia, porém, não pegajoso, e o preenchimento bucal que não poderá ser muito viscoso. As medições instrumentais de propriedades sensoriais são usadas como um complemento para os testes analíticos sensoriais. Os testes afetivos ou de preferência, aplicados em consumidores em potencial, são indicados para avaliar a aceitação do produto. A alta palatabilidade do sorvete é um fator importante em sua escolha enquanto alimento. A textura aveludada amacia o palato (MARSHALL; GOFF; HARTEL, 2003).

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, A. Z.; SALAMATINIA, B.; KAMARUDDIN, A. H. Application of response surface methodology for the optimization of NaOH treatment on oil palm frond towards improvement in the sorption of heavy metals. **Desalination**, v.244, n.1-3, p.227-238, 2009.
- ALMEIDA, M. M.; PASTORE, G. M. Galactooligossacarídeos – Produção e efeitos benéficos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 35, n. 1-2, p. 12-19, 2001.
- ABIS. Associação Brasileira das Indústrias de Sorvete. Estatística, Histórico. Disponível em: <http://www.abis.com.br/>. Acesso em: 25 de maio 2013.
- ABRAHÃO, W.M.; ABRAHÃO, P.R. da S.; MONTEIRO, C.L.B.; PONTAROLO, R. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in cheese and ice cream produced in the State of Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.44, n.2, p.289-296, 2008.
- ALVAREZ, V. B.; WOLTERS, C. L.; VODOVOTZ, Y.; JI, T. Physical properties of ice cream containing milk protein concentrates. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, n. 3, p. 862-871, 2005.
- ALVES, L. L.; MATTANNA, P.; BECKER, L. V.; RICHARDS, N. S. P.S.; ANDRADE, D.F. Sensory evaluation of potentially symbiotic cream cheese using the surface response methodology. **Alimentos & Nutrição**, v.19, n.4, p. 409-416, 2008.
- ALIZADEH, M.; HAMED, M.; KHOSROSHAHI, A. Optimizing sensorial quality of Iranian white brine cheese using response surface methodology. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 4, p. 299-303, 2005.
- ANDRADE, V. T.; BRANDÃO, S. C. C.; ALVIM, T. C. Sorvete de doce de leite delactosado. In: XXI CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 2004, Juiz de Fora. Anais. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v. 59, n. 339, p. 126-130, 2004.
- ANDREWS A. T.; ALICHANIDIS E. Proteolysis of caseins and the proteose-peptone fraction of bovine milk. **Journal of Dairy Research**, v. 50, n.3, p. 275-290, 1983.

ANEMA, S.G.; LAUBER, S.; LEE, S.K.; HENLE, T.; KLOSTERMEYER, H. Rheological properties of acid gels prepared from pressure and transglutaminase treated skim milk. **Food Hydrocolloids**, v.19, p. 879-887, 2005.

ANTUNES, A. J. **Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino**. São Paulo: Manole Ltda., 150 p., 2003.

AOAC – **Official methods of analysis of AOAC International**. 18. ed. Mayland: AOAC International, 2005.

ARTEAGA, et al. Systematic experimental designs for product formula optimization. **Trends in Food Science & Technology**, v.5, p.243-253, 1994.

BABIKER, E. E. Effect of transglutaminase treatment on the functional properties of native and chymotrypsin-digested soy protein. **Food Chemistry**, v. 70, p. 139-145, 2000.

BAKKEN, A. B.; HILL, C. G. JR.; AMUNDSON, C. A. Hydrolysis of lactose in skim milk by immobilized β -galactosidase (*Bacillus circulance*). **Biotechnology and Bioengineering**, v. 39, n. 4, p. 409-417, 1992.

BANSAL, et al. Chemical synthesis and structure elucidation of bovine κ -casein (1-44). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 340, p. 1098-1103, 2006.

BLANCH, H. W.; CLARK, D. S. **Biochemical Engineering**. New York, Marcel Dekker, Inc. 1997.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Agência de Vigilância Sanitária, Portaria n. 25, de 04 de abril de 1988. Os produtos a base de edulcorantes, com ou sem adição de sacarose passa a denominar-se “Adoçantes *Dietéticos*”. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 04 de abr. 1988.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria n. 318 de 24 de novembro de 1995. Aprova o uso de sucralose com a função de edulcorante em alimentos e bebidas *dietéticas*; Diário

Oficial [da] República Federativa do Brasil., Brasília, n. 227, 25, p.194061, nov. 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Portaria n. 146, de 07/03/96. Diário Oficial da União, Brasília, 11/03/96, seção I, p. 3977-3986, 1996b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria n. 540, de 27 de outubro de 1997. Aprova o regulamento técnico: Aditivos alimentares – definições, classificação e emprego. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 28 de out. 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria n. 27, de 13 de janeiro de 1998. Aprova o regulamento técnico referente à informação nutricional complementar (declarações relacionadas ao conteúdo de nutrientes). Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, Seção 1, p. 1244, 16 de janeiro de 1998b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 379, de 26 de abril de 1999. Aprova o regulamento técnico referente a gelados comestíveis, preparados, pós para o preparo e bases para gelados comestíveis. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 29 abr. 1999.

BRASIL. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n. 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União, Poder Executivo, 10 de jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 20 de setembro de 2002. Aprova os Regulamentos Técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo... Diário Oficial da União, Brasília, 18 de Setembro de 2002. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 22. Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. Diário Oficial da União, Brasília, 14 abr. 2003a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC n. 348. Utilização de enzimas na indústria de alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 02 dez. 2003b.

BRASIL Ministério da Agricultura Agência de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 266, de 22 de setembro de 2005. Aprova o regulamento de gelatos comestíveis e preparados para gelados comestíveis. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 de set. 2005.

BRASIL, Ministério da Agricultura e Abastecimento. Secretaria de Defesa agropecuária Instrução Normativa n. 68, de 12 de dezembro de 2006 Métodos Analíticos Oficiais Físicos-Químico Para Controle de Leite e Derivados Lácteos. Diário Oficial da União – DOU 14 de dezembro de 2006.

BURRINGTON, K. J. The whey to nuytrition. Dairy Pipeline, vol. 14, n. 2, p. 01-03, 2000.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 3. ed., 2000. 751p.

CÂNDIDO, L. M. B.; CAMPOS, A. M. **Alimentos para fins especiais: dietéticos**. São Paulo: Varela, 2000.

CARMINATTI, C. A. **Ensaio de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando beta-galactosidase *Kluyveromyces lactis***. 79p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC. 2001.

COELHO, D. T.; ROCHA, J. A. A. **Práticas do processamento de produtos de origem animal**. Viçosa: UFV, 64p, 2005.

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

CUNHA, L. R. et al. Desenvolvimento e avaliação de embalagem ativa com incorporação de lactase. **Ciências, Tecnologia e Alimentação**, v. 27, p. 23-26, 2007.

CLARKE, C. **The science of ice cream**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 187p, 2004.

CHARLEY, H.; WEAVER, C. Milk. **In:** _____. Foods: a scientific approach. Upper Saddle River: Merrill Prentice Hall. v.19, p.308-323, 1998.

DALGLEISH, D. G. Casein micelles as colloids: surface structures and stabilities, **Journal Dairy Science**.v. 81, p.3013-3018, 1998.

DAMODARAN, S. Food proteins: an overview **In:** DAMODARAN, S.; PARAF, A. Food proteins and their applications. New York: Marcel Dekker, p.1-24. 1997.

DAMODARAN, S. Inhibition of ice crystal growth in ice cream mix by gelatin hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 26, p.10918-10923, 2007.

DE JONG, G. A. H.; KOPPERMAN, S. J. Transglutaminase catalyzed reactions: impact on food applications. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 8, p. 2798-2806, 2002.

DICKINSON, E.; YAMAMOTO, Y. Rheology of milk protein gels and protein-stabilized emulsion gels cross-linked with transglutaminase. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. v.44, 1371-377, 1996.

DUTCOSKY, S. D. Análise sensorial de alimentos e bebidas. 2. Ed. Curitiba: Champagnat, 239 p., 2007.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos**, 2 ed. São Paulo: Atheneu, 1998. 652p.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization/World Health Organization. **Report of a joint FAO/WHO Expert Consultation on Protein Quality Evaluation**, Maryland, USA, 1991.

FAERGEMAND, M.; OTTE, J.; QVIST, K.B. Emulsifying properties of milk proteins cross-linked with microbial transglutaminase. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 715-723, 1998.

FENEMA, O. R. **Química de Los alimentos**. Zaragoza, Espanha: Acibia, 1999.

FERRONATO, et al. Avaliação dos teores de lactose em iogurtes e leites fermentados produzidos no Paraná como subsídio para orientação nutricional de pacientes com intolerância à lactose. **In: XXI CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS**, 2004, Juiz de Fora. Anais. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 156-159, 2004.

FREELAND-GRAVES, J. H.; PECKHAM, G. C. **Foundations of food preparation**. 6. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 750p, 1996.

FRØST, et al. Sensory measurement of dynamic flavor intensity in ice cream with different fat levels and flavorings. **Food Quality and Preference**, v16, n.4, p.305-314, 2005.

GEKAS V; LÓPEZ-VEIVA, M. H. Hidrolysis of Lactose – a Literature Review. **Process Biochemistry**, v. 20, n.1, p.2-12, 1985.

GILLIES, D.G.; GREENLEY, K.R.; SUTCLIFFE, L.H. Esr/spin probe study of ice cream. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 14, p. 4943-4947, 2006.

GIST-BROCADES. Dairy Ingredients Group. Maxilact: the dairy yeast lactase. **In: Biotechnology contributing to food, health and the environment**. The Netherlands: Gist-Brocades BSD B,v.1, 12p, 2004.

GOFF, H. D. Colloidal aspects of ice cream. **Journal Dairy Science**, v.7, p. 363- 373, 1997.

GOFF, H. D. Formation and stabilisatio of structure in ice cream and related products. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**. v.7, p. 432-437, 2002.

GOFF, H. D. University of Guelph. **Dairy Science and Technology**. <http://www.foodsci.uoguelph.ca/dairyedu/home.html>. 10/05/2006.

GUINARD, J. X. Session III: addities, colours, flavours. Inc: BUCHHEIM, W. Ice Cream- Proceedings of the international sumposium held in Athens. International. Dairy Fed. P. 91-103, 1998.

GRANGER, et al. Influence of formulation on the structural networks in ice cream. **International Dairy Journal, Barking**, v. 15, n. 3, p. 255-262, 2005.

GRICE, H. C.; GOLDSMITH, L. A. Sucralose: an overview of the toxicity data. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, n. 2, p. 1-6, 2000.

GROSOVÁ, Z.; ROSENBERG, M.; REBROS, M. Perspectives and applications of immobilized α -galactosidase in food industry: a review. **Czech Journal of Food Science**, v. 26, n.1, p.1-4, 2008.

HAN, X-D.; DAMODARAN, S. Thermodynamic compatibility of substrate proteins affects their crosslinking by transglutaminase. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 44, p. 1211-1217, 1996.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C.; PAULA, H. Proteínas do soro de leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista da Nutrição**, Campinas, v. 19. p.479-488, 2006.

HARPER, W. J. Whey proteins. **Food Technology New Zealand**. v.19, n.1, p. 21-28, 1994.

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

HOLSINGER, V.H. Physical and chemical properties of lactose. In: Lactose, water, salts and vitamins. **Advanced Dairy Chemistry**, v. 3, p. 1-38, 1997

HONG, Y; CREAMER, L. K. Changed protein structures of bovine beta-lactoglobulin B and alfa-lactalbumin as a consequence of heat treatment. **International Dairy Journal**, v.12, p. 345-359, 2002.

HORNE, D. S. Casein micelles as hard spheres: limitations of the model in acidified gel formation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* v.213, p.255-263, 2003.

HUFFMAN, L. M. Processing whey protein for use as a food ingredient. **Food Technology**. v.50, n.2, p.49-52, 1996.

HUINONG, et al. Optimizing fermentation conditions for pilot plant production of microbial transglutaminase by *Streptomyces* sp. WJS-825. **Chinese Journal of Applied and Environmental Biology**, v.11, n. 1, p. 98-103, 2005.

IAMETTI, S.; DE GREGOR, B.; VECCHIO, G.; BONOMI, F. Modifications occur at different structural levels during the heat denaturation of β -lactoglobulin. **European Journal of Biochemistry**, v. 237, n.1, 106-112, 1996.

INOUE, K.; SHIOTA, K.; ITO, T. Preparation and properties of ice cream type frozen yogurt. **Journal Dairy Technology**, v. 52, p.44-51, 1998.

JAROS, et al. Transglutaminase in dairy products: chemistry, physics, applications. **Journal of Texture Studies**, v. 37, p. 113-155, 2006.

JAYAPRAKASHA, H. M.; BRUECKENER, H. Whey protein concentrate: a potential functional ingredient for food industry. **Journal Food Science Technology**. v.36, n.3, p.189- 204, 1999.

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZÓN, G.; VICARIA, J. M. et al. A new model proposed for hydrolysis of lactose by β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 31, p. 300-309. 2002.

KANAJI, T et al. Primary structure of microbial transglutaminase from *Streptoverticillium* sp. **Journal of Biological Chemistry**, n. 277, p. 11565-11572, 1993.

KOCIÁN, J. Lactose intolerance – mini review. **International Journal Biochemistry**, v. 20, n. 1, p.1-5, 1988.

KORHONEM, H.; MARNILA, P.; GILL, H. S. Milk immunoglobulins and complement factors. **British Journal of Nutrition**, v. 84, p. 75-80, 2000.

KUSSENDRAGER, K. D. and A. C. van Hooijdonk, 2000. Lactoperoxidase: Physico-chemical properties, occurrence mechanism of action and application. **British Journal of Nutrition**, v.84, p. 19-25.

KURAIISHI, C.; SAKAMOTO, J.; SOEDA, T. The usefulness of transglutaminase for food processing. **In** *Biotechnology for Improved Foods and Flavors* (G.R. Takeoka, R. Teranishi, P.J. Williams and A. Kobayashi, eds.) pp. 29–38, ACS Symposium Series 637, American Chemical Society, Columbus, OH, 1996.

KURAIISHI, C.; YAMAZAKI, K.; SUSA, Y. Transglutaminase: its utilization in the food industry. **Food Reviews. International**, v. 17, 221-246, 2001.

KRUIF, C.G.; TUINIER, R.; HOLT, C.; TIMMINS, P.A.; ROLLEMA, H.S. Physicochemical study of β - and κ -casein dispersions and the effect of cross-linking by transglutaminase. **Langmuir**, v. 18, p. 4885-4891, 2002.

LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCÍA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 583-592, 2000.

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

LEE, F.Y.; WHITE, C. H. Effect of ultrafiltration retentates and whey protein concentrates on ice cream quality during storage. **Journal Dairy Science.**, v.74, n.4, p. 1171-1180, 1991.

LIM, S. Y.; SWANSON, B. G.; ROSS, C. F.; CLARK, S. High hydrostatic pressure modification of whey protein concentrate for improve body and texture of lowfat ice cream. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, n. 4, p. 1308-1316, 2008.

LIVNEY, Y. D.; VERESPEJ, E.; DALGLEISH, D. G. Steric effects governing disulfide bond interchange during thermal aggregation in solutions of beta-lactoglobulin B and alpha-lactalbumin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.8098-8106, 2003.

LONGO, G. **Influência da adição de lactase na produção de iogurtes**, 2006. 89f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

LÓPEZ-VEIGA, M. H.; GUZMAN, N. Formation of Oligosaccharides During Enzymatic Hydrolysis of Milk Whey Permeates. **Process Biochemistry**, v. 30, n.8, p. 757-762, 1995.

LORENZEN, P. C.; SCHILIMME, E.; ROOS, N. Crosslinking of sodium caseinate by a microbial transglutaminase. **Nahrung**, v. 42, p. 151-154, 1998.

LORENZEN, P. C. Techno-functional properties of transglutaminase treated milk proteins. **Milchwissenschaft**, v. 55, p. 667-670, 2000.

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

MACEDO, G. A.; MATSUDA, L. K.; BATTESTIN, V. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos, **Revista Alimentos & Nutrição**, v.15, n.1, p.63-72, 2004.

MADRID, A.; CENZANO, I.; VICENTE, J. M. **Manual de indústrias dos alimentos**. Sao Paulo: Varela, 1996.

MAHAJAN, A.; DUA, S. Improvement of functional properties of rapessed (*Brassica campestris* var toria) meal by reducing antinutritional factors employing enzymatic modification. **Food Hydrocolloids**, v. 12, n. 3, p. 349-355, 1998.

MAHAUT, M., et al. **Productos lácteos industriales**. Zaragoza: Acribia, S.A., 177p, 2004.

MARSHALL, R. T.; GOFF, H. D.; HARTEL, R. W. **Ice cream**, 6th ed. New York: Kluwer Academic/ Plenum Publ., p. 366, 2003.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUI SAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, p.40, 1451-1463, 2007.

MATTHEWS et al. Systemic lactose intolerance: a new perspective on an old problem. **Postgraduate Medical Journal**, v. 81, p.167-73, 2005.

MCINTOSH, G. H.; LE LEU, R. K. The influence of *dietary* proteins on colon cancer risk. **Nutrition Research**, v. 21, p. 1053-1066, 2001.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B. T. **Sensory evaluation techniques**. 3ed. London: Boca Raton, CRC Press, 387p, 1999.

MENDONÇA et al. Características sensoriais de compotas de pêssego light elaboradas com sucralose e acesulfame-K. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25,401-407, 2005.

MLICHOVÁ, Z.; ROSENBER, M. Current trends of β -galactosidase application in food technology. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 45, n.2, p. 47-54, 2006.

MIKILITA, L, S. **Avaliação do estágio de adoção de boas práticas de fabricação pelas indústrias de sorvete da região metropolitana de Curitiba (PR): proposição de um plano de análise de perigos e pontos críticos de controle**, 2002. 172p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

MIKHEEVA, et al. Thermodynamics of micellization of bovine α -casein studied by high-sensitivity differential scanning calorimetry. **Langmuir**, v. 19, p.2913-2921, 2003.

MINIM, V. P. R. **Análise Sensorial: Estudos com consumidores**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 225p. 2006.

MORR, C. V.; FOEGEDING, E.A. Composition and functionality of commercial whey and milk protein concentrates and isolates: A status report. **Food Technology**, v.44, n.1, p.100-112, 1990.

MOSQUIM, M. C. A. **Fabricando sorvete com qualidade**. São Paulo: Varela, 1999. 62p.

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

MOUÉCOUCOU, et al. Polysaccharides reduce in vitro IgG/IgE-binding of β -lactoglobulin after hydrolysis. **Food. Chemistry**, v. 104, p. 1242-1249, 2007.

MULVIHILL D. M.; DONOVAN, M. Whey proteins and their thermal denaturation – a review. **Irish Journal of Food Science and Technology**, p. 11, 43-75, 1987.

NARAIN, N.; FERREIRA, D.S.; ARAGÃO, G.C.; ARAGÃO, W. M. Tecnologia do processamento do fruto. **In: SILVA JÚNIOR, J. F.; LÉDO, A. S. A cultura da mangaba. Aracajú: Embrapa Tabuleiros Costeiros**, v. 17, p. 221-232, 2006.

NEVES, M.F.; CASTRO, L. T.; BOMBIG, R. T.; FAZANARO, K. Mudanças no ambiente de vendas de insumos agropecuários. Disponível em: <<http://www.fanorpi.com.br/web/exercicios2003/Insumos%20Agrop ec.pdf>>. Acesso em: 2 março 2006.

NEILSEN, P. M. Reactions and potential industrial applications of transglutaminase. Review of literature and patents. **Food Biotechnology**. v.9, p.119-156, 1995.

NIEUWENHUIZEN et al. Modification of glutamine and lysine residues in holo and apo α -lactalbumin with microbial transglutaminase. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, n. 24, p. 7132-7139, 2003.

NONAKA, M.; TANAKA, H.; OKIYAMA, A.; MOTOKI, M.; ANDO, H.; UMEDA, K.; MATSURA, A. Polymerization of several proteins by Ca^{2+} - independent transglutaminase derived from microorganisms. **Journal Agricultural and Biological Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 2619-2623, 1989.

OBÓN, J. M et al. β Galactosidase immobilization for milk lactose hydrolysis: a simple experimental and modeling study of batch and continuous reactors. **Biochemical Education**, v. 28, p. 164-168, 2000.

O'CONNEL, J. E.; KRUIF, C.G. β -Casein micelles: cross-linking with transglutaminase. **Colloids and Surfaces A - Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 216, p. 75-81, 2003.

O'KENNEDY, B. The use of transglutaminase in food products. The Irish Scientist - Year Book, 2003. Disponível em: <http://www.irishscientist.ie/2003/contents.asp?contentxml=03p38b.xml&contentxsl=is03page36.xsl>/ Acesso: em 16/05/2006.

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

OLIVEIRA, C. C. M. **Produção de β -galactosidase por levedura recombinante - Desenvolvimento de um sistema de produção estável**. 2005, 100f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade do Minho, Braga, 2005.

ORDÓÑEZ, et al. **Tecnologia de Alimentos - Alimentos de Origem Animal**, Porto Alegre, Artmed, 2005, v. 2, 279p.

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

PACHECO, M.T. B.; DIAS, N. F.G.; BALDINI, V. L.; TANIKAWA, C.; AS SGARBIERI, V. C. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados protéicos de soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, p.333-338, 2005.

PARSONS, J. G.; DYBING, S. T.; CODER, D. S. Acceptability of ice cream made with processed wheys and sodium caseinate. **Journal Dairy Science**, v.68, n.11, p.2880- 2885, 1985.

PAULA, A.; NUNES, G. F. M.; FREITAS, L.; DE CASTRO, H. F.; SANTOS, J. C. Interesterification of milk and soybean oil blends catalyzed by immobilize *Rhizopus oryze* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 65, p. 117-121, 2010.

PEREDA, J. A. O.; RODRÍGUEZ, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G. D. G. F.; PERALES, L. H.; CORTECERO, M. D. S. **Tecnologia de alimentos**, São Paulo: Artmed, 2005. v.2

PINTERITS, A.; ARNTFIELD, S. D. Improvement of canola protein gelation properties through enzymatic modification with transglutaminase. **LWT e Food Science and Technology**, v.41, n.1, p.128-138, 2008.

PRATA, L. F. **Fundamentos da ciência do leite**. 1. ed. Jaboticabal: Funep – Unesp, 287 p., 2001.

PRIDIVILLE, E. A.; MARSHALL, R. T.; HEYMAN, H. Effect of Milk fat on the sensory properties of chocolate ice cream. **Journal Dairy Science**, v.82, p. 1425-1432, 1999.

PROZYN. **Prozyn Lactase**. São Paulo, 2004. 4p. Informação técnica.

ROBERFROID, M.R.; DELZENNE, N.M. *Dietary Fructans*. **Annual Review of Nutrition**, v.18, p. 117-143, 1999.

RODRIGUEZ-NOGALES, J.M. Enzymatic cross-linking of ewe's milk proteins by transglutaminase. **European Food Research and Technology**, v. 221, p. 692-699, 2005.

RODRIGUEZ-NOGALES, J. M. Enhancement of transglutaminase-induced protein cross-linking by preheat treatment of cows' milk: a statistical approach. **International Dairy Journal**, v.16, n.1, 26-32, 2006.

RORIZ, M. S.; OSMA, J. F.; TEIXEIRA, J. A.; COUTO, S. R. Application of response surface methodological approach to optimise Reactive Black 5 decolouration by crude lactase from *Trametes pubescens*. **Journal of Hazardous Materials**, v.169, n. 1-3, p. 691-696, 2009.

ROSANELI, C. F, BIGHETTI, A. E.; ANTÔNIO, M. A.; CARVALHO, J. E.; SGARBIERI, V. C. Protective effect of bovine milk whey protein concentrate on the ulcerative lesions caused by subcutaneous administration of indomethacin. **Journal Medicinal Food**, New Rochelle, v. 7, p. 309-314, 2004.

RUTTEN, A. A. C. M.; BOUWMAN, W. C. e LEEDEN, M. C. van der. β -Lactoglobulin as an ideal random polymer coil. **Colloids and**

SurfacesA: Physicochemical and Engineering Aspects, v.210, p.243-252, 2002.

SAKAMOTO, H.; KUMASAWA, Y.; MOTOKI, M. Strength of protein gels prepared with microbial transglutaminase as related to reaction conditions. **Journal of Food Science**, v. 59, n.4, p.866–871, 1994.

SANTIAGO, P.A; MARQUEZ, L. D. S.; VICELMA, L C.; RIBEIRO, E. J. Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 567-572, 2004.

SAWYER, L.; BARLOW, P. N.; BOLAND, M. J.; CREAMER, L. K.; DENTON, H.; EDWARDS, P. J.; HOLT, C.; JAMESON, G. B.; KONTOPIDIS, G.; NORRIS, G. E.; UHRINOVA, S.; WU, SU-Ying. Milk protein structure – What com it tell the dairy industry? **International Dairy Journal**, v.12, p.299-310, 2002.

SENSORY RECEPTION, Human. Encyclopædia Britannica, 2007. Encyclopædia Britannica Online. Disponível em: <<http://www.britannica.com/eb/article-64843>> Acesso em: 01 maio 2008.

SIEBER, R.; STRANSKY, M.; DEVRESE, M. Lactose intolerance and consumption of milk and milk products. **Zeitschrift fur Ernährungswissenschaft**. v. 36, p.375-393, 1997.

SILVA, K. **Sorvetes com diferentes produtos de soro de leite bovino: avaliações sensoriais, físico-químicas e ultra-estruturais**, 2004. 125f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade de Campinas. 2004.

SILVA, D. O.; CARDOSO, V. L. Hidrólise da lactose do soro de queijo utilizando a enzima galactosidase. Disponível em: <http://www.propp.ufu.br/revistaeletronica/edição2004/exatas/hidrolise_da_lactose.pDF>, acesso 26 fev. 2007.

SIMPSON, K. J.; NICHOLAS, K. R. The comparative biology of whey proteins. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v.7, p. 313-326, 2002.

SOLER, M. P.; VEIGA, P G. **Sorvetes**. Campinas: ITAL/CIAL, 68 p. (Especial, 1), 2001. Zaaragoza: Acribia S. A. 121p, 2002.

SHUKLA, T. P. β -Galactosidase technology. A solution to the lactose problem. **Critical Reviews in Food Technology**, v 1, p.325-356, 1975.

SCHORSCH, C.; CARRIE, H.; NORTON, I.T. Cross-linking casein micelles by a microbial transglutaminase conditions for formation of transglutaminase-induced gels. **International Dairy Journal**, v. 10, p. 519-528, 2000a.

SGARBIERE, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades degradações, modificações**, São Paulo: Livraria Varela, 1996.

SHAH, N. P.; FEDORAK, R. N.; JELEN, P. J. Food consistency effects of quarg in lactose malabsorption. **International Dairy Journal**, n. 2, p. 257-269, 1992.

SHARMA, R.; LORENZEN, P; G.; QVIST, K, B. Influence of transglutaminase treatment of skim milk on the formation of ϵ -(γ -glutamyl)Lysine) and the susceptibility of individual proteins towards crosslinking, **International Dairy Journal**, v. 11, n. 10, p. 785-783, 2001.

STONE, H.; McDERMOTT B. J.; SIDEL, J. L. The Importance of Sensory Analysis for the Evaluation of Quality. **Food Technology**, n. 5, p. 88-95, 1991.

TIRUMALESHA, A.; JAYAPRAKASHA, H. M. Effect of admixture of spray dried whey protein concentrate and butter milk powder on physico-chemical and sensory characteristics of ice cream. **Journal Dairy Science**, v.51, n.1, p.13-19, 1998.

TORNBERG, E.; PERSSON, K.; OLSSON, A. The structural and interfacial properties of food proteins in relation to their function in emulsions. **In: LARSSON, K. FRIBERG, S. Food emulsions**. 2nd ed. New York: Marcel, p.279-352, 1997.

TUOH, K. M.; PROBERT, H. M.; SMEJKAL, C. W.; GIBSON, G. R. Using probiotics and prebiotics to improve gut health, **Drug Discovery Today**, v.8, n.15, p.692-700, 2003.

TOMÁS, C. M. **Estudo da hidrólise da lactose por β -galactosidase na forma livre e imobilizada**. Uberlândia, 1998, 69p. Dissertação (Mestre em Engenharia Química), Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

TRGO, C. Factors, affecting texture of ice cream. In: MACHENNA, B. M. (ED.). **Texture in food: semi-solid foods**. Boca Raton, FL: CRC Press, v. 1, 448p., 2003.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. Santa Maria: Ed. da UFSN, 192p, 2003

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

UMBELINO, D. C. **Caracterização por Análise Descritiva Quantitativa e Análise Tempo-Intensidade de Suco e de Polpa de Manga (*Mangifera indica* L.) Adoçados com Diferentes Edulcorantes**. 2005, 190p. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. Introducción, **In:** Leche y productos lácteos: tecnología, química y microbiología (Serie Alimentos Básicos 1) Zaragoza: Acribia, v. 1, p. 1-44, 1994.

VERMUNT, S. H. F.; W, J.; SCHAAFSMA, G.; KARDINAAL, A. F. M. Effects of sugar intake on body weight: a review. **Obesity Reviews**, v. 2, n.4, p.91-99, 2003.

VIEIRA, D. C. **Imobilização da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos, SP, 2009.

VINHAL, E. F. **Hidrólise da lactose no leite por β -galactosidase de *Kuyveromyces fragilis***. 2001. 100 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, 2001.

VITOLLO, M. Aplicações de enzimas na tecnologia de alimentos. **In:** AQUARONE, E. (Coord.). *Biotecnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos*. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., v. 4, n.14, p. 387-420, 2001.

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

WAL, J. M. Bovine milk allergenicity. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. v. 93, p. 2-11, 2004.

WALSH, D. J.; CLEARY, D.; MCCARTHY, E.; MURPHY, S.; FITZGERALD, R. J. Modification of the nitrogen solubility properties of soy protein isolate following proteolysis and transglutaminase cross-linking. **Food Research International**, v. 36, p. 677-683, 2003.

WALSTRA, P.; JONKMAN, M. Emulsion and foam stabilization. **In:** INTERNATIONAL SYMPOSIUM HELD IN ATHENS, 1998. Brussels: International Dairy Federation, p. 60, 1998.

WALSTRA, P. Casein sub-micelles: do they exist? **International Dairy Journal**, p.9, p. 189-192, 1999.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy Science and Technology**. 2 ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group. 2006.

WALZEM, R. L.; DILLARD, C. J.; GERMAN, J. B. Whey components: Millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: What we Know and what we may be overlooking. *Critical. Rev. Food. Science Nutritional*. v. 42, n. 4, p. 353-375, 2002.

WILCOX, C.P.; SWAISGOOD, H.E. Modification of the rheological properties of whey protein isolate through the use of an immobilized microbial transglutaminase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5546-5551, 2002.

WRÓBLESWSKA, B.; JEDRYCHOWSKI, L.; HAJÓS, G.; SZABÓ. Influence of alcalase and transglutaminase on immunoreactivity of cow milk whey proteins. **Czech. Journal of Food Science**, v. 26, n. 1, p. 15-23, 2008.

YOKOYAMA, K.; NIO, N.; KIKUCHI, Y. Properties and applications of microbial transglutaminase. **Applications in Microbiological biotechnology**, v. 64, p. 447- 454, 2004.

ZHANG, H.; CHOI, H. J.; CANAZO, P.; HUANG, C. P. Multivariate approach to the Fenton process for the treatment of landfill leachate. **Journal of Hazardous Materials**, v. 161, p. 1306-1312, 2009.

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

CAPÍTULO 2

DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO DE SORVETE DE MORANGO *DIET* COM ADIÇÃO DE CONCENTRADO PROTÉICO DE SORO, LEITE EM PÓ INTEGRAL E EDULCORANTES: ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS, SENSORIAIS E FÍSICO-QUÍMICOS

RESUMO

Neste estudo foram desenvolvidas duas formulações iniciais, sendo uma denominada sorvete de morango *diet* I, com adição de concentrado proteico de soro e diferentes edulcorantes, e sorvete *diet* de morango com adição de leite em pó integral sem adição de edulcorante; e Sorvete *diet* de morango II com Concentrado Proteico de Soro e Sorvete com Leite em Pó Integral, ambas com adição de sucralose/acesulfame-k. Ambos foram produzidos com leite pasteurizado, padronizando o teor de gordura com creme de leite pasteurizado. O objetivo deste estudo foi definir a melhor mistura base para a produção do sorvete de morango *diet*. Na primeira formulação houve a adição de concentrado protéico de soro (CPSs, 10 %) e de edulcorantes (stévia, frutose, sucralose/acesulfame-k e sacarina/ciclamato); e na segunda formulação houve a adição de leite em pó integral (10 %) sem adição de edulcorantes. Foram realizadas avaliações microbiológicas, sensoriais e físico-químicas. O leite pasteurizado, o creme de leite e os sorvetes apresentaram qualidade microbiológica adequada, evidenciando o rigoroso controle durante todo o processamento, obtendo-se um produto de alta qualidade. A formulação mais aceita foi com adição de concentrado proteico de soro e sucralose-acesulfame-k. Na primeira formulação os sorvetes apresentaram diferenças físico-químicas significativas (Tukey, 5 %) para cinzas (1,17 % a 1,38 %), gordura (6,8 % a 8 %) e proteínas (0,83 % a 1,41 %); e a segunda formulação apresentou menor valor de gordura e ocorreu diferença estatística significativa (Tukey, 5%) em relação à acidez. A produção de sorvete de morango *diet* é uma alternativa viável e com boas propriedades físico-químicas.

Palavras-chave: alimentos funcionais, gelados comestíveis, controle de qualidade, segurança alimentar, análise sensorial.

**DEVELOPMENT OF DIET STRAWBERRY ICE CREAM
FORMULATION WITH THE ADDITION OF WHEY PROTEIN
CONCENTRATE, WHOLE MILK POWDER AND
SWEETENERS: MICROBIOLOGICAL, SENSORY AND
PHYSICO-CHEMICAL ASPECTS**

ABSTRACT

In this study two formulations were initially developed: diet strawberry ice cream I with the addition of whey protein concentrate and different sweeteners, and diet strawberry ice cream with the addition of whole milk powder without sweeteners; and diet strawberry ice cream II with whey protein concentrate and whole milk powder, both with the addition of sucralose/acesulfame-k. Both samples were produced with pasteurized milk, standardizing the fat content with pasteurized cream. The aim of this study was to define the best basic mixture for the production of diet strawberry ice cream. In the first formulation there was the addition of whey protein concentrate (WPC, 10 %) and of sweeteners (stevia, fructose, sucralose/acesulfame-k and saccharin/cyclamate) and in the second formulation there was the addition of whole milk powder (10 %) without the addition of sweeteners. Microbiological, sensory and physico-chemical evaluations were carried out. The pasteurized milk, cream and ice creams were of appropriate microbiological quality, verifying the rigorous control during the whole process, and a high quality product was obtained. The most accepted formulation was that with the addition of WPC and sucralose-acesulfame-k. In the first ice cream formulation significant differences (Tukey, 5 %) in the physico-chemical parameters ash (1.17 % to 1.38 %), fat (6.8 % to 8 %) and protein (0.83 % to 1.41 %) contents were observed and the second formulation presented lower values for fat content and there was a statistically significant difference (Tukey, 5 %) in relation to acidity. The production of diet strawberry ice cream is a viable alternative with good physico-chemical properties.

Keywords: functional foods, edible ices, quality control, food safety, sensory analysis.

2.1 INTRODUÇÃO

O sorvete é um produto complexo, com muitos ingredientes em distintos estados. É fabricado com uma emulsão estabilizada, também chamada de calda, pasteurizada, que por meio de um processo de congelamento mantém a coesão; além disso, sob agitação contínua (batimento) e incorporação de ar (*overrun*), produz uma substância cremosa, suave e agradável ao paladar. Essa emulsão é composta de produtos lácteos, água, gordura, açúcar, estabilizante, emulsificante, corante e aromatizante. Esse produto também é rico em vitaminas A, B1, B2, B6, C, D, E e K, cálcio, fósforo e outros minerais, sendo considerado alimento completo e de alto valor nutricional (SOUZA et al., 2010).

A Resolução RDC n. 266 de 22/09/05 (BRASIL, 2005) definiu como gelados comestíveis “os produtos congelados obtidos a partir de uma emulsão de gorduras e proteínas; ou de uma mistura de água e açúcar (es) que podem ser adicionados de outro (s) ingrediente (s) desde que não descaracterize (m) o produto”. Esse alimento é um dos derivados lácteos mais apreciados pela população em geral (ALVAREZ et al., 2005).

A crescente demanda por alimentos cada vez mais nutritivos, acessíveis e com menor custo de produção, torna o soro uma importante fonte de nutrientes nobres, passíveis de serem recuperados e empregados na elaboração de grande quantidade de produtos alimentícios (MAROULIS; SARAVACOS, 2008).

Os ingredientes alimentícios derivados das proteínas do soro são classificados como “concentrados”, quando o teor proteico total for de 25 a 80 %, ou como “isolados”, quando o teor proteico for superior a 90 %. Os concentrados proteicos de soro (CPS) são produtos derivados do soro de leite do qual a água, minerais e lactose foram retirados (VIDIGAL, 2012). O CPS tem-se mostrado um insumo interessante devido às suas propriedades funcionais como gelificação, aumento de viscosidade (VIDIGAL et al., 2009), solubilidade, adesão, emulsificação e aeração (EMAM-DJOME et al., 2008).

Quanto à sua aplicabilidade, os CPSs podem conferir propriedades funcionais e nutricionais de interesse em iogurtes, cremes de leite, manteigas e requeijões, entre outros, que apresentam custo diferenciado nas versões “light” (SILVA; BOLINI; ANTUNES, 2004). Diversos produtos têm surgido no mercado com a finalidade de substituir a sacarose em produtos lácteos, como resultado da crescente preocupação em reduzir o consumo de açúcares entre pessoas com

algum problema metabólico, como os diabéticos (CAPRILES; ARÊAS, 2005). Os edulcorantes são utilizados como substitutos da sacarose pela indústria de alimentos, ou mesmo domesticamente, pelos consumidores, no preparo de alimentos e bebidas “*diet*” ou “*light*”, pois alguns, por não serem metabolizados no organismo, não fornecem calorias; e outros, ainda que energéticos, por serem utilizados em quantidades mínimas, garantem um aporte calórico insignificante (BATTOCHIO et al. 2006).

O controle microbiológico de sorvetes é de fundamental importância, uma vez que não passa por processo de esterilização após seu preparo final, como acontece com outros alimentos, podendo-se constituir num veículo de disseminação de microrganismos (OLIVEIRA et al., 2012).

O envolvimento de sorvetes na transmissão de doenças tem sido demonstrado com frequência em países onde é realizado controle rigoroso de alimentos. Diversos patógenos podem ser veiculados nos sorvetes, por má pasteurização, contaminação durante a elaboração, armazenamento inadequado, distribuição, matéria-prima contaminada e falta de higiene em máquinas e utensílios. Esses micro-organismos podem causar problemas quando presentes nos alimentos, tanto do ponto de vista econômico, quanto de saúde. Entre esses micro-organismos estão os do grupo dos coliformes (Totais e Termotolerantes), os *Staphylococcus* sp, fungos filamentosos e leveduras e *Salmonella* sp (CDC, 2010).

O sucesso do alimento no mercado depende de seu desempenho entre os consumidores. Determinar a aceitação e/ou preferência do produto é indispensável no processo de desenvolvimento de novos produtos, bem como no melhoramento de processos e substituição de ingredientes, avaliando o grau em que os consumidores gostam ou desgostam de determinado produto. Geralmente após a realização dos testes afetivos, os dados são analisados estatisticamente por meio da análise de variância e testes de comparação de médias (STONE; SIDEL, 2004).

Do ponto de vista físico-químico, em geral o sorvete é constituído basicamente de 10 a 17 % de gordura, 8 a 12 % de extrato seco desengordurado, 12 a 17 % de açúcares ou adoçantes, 0,2 a 0,5 % de estabilizantes e emulsificantes e 55 a 65 % de água. Cada componente contribui em aspectos particulares nas características do produto final (QUEIROZ et al., 2009).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver sorvetes de morango *diet* acrescido de concentrado proteico de soro com edulcorantes (stévia, sucralose/acessulfame-k, sacarina/ciclamato e frutose) e avaliar as

características microbiológicas, sensoriais e físico-químicas dessas formulações, visando a obter um produto de baixo custo, de alto valor nutricional e funcional, baixo valor calórico e alta qualidade microbiológica.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Materiais

Os sorvetes foram elaborados no Laboratório de Laticínios e as análises físico-químicas do leite pasteurizado, creme de leite e dos sorvetes foram realizadas nos Laboratórios de Laticínios e Análise de Alimentos, ambos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus de Medianeira.

As formulações foram denominadas sorvete de morango *diet* (com concentrado proteico de soro, edulcorantes stévia, sucralose/acesulfame-k, ciclamato/sacarina, frutose e sorvete com leite em pó integral sem adição de edulcorantes (figura 1), e sorvete *diet* de morango II com concentrado proteico de soro e sorvete com leite em pó integral, ambas com adição de sucralose/acesulfame-k (figura 2). Os sorvetes de morango *diet* I e II foram produzidos por processo descontínuo (BRASIL, 2003a), cujas etapas do processamento para ambas as formulações estão especificadas no fluxograma (figura 3).

Figura 1 - Fluxograma da formulação do sorvete de morango *diet* I com concentrado proteico de soro (CPS) e edulcorantes e sorvete com leite em pó integral sem adição de edulcorantes.

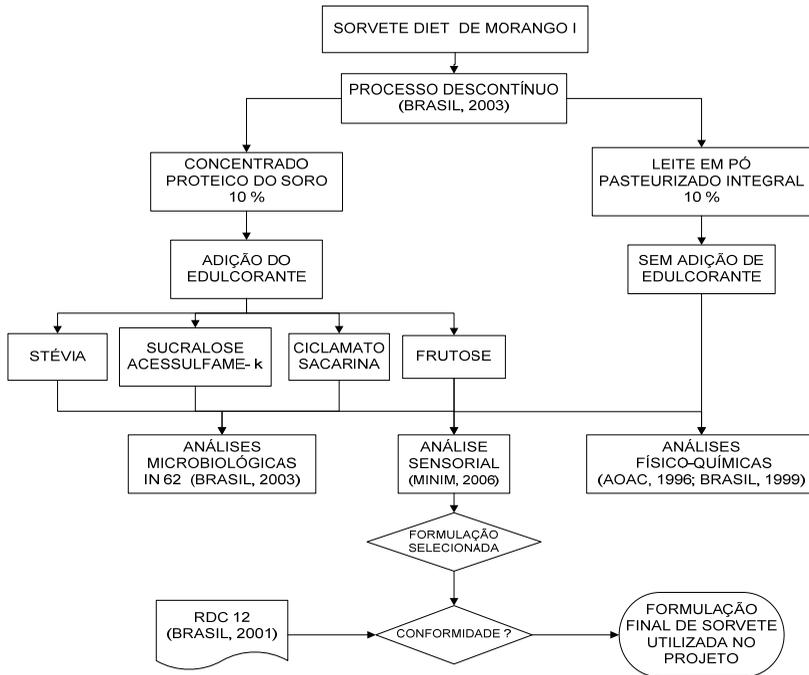


Figura 2 - Fluxograma de formulação do sorvete de morango *diet* II com concentrado proteico de soro (CPS) e sorvete com leite em pó integral, ambas com adição de sucralose/acesulfame-k.

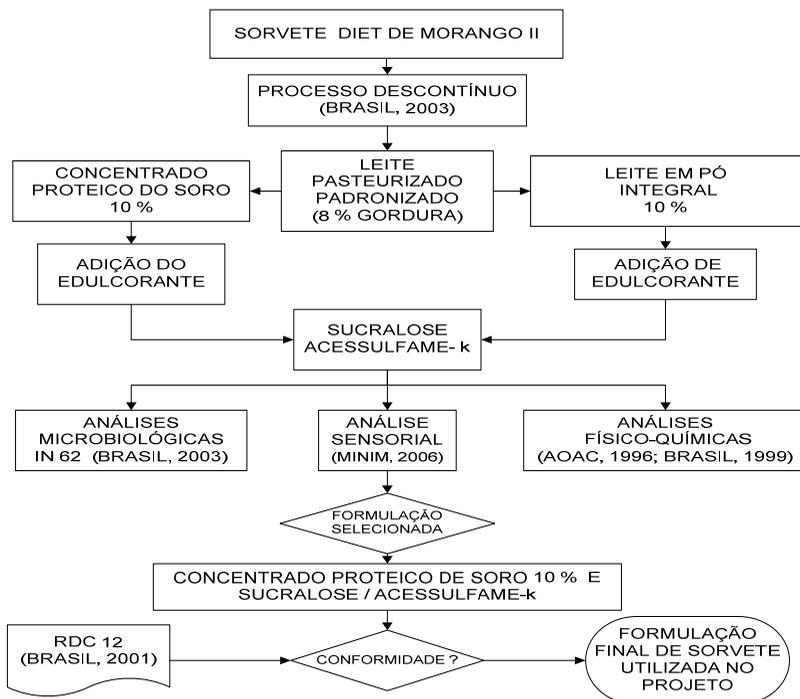
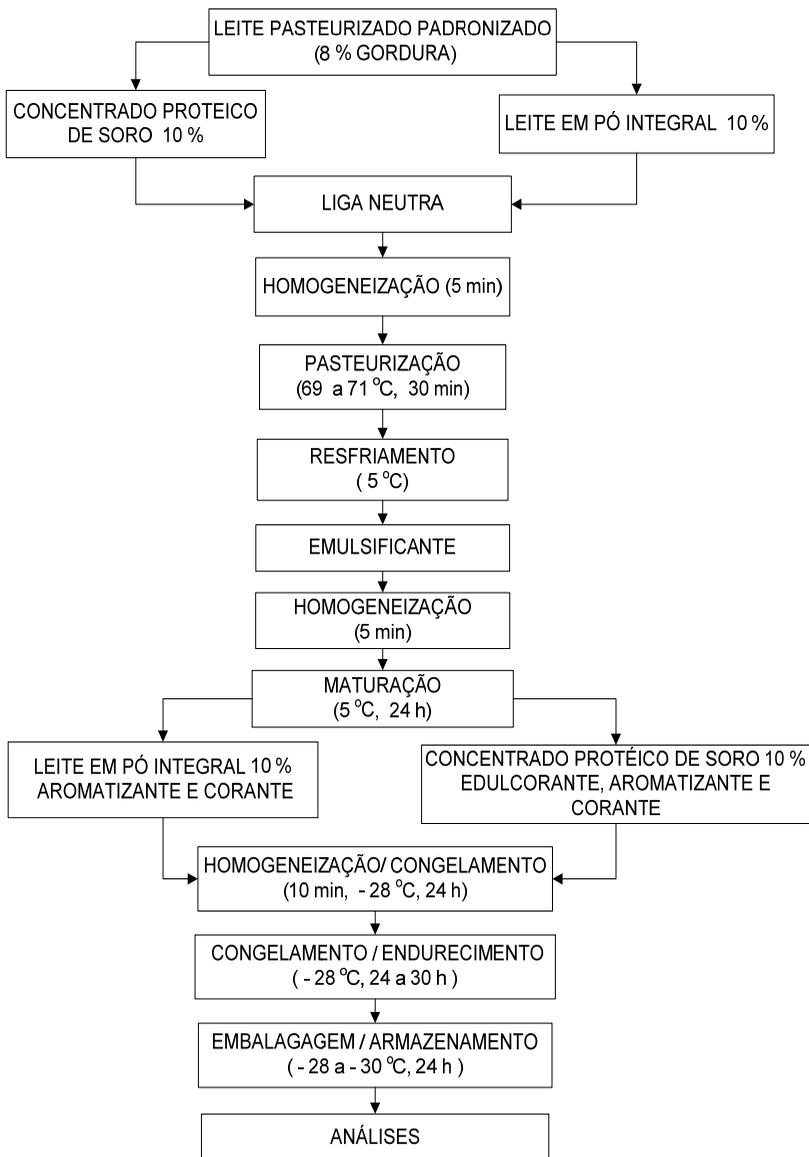


Figura 3 - Fluxograma de fabricação da formulação de sorvete de morango diet I e II por processo descontínuo.



2.2.2 Matérias-primas

Para a formulação base de cada amostra de sorvete foram utilizados 2 litros leite pasteurizado homogeneizado, leite em pó integral, creme de leite (utilizado para padronizar o leite), concentrado proteico de soro (CPSs)[®] (Sooro, Brasil), estabilizante superliga neutra[®] (Duas Rodas, Brasil), emulsificante emustab[®] (Duas Rodas, Brasil), edulcorantes: (stévia, frutose, sucralose/acessulfame-k e sacarina/ciclamato[®] (Gemacom, Brasil), sabor morango algemix[®] (Duas Rodas, Brasil), corante carmin de colchonilha[®] (Gemacom, Brasil) e aroma de morango[®] (Givaudan, Brasil). Foram elaboradas cinco diferentes formulações de sorvete de morango *diet* I, codificadas como: sorvete com concentrado proteico de soro (CPS) e stévia (F1), sorvete com adição de CPS e sucralose/acessulfame-k (F2), sorvete com adição de CPS e sacarina/ciclamato (F3), sorvete com adição de CPS e frutose (F4), sorvete com leite em pó integral e sem edulcorante (F5), como se vê na Tabela 1.

Tabela 1 - Percentual dos ingredientes utilizados nas cinco diferentes formulações de sorvete de morango *diet* I.

Ingredientes	F1	F2	F3	F4	F5
Stévia*	0,85%	-	-	-	-
Sucralose/Acessulfame-k*	-	0,65%	-	-	-
Sacarina/Ciclamato*	-	-	0,85%	-	-
Frutose*	-	-	-	0,5%	-
Leite em pó	-	-	-	-	10%
Concentrado proteico de soro (CPS)	10%	10%	10%	10%	-
Sabor morango	2%	2%	2%	2%	2%
Liga neutra	0,3%	0,3 %	0,3 %	0,3%	0,3%
Emulsificante (Emustab)	0,2%	0,2 %	0,2 %	0,2%	0,2%
Aroma	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%
Corante carmin de colchonilha	0,7%	0,7%	0,7%	0,7%	0,7%
Leite padronizado 8% gordura	85,9%	86,1%	85,9%	86,25%	86,75%

(*) q.s.p quantidade suficiente para obter o efeito desejado

(-) sem adição

2.2.3 Elaboração do sorvete

Na elaboração dos produtos inicialmente todos os ingredientes secos foram adicionados ao leite. Todas as formulações foram submetidas a tratamento térmico de 69 a 71 °C por 30 minutos, e resfriado para 5 °C; adicionou-se o emustab homogeneizando-o por 5 minutos. A seguir o mix foi colocado para maturar por 24 horas à temperatura de 5 °C. Após a maturação, foram adicionados ao mix: aroma, sabor, edulcorante e corante, homogeneizando-o por 5 minutos. O mix foi colocado no compartimento da sorveteria de marca Skynsem®, para bater até atingir o ponto, sendo levadas para congelamento final em *freezer* de - 25 °C a - 30 °C (figura 3).

2.2.4 Análises microbiológicas

O leite pasteurizado homogeneizado foi submetido às seguintes análises microbiológicas: contagem mesófilos aeróbios, contagem de coliformes a 35 °C, contagens de coliformes a 45 °C e contagem de psicotróficos. O creme de leite passou pelas seguintes análises: contagem mesófilos aeróbios, contagem coliformes a 35 °C, contagem coliformes a 45 °C, contagem *Staphylococcus coagulase* positiva, contagem microrganismos psicotróficos e contagem de bolores e leveduras. Em todas as formulações de sorvete foram analisados coliformes a 45 °C, *Salmonella sp/25g*, *Staphylococcus aureus coagulase* positiva. Todas as análises no leite pasteurizado homogeneizado, no creme de leite e nas formulações de sorvete foram realizadas segundo metodologia descrita na Instrução Normativa n. 62 (BRASIL, 2003). E os resultados foram analisados segundo a RDC n. 12 (BRASIL, 2001). Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

2.2.5 Análise sensorial

As análises sensoriais foram realizadas no laboratório de análise sensorial da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus de Medianeira. As amostras, em quantidade suficiente e à temperatura ambiente, foram avaliadas em dois horários - de manhã (08:00 horas às 10:00 horas) e à tarde (13:30 horas às 16:30 horas) - em cabines individuais iluminadas com luz branca, utilizando 160 provadores não treinados e consumidores regulares de sorvete, de ambos os sexos, com idade entre 18 e 50 anos. Todas as amostras foram servidas em copos brancos descartáveis de 50 mL, devidamente codificados com números

aleatórios de três dígitos, acompanhados por um copo de 200 mL contendo água destilada para remoção de algum sabor residual. Cada provador recebeu uma ficha com as instruções e a escala do ideal (Apêndice A).

A formulação de sorvete com o edulcorante que mais se aproximou do ideal foi escolhida e duas novas formulações – com leite em pó integral denominada (F-LP) e com concentrado proteico de soro de leite (F-CPS) – foram elaboradas (tabela 2) seguindo os mesmos procedimentos de fabricação descritos para as demais formulações.

Tabela 2 - Percentual dos ingredientes utilizados nas duas formulações de sorvete de morango *diet* II, adoçadas com sucralose/acessulfame-k, produzidas com leite em pó (F-LP) e concentrado proteico de soro (F-CPSs).

Ingredientes	F-LP	F-CPSs
Sucralose-acessulfame-k	0,65%	0,65%
Leite em pó	10%	-
Concentrado proteico de soro (CPSs)	-	10%
Sabor morango	2%	2%
Liga neutra	0,3%	0,3%
Emulsificante (Emustab)	0,2%	0,2%
Aroma	0,05%	0,05%
Leite padronizado 8% gordura	86,6%	86,8%

(-) sem adição

Para comparar a formulação F-LP e F-CPS, foram seguidos os mesmos procedimentos descritos para a análise anterior, utilizando-se 163 provadores não treinados. Os sorvetes foram avaliados por meio da escala hedônica de nove pontos para os atributos de sabor, textura, aparência, cor e avaliação global, (Apêndice B), utilizando-se esse teste para a avaliação sensorial por consumidor, conforme descrito por (MINIM, 2010).

2.2.6 Análises físico-químicas

O leite pasteurizado utilizado para fabricar o sorvete foi submetido às análises físico-químicas de pH, densidade, crioscopia, gordura, EST (extato seco total), ESD (extrato seco desengordurado), acidez,

Peroxidase e fosfatase; e do creme de leite foram analisados: pH, acidez, gordura e viscosidade, seguindo a metodologia descrita em (BRASIL, 2006). Todas as análises foram realizadas em triplicatas, cujos resultados foram comparados com os padrões estabelecidos pela IN 51, 2002 (BRASIL, 2002).

As análises físico-químicas de pH, densidade, umidade, EST (extato seco total), ESD (extrato seco desengordurado), cinzas, gordura, acidez, açúcares redutores (glicose %) e açúcares não-redutores (sacarose %) e proteína foram realizadas nas amostras de sorvete segundo a metodologia descrita na Instrução normativa n. 68 (BRASIL, 2006). Todas as determinações foram realizadas em triplicatas.

2.2.7 Análises estatísticas

Os resultados da escala do ideal foram avaliados com base na estatística descritiva, e os da hedônica por meio do teste não paramétrico de Mann Whitney utilizando o Software Assitat 7.6 beta (SILVA; AZEVEDO 2009), sendo calculados os coeficientes de concordância dos provadores para todos os resultados conforme descrito por (SILVA; DUARTE; CAVALCANTI-MATA, 2010) por meio do Software consensor (SILVA; AZEVEDO 2009).

Os resultados das análises físico-químicas foram submetidos ao Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) – ANOVA. Comparação de médias pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de significância ($p < 0,05$).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Avaliação microbiológica

Os resultados obtidos nas análises microbiológicas do leite pasteurizado homogeneizado e do creme de leite são mostrados na tabela 3. Observa-se que todas as análises do leite pasteurizado homogeneizado e do creme de leite seguiram os padrões estabelecidos pela legislação vigente (BRASIL, 2001).

Os resultados microbiológicos do leite pasteurizado homogeneizado e do creme de leite (tabela 3) demonstram que os binômios tempo-temperatura de pasteurização, utilização de insumos de boa qualidade e higiene dos equipamentos foram adequados durante todo o processo. O monitoramento da qualidade da matéria-prima inicial e o controle de todo o processamento foi rigoroso, visando a oferecer ao consumidor, segurança e tranquilidade para comprar um produto

alternativo como alimento de baixo valor calórico, baixo custo, nutricional e funcional e com boa qualidade microbiológica.

Tabela 3 - Resultado das análises microbiológicas do leite pasteurizado padronizado e do creme de leite utilizados na fabricação de sorvete de morango *diet* I e II.

Análises microbiológicas	Leite pasteurizado	Creme de leite
Contagem aeróbios mesófilos viáveis (UFC/mL) (UFC/g)	< 10	< 10
Contagem de coliformes 35 °C (UFC/mL) (UFC/g)	< 10	< 10
Contagem de coliformes 45 °C (UFC/mL) (UFC/g)	< 10	< 10
Contagem de micro-organismos psicrótróficos (UFC/mL) (UFC/g)	< 10	< 10
Contagem de <i>Staphylococcus coagulase positiva</i> (UFC/g)	< 10	< 10
Contagem de bolores e leveduras (UFC/g)	< 10	< 10
Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp/25g (UFC/g)	Ausência em 25g	Ausência em 25g

A tabela 4 mostra os resultados obtidos nas análises microbiológicas das cinco formulações de sorvete de morango *diet*.

Todas as formulações de sorvete apresentaram-se dentro dos padrões estabelecidos pela legislação vigente no Brasil, que é de 5×10 NMP/g para contagem de coliformes a 45 °C e para a Pesquisa de *Salmonella* sp (BRASIL, 2001). Observa-se ausência de *Staphylococcus aureus* *coagulase positiva* em todas as formulações de sorvete, o que se atribui às boas práticas de fabricação no processamento.

Tabela 4 - Resultados das análises microbiológicas das cinco formulações de sorvete de morango *diet* produzidas com concentrado protéico de soro (CPS) e adição de edulcorantes e leite em pó integral sem adição de edulcorante.

Análises Microbiológicas	F1	F2	F3	F4	F5
Contagem de coliformes a 45 °C (NMP/g)	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
Contagem staphylococcus aureus coagulase positiva (NMP/g)	< 10 ²				
Pesquisa de salmonella sp/25g (NMP/g)	ausência em 25g				

2.3.2 Avaliação sensorial

O teste de ordenação da preferência mostrou que as formulações contendo stévia (F1), sucralose/acessulfame-k (F2) e ciclamato e sacarina (F3) não diferiram entre si, mas diferiram da amostra contendo frutose (F4) e sem adição de edulcorantes (produto padrão – F5), conforme se observa na tabela 5.

Tabela 5 - Resultados dos testes sensoriais realizados com os 160 provadores para as cinco diferentes formulações de sorvete de morango *diet* I avaliadas.

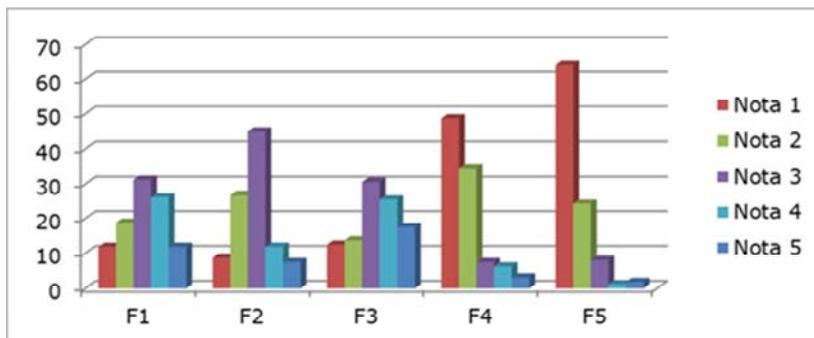
Formulações	Ordenação da Preferência	Média Ideal	Percentual de Ideal	Coefficiente de Concordância entre os provadores
F1	352 ^b	3,075	31,25%	19,34%
F2	340 ^b	3,285	45,00%	35,73%
F3	424 ^b	3,219	30,62%	17,54%
F4	613 ^a	1,806	07,50%	45,60%
F5	681 ^a	1,519	08,12%	59,26%

Obs.: Valores de soma de ordens seguidos por letras distintas diferem estatisticamente em 5 % ($p < 0,05$), baseado no teste de Friedman (Newell e MacFarlane, 1987). Coeficiente de concordância calculado de acordo com SILVA; DUARTE; CAVALCANTI-MATA (2010).

Quanto à média ideal, as três primeiras formulações obtiveram médias próximas ao valor 3, o que significa proximidade da doçura ideal na escala utilizada (tabela 5). Observou-se que o adoçante sucralose/acessulfame-k (F2) apresentou ligeira preferência, pois 45 % dos provadores consideraram a doçura dessa formulação como sendo ideal num coeficiente de consenso entre eles de 35,73 %, superior aos encontrados para as formulações F1 e F3.

Quanto à avaliação do sabor doce pelos avaliadores, as formulações F4 e F5 ficaram menos doces que o ideal, apresentando percentuais muito baixos de ideal e coeficientes de consenso bastante elevados, maiores que os encontrados para as outras formulações (figura 6). A distribuição de frequências nas cinco formulações de sorvete de morango *diet* é mostrada na figura 4.

Figura 4 - Distribuição das frequências para as cinco formulações de sorvete de morango *diet* I.



Percentual de notas com base na escala do ideal (1 = Muito menos doce que o ideal, 2 = Menos doce que o ideal, 3 = Ideal, 4 = Mais doce que o ideal, 5 = Muito mais doce que o ideal), para o sorvete de morango *diet* nas cinco formulações avaliadas.

Neste experimento, como os valores das notas da avaliação sensorial hedônica não obedeceram aos pressupostos necessários para realizar análise de variância e o teste de Tukey (tabela 6), foram avaliados por meio do teste não-paramétrico de Mann Whitney. Observou-se diferença significativa entre as médias apresentadas para cremosidade dos sorvetes, em que o sorvete formulado com concentrado Proteico de soro de leite (F2-CPS) mostrou-se superior ao F2-LP (tabela 6). As formulações não diferiram estatisticamente nos demais atributos sensoriais avaliados.

Tabela 6 - Resultados dos testes sensoriais realizados com os 163 provadores comparando as formulações de sorvete de morango *diet* adoçadas com sucralose /acesulfame-k, produzidas com leite em pó integral (F2-LP) e concentrado proteico de soro (F2-CPS).

Atributos sensoriais	Escala hedônica média ± Desvio padrão*		Percentual de aceitação		Coeficiente de concordância**	
	F2-LP	F2- CPSs	F2-LP	F2- CPSs	F2-LP	F2- CPSs
Sabor	6,69 ± 1,94 ^a	6,37 ± 2,00 ^a	77,91	76,07	26,07	26,26
Aparência	6,71 ± 1,78 ^a	7,06 ± 1,50 ^a	72,39	82,82	26,57	31,54
Creinosid.	6,48 ± 1,88 ^b	6,96 ± 1,57 ^a	76,07	82,82	26,07	31,71
Cor	7,02 ± 1,55 ^a	7,16 ± 1,44 ^a	80,98	82,82	29,83	33,21
Aroma	6,98 ± 1,53 ^a	6,66 ± 1,76 ^a	79,75	74,84	30,91	25,59
Aval. Global	6,77 ± 1,59 ^a	6,72 ± 1,73 ^a	82,82	82,20	33,12	30,36

* Valores médios seguidos por letras distintas diferem estatisticamente em 5% de probabilidade ($p < 0,05$) pelo teste não paramétrico de Mann Witney.

** Coeficiente de concordância (SILVA; DUARTE; CAVALCANTI-MATA, 2010).

Os percentuais de aceitação foram superiores a 70 % para todos os atributos avaliados, percentual considerado o mínimo recomendável (MININ, 2010) para aceitação de um produto pelo mercado consumidor, sendo assim, o produto seria bem aceito e que as duas formulações adoçadas com sucralose/acesulfame-k avaliadas poderiam ser comercializadas.

Os coeficientes de concordância entre os provadores foram superiores para aparência, cremosidade e cor da formulação produzida com concentrado proteico de soro de leite. O aroma da formulação com leite em pó pareceu ser levemente preferido, mas sem diferença significativa para média desse atributo.

A viabilidade de utilização do concentrado proteico de soro no sorvete, como substituto de sólidos não gordurosos do leite, ficou evidente pelo aumento da viscosidade, cremosidade e resistência ao derretimento.

Observou-se que a formulação do sorvete de morango *diet* preferido pela escala do ideal (F2) adoçado com sucralose/acesulfame-k produzido com concentrado proteico de soro foi estatisticamente superior em 5 % de probabilidade com base no teste de Kramer de Soma

de ordens (KRAMER et al., 1974), tendo obtido um valor de soma de ordens de 492, enquanto a formulação com leite em pó apresentou um valor de soma de ordens de 660.

2.3.3 Avaliação físico-química

Na Tabela 7, as análises físico-químicas do leite pasteurizado e do creme de leite utilizados na fabricação do sorvete de morango *diet* I e II.

Tabela 7 - Resultados das análises físico-químicas do leite pasteurizado e do creme de leite utilizados na fabricação dos sorvetes de morango *diet* I e II.

Análises	Leite pasteurizado		Creme de leite	
	Sorvete I	Sorvete II	Sorvete I	SorveteII
pH	6,68	6,65	6,75	6,76
Densidade (15/15°C,g/mL)	1,032	1,032	-	-
Crioscopia (°H)	-0,535	-0,534	-	-
Gordura g/100g)	3,0	3,1	40	41
EST %	11,86	11,98	-	-
ESD %	8,86	8,88	-	-
Acidez °D	15	15	0,12	0,13
Peroxidase	+	+	+	+
Fosfatase	-	-	-	-
Viscosidade (cp)	-	-	9000	9000

EST= Extrato seco total; ESD = Extrato seco desengordurado

(-) não determinado

Todos os resultados das análises físico-químicas do leite pasteurizado e do creme de leite utilizados na fabricação do sorvete de morango *diet* I e II estão dentro dos padrões estabelecidos pela Instrução Normativa 51 (BRASIL, 2002) para leite pasteurizado e legislação (BRASIL, 1996b) para creme de leite, indicando matérias-primas de excelente qualidade.

Os resultados das análises físico-químicas da fabricação de sorvete de morango *diet* produzido com concentrado proteico de soro

(CPSs) com edulcorantes e leite em pó integral sem adição de edulcorante encontram-se na tabela 8.

Tabela 8 - Resultados das análises físico-químicas da fabricação de sorvete de morango *diet* produzido com concentrado proteico de soro (CPS) com adição de edulcorantes e leite em pó integral sem adição de edulcorante.

MÉDIAS	F1	F2	F3	F4	F5
Umidade (%)	74,85 ^a	74,73 ^a	74,25 ^a	74,21 ^a	74,69 ^a
ESD (%)	14,15 ^a	18,27 ^a	19,25 ^a	18,99 ^a	18,01 ^a
EST (%)	22,15 ^a	25,27 ^a	25,75 ^a	25,79 ^a	25,31 ^a
Cinzas (%)	1,38 ^a	1,28 ^b	1,22 ^c	1,26 ^{bc}	1,17 ^d
Gordura (%)	8 ^a	7 ^c	6,5 ^d	6,8 ^c	7,3 ^b
Proteína (%)	1,41 ^a	1,02 ^b	0,98 ^b	0,83 ^c	1,04 ^d
Acidez (%)	0,081 ^a	0,084 ^a	0,084 ^a	0,082 ^a	0,083 ^a
Açúcares Redutores (glicose %)	7,69 ^a	7,3 ^a	7,93 ^a	9,02 ^a	8,06 ^a
Açúcares não redutores (sacarose %)	18,93 ^a	19,29 ^a	19,05 ^a	18,99 ^a	19,29 ^a

Formulações: F1 Sorvete com concentrado proteico de soro (CPSs) e stévia; F2 Sorvete com adição de (CPS) e sucralose/acesulfame-k; F3 Sorvete com adição de (CPSs) e sacarina/ciclamato; F4 Sorvete com adição de (CPS) e frutose; F5 Sorvete com leite em pó integral e sem edulcorante.

As cinco formulações de sorvete apresentaram diferenças significativas em ($P < 0,05$) para o teor de cinzas e de gordura (tabela 9). As cinzas variaram de 1,17 % a 1,38 %, apresentando maior teor na F1, que está diretamente relacionado ao maior teor de sólidos totais, proteínas e gordura que enriquecem nutricionalmente o produto.

Nas formulações F2, F3 e F4, os teores de cinzas diminuíram, apresentando menores teores de gordura e proteínas, à exceção da formulação F5 que apresentou teor de gordura elevado e cinzas mais baixo, porque não foi substituído o leite em pó integral, sendo que a principal contribuição de minerais em sorvetes e outros derivados lácteos é proveniente do cálcio e do fósforo presentes no leite (SGARBIERI et al., 2012). A variação do conteúdo de proteínas e

gordura das formulações situou-se entre 0,83 % a 1,41 % e 6,8 % a 8 %, respectivamente, apresentando diferenças significativas, em ($P < 0,05$), mostrando relação direta entre os teores de sólidos totais das amostras. As proteínas, importantes parâmetros responsáveis pela funcionalidade e pelo valor nutricional dos produtos de soro, contribuem muito para o desenvolvimento da estrutura do sorvete e influenciam a emulsificação, batimento e capacidade de retenção de água (CORREIA et al., 2007, SILVEIRA et al., 2009)

Os demais componentes analisados em todas as formulações foram considerados estatisticamente semelhantes; a umidade de todas as formulações variou de 74,21 % a 74,85 %, estando de acordo com Soler & Veiga (2001), para os quais a substituição ou ausência de sacarose diminui o teor de umidade. Em todas as formulações, o teor de ESD (extrato seco desengordurado) variou de 14,14 % a 19,25 %. O teor de EST (extrato seco total) das formulações variou de 22,15 % a 25,79 %, também não diferindo entre si. Segundo Clarke (2004), os sorvetes convencionais formulados com leite apresentam teor de sólidos totais entre 28 % e 40 %. O baixo teor de EST obtido nas formulações F1, F2, F3, F4 se justifica pela substituição da sacarose por edulcorantes, e na F5 não foi colocado edulcorante e sacarose. O valor de acidez nas formulações foi de 0,08 %, não diferindo entre si estatisticamente. Os resultados dos açúcares redutores variaram entre as formulações de 7,3 % a 9,02 % e açúcares não-redutores de 18,93 % a 19,29 %, não diferindo estatisticamente entre si.

A análise sensorial das cinco formulações de sorvete de morango *diet* (tabela 5) mostrou que a formulação com adição de concentrado proteico de soro (CPS) e sucralose/acessulfame- k (F2) foi a que mais se aproximou do ideal.

Com base nesses resultados foram elaboradas duas formulações de sorvete de morango *diet*: com adição de leite em pó integral e concentrado protéico de soro (CPS), ambas adicionadas de sucralose/acessulfame-k (melhor edulcorante segundo os provadores). Realizaram-se os mesmos procedimentos de fabricação descritos anteriormente. As formulações foram denominadas sorvete com adição de sucralose/acessulfame-k e leite em pó integral (F1-LP) e sorvete com adição de sucralose e acessulfame-k e concentrado proteico de soro de leite (F2- CPS).

Na Tabela 9, resultados das análises físico-químicas da fabricação de sorvete de morango *diet* com adição de

sucralose/acesulfame-k, produzidas com leite em Pó (F1-LP) e concentrado proteico de soro (F2-CPS).

Tabela 9 - Resultados das análises físico-químicas da fabricação de sorvete de morango *diet* com adição de sucralose/acesulfame-k, produzido com leite em pó integral (F1-LP) e concentrado proteico de soro (F2-CPS).

MÉDIAS	F1-LP	F2-CPS _s
Umidade (%)	75,17 ^a	74,64 ^a
Sólidos Totais (%)	24,83 ^a	25,36 ^a
Cinzas (%)	1,31 ^a	1,32 ^a
Gordura (%)	7,4 ^a	4,3 ^b
Proteína (%)	6,2 ^a	7,5 ^a
Acidez (%)	3,31 ^b	4,14 ^a
Açúcares redutores (glicose %)	22,51 ^a	22,52 ^a
Açúcares não redutores (sacarose %)	26,51 ^a	21,64 ^a

Testes estatísticos realizados: Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) – ANOVA.

Comparação de médias pelo teste de Tukey em 5% de significância ($p < 0,05$).

De acordo com os resultados (tabela 9), o teor de umidade e de sólidos totais das formulações não diferiu significativamente ($P > 0,05$). As duas formulações apresentaram níveis semelhantes de açúcares redutores, açúcares não-redutores e cinzas e não se diferiram estatisticamente ($p < 0,05$).

O menor valor de gordura foi obtido na formulação F2-CPS (Tabela 9), o que se explica pela combinação similar de substituto do leite em pó pelo concentrado proteico de soro de leite e sacarose nesses produtos.

A concentração de proteína não diferiu significativamente entre as formulações (tabela 9) com a substituição da gordura nessas formulações por concentrado proteico de soro de leite e leite em pó. Quanto à acidez titulável das formulações, houve significativa diferença estatística ($P < 0,05$). O maior valor foi observado em F2-CPS, que

difere da F1-LP pela substituição do leite em pó por concentrado proteico de soro de leite e da sacarose por sucralose/acessulfame-k.

2.4 CONCLUSÃO

A qualidade microbiológica dos ingredientes (leite pasteurizado e creme de leite) utilizados na formulação dos sorvetes e dos sorvetes fabricados apresentou-se adequada à legislação. Das formulações propostas para o sorvete de morango *diet* I- contendo 10 % de CP e edulcorantes; e 10 % de leite em pó sem edulcorante, a formulação mais aceita pelo teste sensorial escala do ideal foi com adição de CPS e sucralose/acessulfame-k, denominada sorvete *diet* II (F2). Comparando-se a F2-CPS (contendo 10 % de concentrado proteico de soro e sucralose/acessulfame-K) com a F2-LP (10 % de leite em pó e acessulfame-k), quanto às propriedades físico-químicas, houve diferenças significativas no teor de cinzas, gordura e proteína entre as formulações. A F2-CPS apresentou cremosidade, viscosidade e resistência ao derretimento superiores, com maior acidez e menor teor de gordura, características desejadas em produto *diet*, mostrando uso alternativo nobre para o soro do leite, que é nutritivo e funcional, de baixo custo, proporcionando ainda sua utilização com redução do impacto ambiental causado pelo seu descarte.

2.5 AGRADECIMENTOS

Pelo apoio financeiro, agradecemos às indústrias Frimesa; Alibra - Sooro; Kerry do Brasil; Candon Aditivos para Alimentos Ltda e Gemacon.

Pelo apoio para realizar este trabalho, agradecemos à Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Medianeira – PR (UTFPR) e à Universidade Federal de Santa Catarina – SC (UFSC).

REFERÊNCIAS

ALVAREZ, V. B.; WOLTERS, C. L.; VODVOTZ, Y.; JI, T. Physical properties of ice cream containing Milk protein concentrates. **Journal of Dairy Science**, Champain, v. 88, n. 3, p. 862-871, 2005.

BATTOCHIO, J. R.; CARDOSO, J. M. P.; KIKUCHI, M.; MACCHIONE, M.; MODOLO, J. S.; PAIXAO, A. L.; PINCHELLI, A. M.; SILVA, A. R.; SOUSA, V. C.; WADA, J. K. A.; WADA, J. K. A.; BOLLINI, H. M. A. Perfil sensorial de pão de forma integral. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 428-132, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria 146, de 07 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, p. 3977, Seção 1, 11 de março, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 12, de 02 de Janeiro de 2001. Aprova regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 02 de janeiro 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Aprova os 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. Instrução Normativa n. 51 de 18 de setembro de 2002. **Diário Oficial da União**; Brasília, n. 183, 20 de setembro, Seção I, p. 13, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Secretaria de Defesa agropecuária. Instrução Normativa n. 62, de 26 de agosto de 2003 Métodos Analíticos Oficiais Microbiológicos para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União** – DOU 18 de setembro de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 267, de 26 de setembro de 2003. Regulamento Técnico de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Industrializadores de Gelados Comestíveis e a Lista de

Verificação das Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Industrializadores de Gelados Comestíveis, Anexo 1, item 4.2 - Preparo da Mistura. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 26 de set. 2003a.

BRASIL. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 266, de 22 de setembro de 2005. Aprova o regulamento gelados comestíveis e preparados para gelados comestíveis. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder executivo, Brasília, DF, 23 set. 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 de dezembro, 2006.

CAPRILES, V. D.; ARÊAS, J. A. G. Desenvolvimento de salgadinhos com teores reduzidos de gordura saturada e de ácidos graxos trans. **Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas**, v. 25, n. 2, p. 363-369, 2005.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. **Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food – 10 states**. Morbidity and Mortality Weekly Report, v.59, n.14, p.418-422, 2010.

CLARKE, C. The science of ice cream. 2^a ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, cap. 1, p. 1-12. 2004.

CORREIA, R. T. P., PETRINE, M. R. S.; MAGALHÃES, M. M. A. Sorvete: aspectos tecnológicos e estruturais. *Revista Higiene Alimentar*, v. 21, n. 148, p. 19-23, 2007.

EMAM-DJOME, Z.; MOUSAVI, M. E.; GHORBANI, A. V.; MADADLOU, A. Effect of whey protein concentrate addition on the physical properties of homogenized sweetened dairy creams. **International Journal of Dairy Technology**, v.61, p.183-191, 2008.

KRAMER, A.; KAHAN, G.; COOPER, D.; PAPAVALIIOU, A. A non-parametric ranking method for the statistical evaluation of sensory data. **Chemical Senses**, v. 1, n.1, p. 121-133, 1974.

MAROULIS, Z. B.; SARAVACOS, G. D. **Food Plant Economics**, New York: CRC Press – Taylor & Francis Group, 353p, 2008.

MINIM, V. P. R. *Análise Sensorial: Estudos com consumidores*. 2ª ed., Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, p. 86-110, 2010.

OLIVEIRA, E. T., BATISTA, P. J. S., OLIVEIRA, E. G., SILVA, I. T. F. S., FROELICH, A. **Avaliação Microbiológica de Sorvetes Comercializados nos Principais Supermercados de Maceió-AL**. VII CONNEPI- Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação, Palmas, Tocantins, 2012.

QUEIROZ, H. G. S.; NETA, N. A. S.; PINTO, R. S.; RODRIGUES M. C. P.; COSTA, J. M. C.; Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica de sorvetes do tipo tapiocal; **Revista Ciência Agrônômica**, v. 40, n. 1, p. 60-65, janeiro 2009.

SILVA, F. A. S.; DUARTE, M. E. M.; CAVALCANTI-MATA, M. E. R, M. Nova metodologia para interpretação de dados de análise sensorial de alimentos. *Engenharia Agrícola*, Jaboticabal, vol. 30, n.5, p. 967-973, 2010.

SILVA, K.; BOLINI, H. M. A.; ANTUNES, A. J. Soro de leite bovino em sorvete. **Alimentos e Nutrição**, v.15, p.187-196, 2004.

SILVA, F. A. S; AZEVEDO, C. A. V. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SILVEIRA, H. G.; QUEIROZ, N. A. S.; NETA, R. S. P.; RODRIGUES, M. C. P.; COSTA, J. M. C. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica de sorvetes de tapioca. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 40, n.1, p. 60-65, 2009.

SGARBIERI, V. C.; FARFAN, J. A.; AMAYA, D. R. Inovação nos processos de obtenção, purificação e aplicação de componentes do leite bovino. 1ª edição, São Paulo-SP, v.1, n.12, p. 265-277, 2012.

SOLER, M. P.; VEIGA, P. G. Sorvetes: Série Publicações Técnicas do Centro de Informação em Alimentos. Campinas: ITAL/CIAL, 68p (Especial 1), 2001.

SOUZA, J. C. B.; COSTA, M. R.; DE RENSIS, C. M. V. B.; SIVIERI, K. Sorvete: Composição, processamento e viabilidade da adição de probiótico. **Revista Alimentos & Nutrição**. v. 21, n.1, p. 155-165, 2010.

STONE, H.; SIDEL, J. **Sensory evaluation practices**. 3rd ed. New York: Academic Press, 377 p. 2004.

VIDIGAL, M. C. T. R. **Caracterização reológica e sensorial de sobremesa láctea *diet* contendo concentrado protéico de soro**. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

VIDIGAL, M. C. T. R.; MINIM, V. P. R.; BERGER, E. C.; RAMOS, A. M.; MINIM, L. A. Concentrado protéico de soro melhora a qualidade sensorial de sobremesa láctea *diet*. **Revista Ciência Rural**, v. 14, s/p., 2012.

CAPÍTULO 3

ENZIMAS LACTASE E TRANSGLUTAMINASE: OTIMIZAÇÃO FÍSICA, QUÍMICA EM SORVETE DE MORANGO *DIET*

RESUMO

O desenvolvimento do sorvete de morango *diet* com propriedades físico-químicas e sensoriais de alta qualidade se mostrou alternativa tecnológica viável, inovadora e funcional, quando se utilizou concentrado proteico de soro de leite, com aplicação de enzimas. Para compreender a influência das variáveis independentes (concentração das enzimas lactase e transglutaminase, e da temperatura de preparação da calda) sobre as variáveis resposta (*overrun*, textura e taxa de derretimento), visando otimizá-las, utilizou-se um planejamento composto central (CCD), avaliando, por meio da análise de superfície de resposta, o efeito sobre as propriedades físico-químicas, reológicas, microbiológicas e sensoriais do sorvete de morango *diet*. Foram preparadas 18 formulações de sorvetes por processo descontínuo em triplicatas, empregando diferentes concentrações das enzimas e temperaturas de incubação, seguindo delineamento fatorial 2^k , com quatro repetições do ponto central. Realizaram-se análises de *overrun*, textura e taxa de derretimento, colorimetria, microbiológicas e sensoriais, aplicando-se a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey com 95% de probabilidade para todos os tratamentos. A análise dos resultados da superfície de resposta permitiu estabelecer a combinação de variáveis independentes que apresentaram as melhores variáveis respostas, com base no método de análise do perfil de desejabilidade, que sugeriu as condições operacionais ótimas de maior temperatura no preparo da calda (40 °C), maior concentração de transglutaminase (7,4 U g⁻¹ proteína) e uma concentração média de lactase (0,5 g L⁻¹), formulação denominada TD. Duas outras formulações de sorvete foram desenvolvidas, empregando a mesma temperatura de preparo de calda (40 °C) e variando as concentrações das enzimas; a primeira empregou lactase (0,4 g L⁻¹) e transglutaminase (2,0 U g⁻¹ proteína), denominada T2; e a outra foi feita sem adição das enzimas, denominada TP, tratamento padrão. Todos os tratamentos apresentaram-se dentro dos padrões microbiológicos estabelecidos pela ANVISA. No entanto, dentre os tratamentos, o T2 foi, na avaliação global, o que apresentou o maior coeficiente de concordância e maior

índice de aceitação pelos provadores na análise sensorial, com melhor *overrun*, textura e taxa de derretimento. Assim, o uso combinado das enzimas transglutaminase e lactase, aplicadas na elaboração de sorvetes, proporcionou melhor cremosidade, viscosidade e aumento do rendimento, obtendo-se produtos com baixo teor de lactose, produção de galactooligossacarídeos e a melhoria da qualidade sensorial.

Palavras-chave: índice de aceitação, controle de qualidade, boas práticas de fabricação, sorvete, enzimas.

**ENZYMES LACTASE AND TRANSGLUTAMINASE:
PHYSICAL AND CHEMICAL OPTIMIZATION OF DIET
STRAWBERRY ICE CREAM**

ABSTRACT

A diet strawberry ice cream formulation with good physico-chemical properties and high sensory quality was developed and found to be a viable, innovative and functional technological alternative when whey protein concentrate was used and enzymes were added. In order to understand the influence of the independent variables (concentrations of the enzymes lactase and transglutaminase and temperature for the preparation of the mixture) on the response variables (overrun, texture and melting rate) and optimize them, a central composite design (CCD) was used. In this approach, the effects on the physico-chemical, rheological, microbiological and sensory properties of the diet strawberry ice cream were evaluated by way of response surface analysis. A total of 18 ice cream formulations were prepared, in triplicate, using a discontinuous process, employing different enzyme concentrations and incubation temperatures, following a 2^k factorial design, with four repetitions of the central point. Analysis was carried out to determine the overrun, texture and melting rate. Also, colorimetric, microbiological and sensory analyses were performed, applying analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test with 95% probability for all treatments. The analysis of the response surface results allowed a combination of independent variables which present the best response variables to be established, based on the method of desirability profile analysis. The results indicated that the optimal operating conditions are the higher temperature for the preparation of the mixture (40 °C), higher transglutaminase concentration (7.4 U g⁻¹ protein) and intermediate concentration of lactase (0.5 g L⁻¹) and this formulation was denominated TD. Two other ice cream formulations were developed employing the same temperature for the preparation of the mixture (40 °C) and varying the enzyme concentrations: the first employing lactase (0.4 g L⁻¹) and transglutaminase (2.0 U g⁻¹ protein), called T2; and the other without the addition of the enzymes, called TP (standard treatment). All of the treatments provided microbiological results within the standards established by ANVISA. However, in the overall evaluation, out of all

treatments, T2 had the highest coefficient of concordance and the highest index of approval by the tasters in the sensory analysis, with the best results for overrun, texture and melting rate. Thus, the combined use of transglutaminase and lactase, applied in the preparation of ice creams provided better creaminess and viscosity and increased yield, obtaining products with low lactose content, the production of galacto-oligosaccharides and better sensory quality.

Keywords: acceptance index, quality control, good production practice, ice cream, enzymes.

3.1 INTRODUÇÃO

O sorvete é um sistema coloidal complexo composto por uma emulsão constituída de gotículas de gordura, proteínas, bolhas de ar e de cristais de gelo dispersos em fase aquosa, na qual polissacarídeos, proteínas, lactose e sais minerais estão dispersos. Além disso, pode conter outros ingredientes, como emulsificantes e estabilizantes (CLARKE, 2005; GILLES; GREENLEY; SUTCLIFFE, 2006). Esse alimento é um dos derivados lácteos mais apreciados pela população em geral (ALVAREZ et al., 2005).

O interesse pela utilização da enzima transglutaminase na indústria de alimentos vem aumentando nos últimos anos, não só por sua capacidade de modificar propriedades funcionais de diversas proteínas (JAROS et al., 2006), mas também por melhorar a qualidade dos alimentos (YOKOYAMA; NIO; KIKUCHI, 2004).

A enzima transglutaminase (EC 2.3.2.13) é caracterizada por sua capacidade de catalisar reações de transferência de grupos acil formando ligações cruzadas intra e intermoleculares entre proteínas, peptídeos e aminas primárias, principalmente através de ligações covalentes entre resíduos de glutamina e lisina (MACEDO, 2009). A transglutaminase é amplamente utilizada nas indústrias processadoras de alimentos para desenvolver novos produtos e modificar características como: viscosidade, capacidade emulsificante e gelificação. Na produção de sorvete, a enzima transglutaminase auxilia a obter um produto de baixa caloria, sem açúcar; aumenta a capacidade de retenção de água e aumenta as propriedades de gelificação de sorvetes (Kuraishi et al., 2001).

Aplicações industriais da enzima lactase ou β -galactosidase (EC. 3.2.1.23) na hidrólise da lactose permitem obter uma mistura isomolecular de glicose e galactose (SANTIAGO et al., 2004). Em termos de tecnologia de alimentos, a hidrólise da lactose é muito importante na elaboração de formulações com diversos benefícios e vantagens, como obtenção de produtos com baixo teor de lactose, produção de galactooligossacarídeos e melhoria da qualidade sensorial de produtos (SILVA; CARDOSO, 2007). Dessa forma, a hidrólise enzimática da lactose melhora as características tecnológicas, sensoriais e físico-químicas de produtos lácteos, aumentando sua digestibilidade, cremosidade e suavidade, promovendo modificações na viscosidade, no corpo, na textura e no paladar de sorvetes (ZADOW, 1993; VINHAL, 2001; ANDRADE, 2005).

A incorporação do ar é chamada de *overrun*, usualmente definida como o aumento do volume do sorvete obtido de um volume inicial de calda, expressa em porcentagem de *overrun* (LEANDRO et al., 2006).

Para obter uma formulação de sorvete com textura desejável, é necessário melhorar sua estrutura física, que é formada por uma emulsão de três componentes constituídos por uma rede de glóbulos de gordura, cristais de gelo e bolhas de ar, dispersos numa fase aquosa de viscosidade elevada (AIME et al., 2001). Além disso, a textura do sorvete é afetada pela aglomeração dos glóbulos de gordura, quantidade e tamanho de bolhas de ar incorporadas, a viscosidade da fase aquosa e o tamanho e estado de agregação dos cristais de gelo formados (DICKINSON; STAINSBY, 1982; KAYA; TEKIN, 2001; AIME et al., 2001).

As propriedades de derretimento do sorvete constituem parâmetro de comportamento crítico para o produto, que é influenciado pelos aspectos estruturais associados com a aglomeração da gordura (THARP, 2000).

Certa consistência na homogeneidade do derretimento deve ser mantida para que os cristais de gelo derretam de maneira a conservar a forma estrutural do sorvete, ou seja, deve ocorrer “retenção de forma”. O produto do derretimento deve ser uma massa líquida, homogênea e uniforme (WALSTRA; JONKMAN, 1998).

Creiosidade, *overrun*, textura e taxa de derretimento do sorvete são fortemente afetados pela coalescência parcial dos glóbulos de gordura, que é desestabilizada durante o processo de congelamento (MARSHALL; ARBUCKLE, 1996; GOFF, 1997; GOFF et al., 1999).

Do ponto de vista da reologia, a estrutura do sorvete consiste numa bolha sólida, dentro da qual proteínas e emulsificantes formam uma rígida membrana que circunda os glóbulos de gordura (KOKUTO et al., 2000).

A reologia de sorvetes pode ser afetada por vários fatores, incluindo a presença, a concentração e o grau de cristalização de seus componentes (gorduras, polissacarídeos e proteínas, entre outros), além dos efeitos associados da coalescência dos glóbulos de gordura e a influência dos cristais de gelo na estrutura do sorvete (SOUKOULIS; LEBESI; TZIA, 2009).

Para compreender a influência das variáveis independentes (concentração de lactase, transglutaminase e temperatura de preparação da calda) nas variáveis respostas (*overrun*, taxa de derretimento e

textura) e otimizá-las foi utilizada a metodologia de superfície de resposta com planejamento composto central (CCD).

Este trabalho teve o objetivo de avaliar, através da metodologia de superfície de resposta, o efeito da adição das enzimas lactase e transglutaminase e da temperatura de preparação da calda nas propriedades físico-químicas, microbiológicas e sensoriais do sorvete de morango *diet*.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

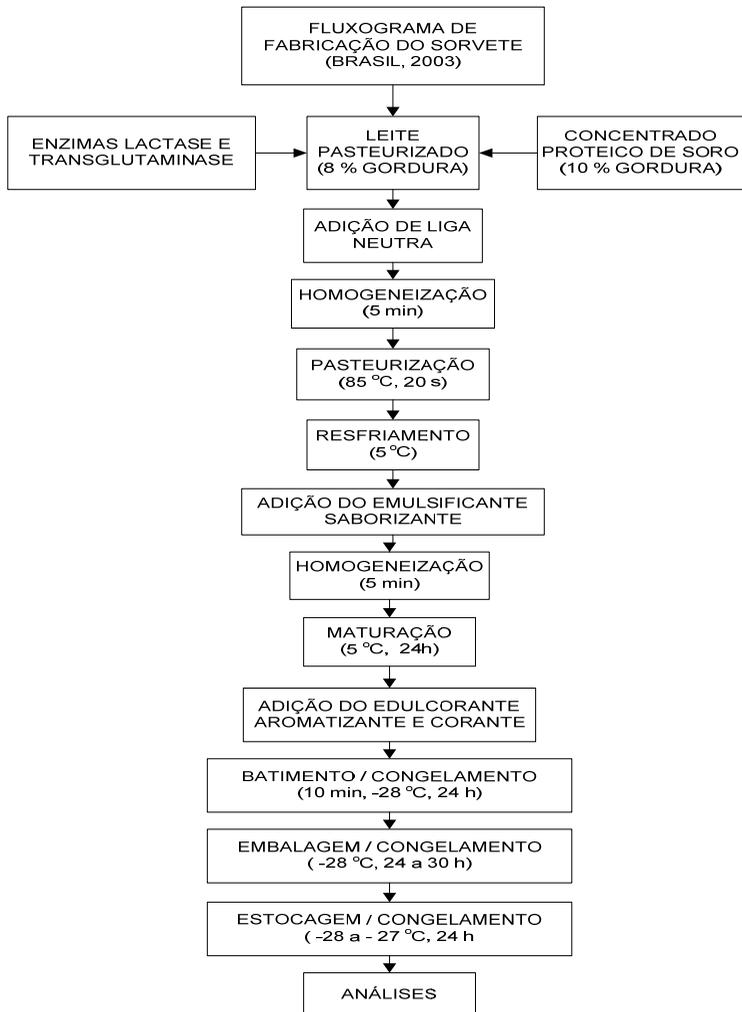
3.2.1 Materiais

Na formulação base de cada amostra de sorvete foram utilizados os seguintes ingredientes: 2 litros de leite pasteurizado, leite em pó integral e creme de leite da Frimesa®; concentrado proteico de soro (CPS)® (Sooro, Brasil), estabilizante superliga neutra® (Duas Rodas, Brazil), emulsificante emustab® (Duas Rodas, Brazil), edulcorantes: sucralose/acessulfame-k, sabor morango algemix® (Duas Rodas, Brazil), corante carmin de colchonilha® (Gemacom, Brasil), aroma de morango® (Givaudan, Brasil), enzima prozin lactase® (Candon Aditivos, Brasil) e enzima transglutaminase YG -Activia® (Ajinomoto, Brasil) (Ajinomoto). As amostras foram padronizadas a 8 % de gordura com creme de leite e adicionadas de CPS (concentrado proteico de soro) a 10 %.

3.2.2 Elaboração dos sorvetes

Foram preparadas formulações de sorvetes com diferentes concentrações de enzima lactase, transglutaminase e temperatura de incubação, segundo delineamento fatorial 3^2 (3 fatores e 5 níveis) com quatro repetições do ponto central para a estimativa do erro experimental, resultando num total de 18 experimentos, que foram realizados em triplicatas. (Tabela 1). A produção dos sorvetes foi realizada por processo descontínuo (BRASIL, 2003a). As etapas do processamento estão especificadas no fluxograma da Figura 1.

Figura 1 - Fluxograma de fabricação de sorvete *diet* de morango com adição de concentrado proteico de soro CPS, sucralose/acessulfame-k e enzima lactase e enzima transglutaminase.



As amostras foram padronizadas a 8 % de gordura com creme de leite e adicionadas de CPS (concentrado proteico de soro) a 10 %. Todas as formulações foram submetidas a tratamento térmico a 75 °C/15 segundos, para causar a desnaturação das proteínas do soro e sua interação com as micelas de caseína, aumentando a susceptibilidade das proteínas a reagir com a transglutaminase (SHARMA, LORENZEN; QVIST, 2001). Após o tratamento térmico as amostras foram resfriadas, receberam as enzimas transglutaminase e lactase e foram incubadas a temperaturas a temperaturas 20, 30 e 40 °C por 90 minutos. Após a incubação, as amostras foram inativadas à temperatura de 75 °C/15 segundos para interromper a ação da enzima, foram resfriadas a 5 °C, receberam o emustab e foram homogeneizadas por 5 minutos. A seguir o mix foi colocado para maturar por 24 horas à temperatura de 5 °C. Após a maturação foram adicionados ao mix: aroma, sabor, edulcorante e corante, sendo homogeneizado por 5 minutos. O mix foi colocado no compartimento da sorveteria de marca Skynsem®, para bater até atingir o ponto, sendo levadas para congelamento final em freezer a temperature de - 28 °C.

3.2.3 Análise de *overrun*

O cálculo do *overrun* (ar) nos sorvetes foi avaliado pelo método descrito por Whelan et al. (2008). Foram pesados volumes iguais da mistura base e do sorvete (50 mL); o *overrun* foi calculado pela equação 1:

Equação 1 - Cálculo de *overrun* (%)

$$Overrun (\%) = \text{peso da mistura base} - \frac{\text{peso do sorvete} \times 100}{\text{peso do sorvete}} \quad (1)$$

As medições das amostras de sorvete de morango *diet* foram realizadas no laboratório de Pesquisa em Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus de Medianeira.

3.2.4 Análise da taxa de derretimento

A taxa de derretimento das amostras foi avaliada segundo o método descrito por Lee e White (2001), à temperatura de 25 +/- (ambiente). As amostras foram preparadas em potes plásticos com capacidade de 100 a 200 mL (peso das amostras variando de 100 a 160

gramas) foram acoplados em suporte para buretas (com haste de 450 mm de alumínio, base de ferro) um funil de vidro; sobre o funil foi colocada a peneira metálica (medindo 100 mm de diâmetro) e apoiadas por provetas de (100 mL). O teste ocorreu paralelamente em triplicatas, utilizando conjunto de três suportes. A massa foi medida ao longo de 90 minutos, sendo analisadas até o derretimento total, procedimento acompanhado com cronômetro. O sorvete derretido foi recolhido em erlemeyer e pesado a intervalos de 10 minutos, com registro fotográfico de todos os passos da análise.

As medições das amostras de sorvete de morango *diet* foram realizadas no laboratório de Pesquisa em Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus de Medianeira.

3.2.5 Análises de textura

Nas análises para averiguar o perfil de textura e ruptura do sorvete foi utilizado o texturômetro universal modelo TA. HD Plus, (Texture Analyser – Stable Micro Systems Co Ltd. Surrey - United Kingdom), interligado a um microcomputador tipo PC com sistema operacional windows 7, com uma sonda de cilindro com 50mm de diâmetro (compressão). As amostras foram mantidas a - 28 °C até serem cortadas em cubos de 2 x 2 x 2 cm e comprimidas a uma velocidade de 5mm/s (Penetração), que equivale a 50 %, isto é, 1 cm de compressão, segundo metodologia de (HWANG; SHYU; HSU, 2009).

A coleta de dados foi realizada com auxílio do software “Exponent”, que trabalha com pacote de 32 bits, conforme descrito no seu manual (EXTRALAB – BRASIL, 2010).

As medições das amostras de sorvete de morango *diet* foram realizadas no laboratório de Pesquisa em Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus de Medianeira.

3.2.6 Análise de colorimetria

A cor das amostras de sorvete foi medida usando colorímetro (Model Minolta Meter CR-400, Osaka, Japão), que foi previamente calibrado e ajustado para ser operado com iluminante *C, D65 e ângulo de 10°. Foi utilizado o método proposto pela CIELab definido em 1976, que se baseia na representação tridimensional, onde cada cor pode ser representada por um único ponto, sendo definida pelas coordenadas L^* , a^* e b^* , onde o parâmetro L^* representa a luminosidade na escala de

0 - 100 (do preto ao branco); a^* representa a variação de tonalidade de vermelho (+) ou verde (-) e b^* representa a variação da tonalidade do amarelo (+) ou azul (-) (BILLMEYER; SALTZMANN, 1981; YAM; PAPADAKIS, 2004).

Pelas coordenadas L^* , a^* e b^* podem ser calculadas as coordenadas do chroma C^* que indica a saturação ou a intensidade da cor (GIL-MUNOZ et al., 1997; KONICA MINOLTA, 2003), portanto a luminosidade na escala (L^*) e o chroma (C^*) são variáveis representativas das diferenças entre as amostras.

O eixo chroma (C^*) representa a saturação ou intensidade e é obtido por meio da equação 2.

Equação 2 - Cálculo do eixo chroma (C^*)

$$\text{Chroma } (C^*) = (a^2 + b^2)^{1/2} \quad (2)$$

O ΔE^* representa o desvio total de cor em relação a um único padrão estabelecido. A equação 3, abaixo, foi utilizada para calcular o desvio da cor, segundo CIE 1976: (BILLMEYER; SALTZMANN, 1981; YAM; PAPADAKIS, 2004).

Equação 3 - Cálculo do desvio da cor

$$\Delta E^*_{ab} = ((\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2)^{1/2} \quad (3)$$

As medições das amostras de sorvete de morango *diet* foram realizadas no laboratório de Pesquisa em Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus de Medianeira.

3.2.7 Análises microbiológicas

Realizaram-se análises microbiológicas nas formulações de sorvete de morango *diet*, que obteve melhor desejabilidade pela análise de superfície de resposta e também do tratamento do delineamento que apresentou melhor desempenho nas análises de *overrun*, textura e taxa de derretimento e o tratamento padrão (sem adição das enzimas lactase e enzima transglutaminase). Em todas as formulações de sorvete foram analisados coliformes a 45 °C, *Salmonella sp/25g*, *Staphilococcus aureus* coagulase positiva e mofos e leveduras, segundo metodologia descrita na Instrução Normativa n. 62 (BRASIL, 2003). Os resultados foram

analisados segundo a RDC n. 12 (BRASIL, 2001). Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

3.2.8 Análises sensoriais

As análises sensoriais foram realizadas no Laboratório de Análise Sensorial da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – campus de Medianeira. As amostras, em quantidade suficiente e à temperatura ambiente, foram avaliadas em dois horários – de manhã e à tarde – em cabines individuais iluminadas com luz branca, utilizando 164 provadores não treinados e consumidores regulares de sorvete, de ambos os sexos, com idade entre 18 e 50 anos. Todas as amostras foram servidas em copos brancos descartáveis de 50 mL, devidamente codificados com números aleatórios de três dígitos acompanhados por um copo de 200 mL contendo água destilada para remoção de algum sabor residual. Cada provador recebeu uma ficha com as instruções e a escala do ideal (Apendice A). Os sorvetes foram avaliados por meio da escala hedônica de nove pontos para os atributos de sabor, textura, aparência, cor e avaliação global. (Em anexo, no Apendice B). Esse teste foi utilizado para a avaliação sensorial por consumidor, como descreve Minim, (2006).

Para a análise estatística dos dados foram utilizados os programas Excell (2013), Assistat versão 7.7 beta (2104), Consensor 1.1 (2011) e SensoMaker 1.7 (2014).

Os resultados da escala do ideal foram avaliados por meio de ANOVA, seguindo um delineamento em blocos ao acaso. As médias foram comparadas por meio de teste de Tukey e foram confeccionados gráficos de barras com os dados de distribuição de frequências.

Os resultados da escala hedônica foram avaliados por meios de ANOVA, seguindo um delineamento em bloco ao acaso, com 5% de probabilidade, seguido pelo teste de comparação de médias de Tukey. Foram calculados os coeficientes de concordância dos provadores para todos os resultados, conforme descrito por (SILVA; DUARTE; CAVALCANTI-MATA, 2010), e o Índice de Aceitação ((DUTCOSKY, 2007). Os resultados hedônicos também foram calculados por meio da análise multivariada para obter um mapa de preferência interno de três fatores (three-way preference mapping) conforme descrito por Nunes, Pinheiro e Bastos (2011) e Nunes (2012).

3.2.9 Análises físico-químicas

Foram realizadas análises físico-químicas nas 18 formulações de sorvete para avaliar umidade, cinzas, pH, acidez titulável, açúcares redutores (glicose %) e açúcares não-redutores (sacarose %), gordura, sólidos totais e proteína segundo a metodologia da Instrução normativa n. 68 (Brasil, 2006). Todas as análises foram realizadas em triplicatas (Apêndice R).

3.2.10 Delineamento experimental e análise estatística

A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para avaliar os efeitos e as interações desses três fatores (concentração da enzima lactase, transglutaminase e temperatura de incubação) através de um planejamento composto central composto 2^k ($k = 3$ fatores, 5 níveis) com quatro repetições do ponto central para a estimativa do erro experimental, resultando num total de 18 experimentos, realizados em ordem aleatória e em triplicata (total de 54 experimentos). As variáveis independentes foram estudadas em 5 níveis diferentes: concentração da enzima lactase (A) (0,3 %, 0,4 %, 0,6 %, 0,8 % e 0,9 %), concentração da enzima transglutaminase (B) (0,6 %, 2 %, 4 %, 6 % e 7,4 %) e a temperatura de incubação (C) (13 °C, 20 °C, 30 °C, 40 °C, 47 °C), e seus níveis foram codificados (-1,0,+1, +1,68, -1,68), como se vê na Tabela 1.

As análises estatísticas do *overrun*, textura, taxa de derretimento e colorimetria foram realizadas com uso do software GrafPad Prism, realizando o pós-teste Tukey-Kramer para nível de significância ($p < 0,05$). Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

Tabela 1 - Delineamento experimental (CCD) para elaboração dos sorvetes.

Tratamentos	Variáveis independentes			Níveis originais		
	Níveis codificados			(A)	(B)	(C)
	(A)	(B)	(C)	(A)	(B)	(C)
T1	-1,0000	-1,0000	-1,0000	0,4	2	20
T2	-1,0000	-1,0000	1,0000	0,4	2	40
T3	-1,0000	1,0000	-1,0000	0,4	6	20
T4	-1,0000	1,0000	1,0000	0,4	6	40
T5	1,0000	-1,0000	-1,0000	0,8	2	20
T6	1,0000	-1,0000	1,0000	0,8	2	40
T7	1,0000	1,0000	-1,0000	0,8	6	20
T8	1,0000	1,0000	1,0000	0,8	6	40
T9	-1,6818	0,0000	0,0000	0,3	4	30
T10	1,6818	0,0000	0,0000	0,9	4	30
T11	0,0000	-1,6818	0,0000	0,6	0,6	30
T12	0,0000	1,6818	0,0000	0,6	7,4	30
T13	0,0000	0,0000	-1,6818	0,6	4	13
T14	0,0000	0,0000	1,6818	0,6	4	47
T15	0,0000	0,0000	0,0000	0,6	4	30
T16	0,0000	0,0000	0,0000	0,6	4	30
T17	0,0000	0,0000	0,0000	0,6	4	30
T18	0,0000	0,0000	0,0000	0,6	4	30

Níveis Codificados e seus correspondentes	Níveis Originais				
Fatores	-1,68	-1	0	1	1,68
A) Lactase (G/L)	0,3	0,4	0,6	0,8	0,9
(B) Transglutaminase (U g1proteína)	0,6	2	4	6	7,4
(C) Temperatura (°C)	13	20	30	40	47

Foram realizados testes de análise de variância (ANOVA) e de multicomparação, pós-teste Tukey-Kramer em nível de significância ($p < 0,05$) para os tratamentos.

O *overrun* (%), a textura (N) e o índice de derretimento (g.min⁻¹) das amostras de sorvetes submetidos a tratamento enzimático com as enzimas transglutaminase e lactase em diferentes temperaturas foram as respostas selecionadas (Y) para esta pesquisa. A fim de estimar a resposta, foi construído um modelo quadrático, chamado de modelo de superfície de resposta de segunda ordem, equação 4.

Equação 4 - Modelo de superfície de resposta de segunda ordem

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j>1}^k \beta_{ij} x_i x_j + \epsilon(4)$$

onde y é a resposta prevista, β_0 é constante do modelo, β_i é o efeito dos coeficientes lineares, β_{ii} os coeficientes dos efeitos quadráticos, β_{ij} é o coeficiente de interação entre os factores, X_{ij} e X_j são variáveis independentes codificadas, ϵ é o erro, k o número de variáveis consideradas, e i e j são os factores codificados de sistema. Os coeficientes foram calculados por análise de regressão, sendo sua significância verificada pela análise de variância (ANOVA) com programa estatístico software. (versão 7.0).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos experimentos do planejamento estão apresentados na tabela 2. Os valores preditos pelo modelo estatístico gerado pelo método de superfície de resposta e os pontos experimentais estão demonstrados nas figuras de superfície de resposta. Foi avaliada a influência da temperatura (20 °C, 30 °C e 40 °C), variando a concentração de transglutaminase e lactase.

Tabela 2 - Dados do planejamento composto central e as respostas: overrun, textura e taxa de derretimento para cada um dos tratamentos (sendo 1°, 2° e 3° os ensaios realizados).

Trat	Enzi- ma TG	Enzi- ma LC	T [°C]	Overrun [%]			Textura [N]			Taxa de derretimento [g/min]		
				1°	2°	3°	1°	2°	3°	1°	2°	3°
1	-1	-1	-1	40	45	47	15,4	14,5	17,5	0,34	0,24	0,39
2	-1	-1	1	85	87	87	25,3	26,6	25,9	0,26	0,45	0,40
3	-1	1	-1	44	44	45	46,6	36,5	27,7	0,50	0,45	0,57
4	-1	1	1	86	89	90	148	182	156	0,47	0,45	0,49
5	1	-1	-1	49	50	46	33,9	35,1	28,1	0,54	0,23	0,36
6	1	-1	1	88	86	87	28,3	24,8	26,8	0,57	0,48	0,54
7	1	1	-1	50	47	49	31,3	30,7	31,2	0,50	0,49	0,51
8	1	1	1	82	81	81	12	11,5	11	0,19	0,20	0,10
9	-1,7	0	0	58	57	57	28	27,2	25,4	0,80	0,81	0,83
10	1,7	0	0	66	66	68	49,1	42,3	42,9	0,43	0,39	0,56
11	0	-1,7	0	63	62	63	60,2	45,8	58,3	0,80	0,36	0,58
12	0	1,7	0	50	50	52	55,5	55,8	46,1	0,49	0,49	0,48
13	0	0	-1,7	30	30	30	238	278	230	0,40	0,30	0,42
14	0	0	1,7	91	93	94	42,1	42	44,8	0,53	0,60	0,78
15	0	0	0	50	51	51	25,1	27,4	29,1	0,49	0,52	0,60
16	0	0	0	64	64	65	53,4	57	54,9	0,32	0,69	0,57
17	0	0	0	68	67	66	78,2	72,8	77,7	0,64	0,64	0,58
18	0	0	0	61	61	61	49	45	40,1	0,28	0,51	0,79

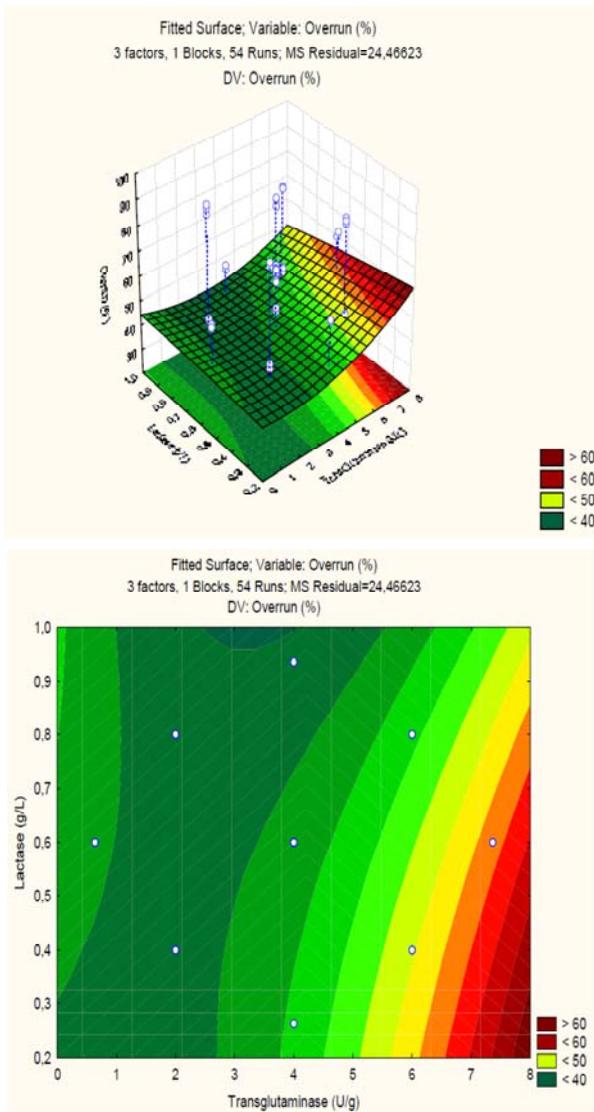
O planejamento experimental composto central (CCD) foi utilizado para elucidar o efeito principal e a interação dos fatores estudados: influência da concentração da transglutaminase (TG), concentração de lactase (LC) e a temperatura (T) nas amostras de sorvete quanto a overrun, textura e taxa de derretimento.

3.3.1 Avaliação do *overrun*

Nos Apêndices C, D, E são apresentadas as tabelas de ANOVA, efeitos dos fatores e coeficientes de regressão do modelo de superfície de resposta de segunda ordem para o *overrun* (%). As variáveis em vermelho são significativas para *overrun* (%) em nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os efeitos menos significativos podem ser ignorados na construção do modelo, sendo o coeficiente de determinação encontrado para o modelo de superfície de resposta para a textura, $R^2 = 0,9355$, indicando que o modelo é adequado para representar os dados experimentais, podendo ser aplicado na previsão dos valores de *overrun* dentro da faixa estudada.

Para facilitar a apresentação, os resultados são referidos em termos de temperatura (variável fixada em um ponto na construção gráfica da superfície de resposta). Na figura 2 são apresentados os resultados da análise de superfície de resposta para *overrun* na temperatura de 20 °C.

Figura 2 - Gráfico da análise da superfície de resposta para o *overrun* referente às variações da concentração das enzimas transglutaminase e lactase adicionadas às formulações sorvete de morango *diet* preparadas à temperatura de 20 °C.



Pelo modelo gerado com o uso da metodologia de superfície de resposta para a temperatura de 20 °C, observa-se que a 20 °C nas concentrações da enzima lactase variando de 0,2 a 0,3 g/L o *overrun* obtido foi menor que 40 %, nas concentrações até 2,5 U/g proteína da enzima transglutaminase. No entanto, para concentrações da enzima transglutaminase superiores a 7,5 U/g proteína, o *overrun* obtido foi superior a 60, indicando que quanto maior a concentração de transglutaminase maior *overrun*.

Para a enzima lactase, concentrações superiores a 0,8 g/L o *overrun* formado foi inferior a 40 %, com concentrações da enzima transglutaminase inferiores a 5,5 U/g proteína. Mantendo-se a mesma concentração da enzima lactase e utilizando concentrações de transglutaminase superiores a 7 U/g proteína, foi obtido *overrun* inferior a 50 %.

Diante do exposto, conclui-se que para obter *overrun* superior a 60 % sob temperatura de 20 °C, as melhores condições seriam utilizar menores concentrações da enzima lactase com maiores concentrações da enzima transglutaminase.

Nos tratamentos T1, T3, T5 e T7 houve baixa formação de *overrun*, o que pode ser atribuído a baixa temperatura de incubação, que teria inibido a atividade das enzimas.

Segundo Sakamoto; Kumazawa; Motoki (1998), o desempenho da enzima transglutaminase depende do tipo, da quantidade e da modificação sofrida pelo substrato, da própria concentração da enzima, do pH, da temperatura e do tempo de incubação.

Adicionalmente, deve-se levar em conta que durante o processo de fabricação do sorvete outros fatores independentes da atividade da enzima podem ter afetado o *overrun*, como processo de homogeneização da calda.

As oscilações nas pás agitadoras da sorveteira podem afetar a aglutinação dos glóbulos de gordura, que, quando aglomerados, formam uma matriz que estabiliza as células de ar, promovendo uma fina distribuição do ar no meio e aumentando o *overrun* (MARSHALL; ARBUCKLE, 1996).

De acordo com Chang e Hartel (2002), o *overrun* em sorveteiras descontínuas aumenta até um valor máximo e depois tende a decrescer, durante os últimos estágios de congelamento, em função do excesso de batimento. O tempo de batimento das caldas de sorvete neste trabalho foi de 08 a 10 minutos para todos os tratamentos, permanecendo dentro dos binômios tempo/temperatura citados na literatura.

As respostas obtidas para os tratamentos T1, T3, T5 e T7 demonstram que houve reduzida atividade da enzima lactase nessa temperatura, pois a temperatura ótima para atuação da enzima situa-se entre 35 °C e 40 °C (CAMPOS et al., 2009).

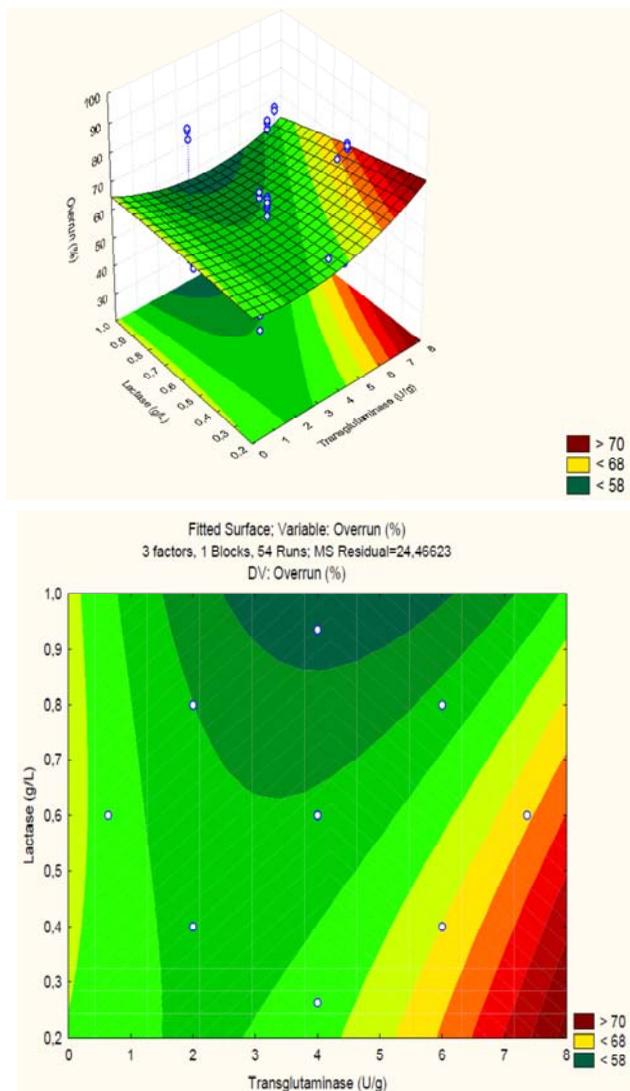
O tempo de incubação da calda de sorvete contendo as enzimas foi de 90 minutos, em função da presença das bactérias do ácido láctico, que fermentam a lactose. Todavia, sob temperaturas inferiores à citada por Campos et al. (2009), há necessidade de maior tempo de contato com a amostra para maior hidrólise da lactose pela enzima lactase. Desta forma, era esperada menor hidrólise nessa temperatura, que além de ser abaixo da ideal, não favoreceu a atividade das bactérias lácticas nem a atividade da transglutaminase.

Sharma (2001) concluiu que a transglutaminase é capaz de reagir com as proteínas do leite, com ou sem aquecimento. No entanto, a análise de superfície de resposta (Figura 2) demonstrou que para melhorar a atividade, enzimática nessa temperatura (20 °C), seriam necessárias maiores quantidades da transglutaminase.

Incubando leite com a enzima lactase à temperatura de 20 °C, Campos et al. (2009) obtiveram baixa atividade da enzima. Notaram que sob temperatura mais baixa, a hidrólise ocorre independentemente da concentração da enzima, mas o tempo de atuação é mais prolongado, obtendo-se hidrólise de 75 % da lactose em 7 horas, concluindo que é possível a hidrólise da lactose em baixas temperaturas, embora o processo seja mais demorado. Sendo assim, a atividade da enzima pode ocorrer mesmo a temperaturas inferiores às preconizadas pela literatura (CARMINATTI, 2005; TREVISAN, 2008).

Os resultados das análises de *overrun* obtidos para diferentes concentrações da enzima transglutaminase combinadas com diferentes concentrações da enzima lactase em sorvete de morango na temperatura de 30 °C são apresentados na figura 3 a seguir.

Figura 3 - Gráfico da análise da superfície de resposta para o *overrun* referente as variações da concentração das enzimas transglutaminase e lactase adicionadas nas formulações sorvete de morango *diet* preparadas na temperatura de 30 °C.



Considerando a temperatura de 30 °C sendo utilizadas quaisquer das concentrações da enzima lactase (0,3 até 1,0 g/L) combinadas com concentrações da enzima transglutaminase inferiores a 6 U/g proteína, a metodologia de superfície de resposta forneceu *overrun* inferior a 58 % obtidos no tratamento T9 (Figura 3).

No entanto, quando se aumentou em torno de 30 % a concentração da enzima transglutaminase, ou seja, para valores acima de 6 U/g proteína, mantendo a mesma concentração da enzima lactase (0,3 g/L), a superfície de resposta mostrou aumento no *overrun*, que se elevou a mais de 70 %. Se forem utilizadas concentrações de enzima lactase acima de 0,7 g/L combinadas com concentrações de enzima transglutaminase variando entre 2,5 e 6 U/g proteína, serão obtidos menores valores de *overrun* (68 %).

Do exposto, conclui-se que para obter melhor *overrun* na temperatura de 30 °C, é necessário aumentar as concentrações da enzima transglutaminase acima de 7 U g⁻¹ proteína e da enzima lactase abaixo de 0,4 g/L.

Assim sendo, quanto maior a quantidade de enzima transglutaminase utilizada, maior a firmeza do gel obtido, provavelmente devido ao maior efeito endurecedor das proteínas cobrindo os glóbulos de gordura, envolvendo as bolhas de ar, participando da rede proteica (FAERGEMAND et al., 1999) e definindo a estrutura do sorvete.

O *overrun* determina a quantidade de ar incorporado à massa durante o processo de batimento, aumentando seu volume final e tornando-a mais leve e suave (SANTOS, 2008). A temperatura de 30 °C próxima da de atuação de enzima lactase contribuiu para maior atuação da enzima, mesmo em baixa concentração e reduzido tempo de incubação.

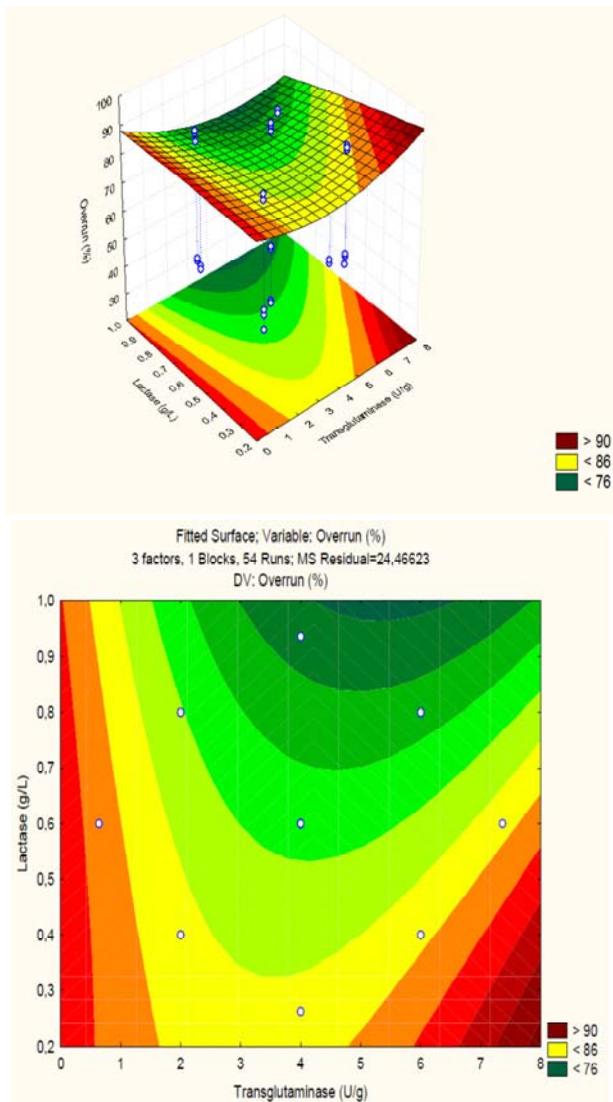
Resultados semelhantes foram obtidos por Campos et al. (2009), que obtiveram maior eficiência de atividade da enzima em cerca de 90 % ao utilizar a temperatura ótima de ação da enzima de 30 a 35 °C em duas horas aproximadamente. Os tratamentos T15, T16, T17 e T18 tiveram crescimento do *overrun*, com concentrações de 0,6 g/L enzima lactase e 4 U/g proteína da enzima transglutaminase, demonstrando possível atuação da enzima lactase, aumentando o teor de sólidos totais (proteínas), proporcionando a formação de ligações cruzadas com as proteínas, ocorrendo maior incorporação, distribuição e tamanho das células de ar que influenciam a formação do *overrun*, o que melhora o sorvete em maciez e leveza. (SOFJAN; HARTEL, 2004).

Maior atividade da enzima lactase foi observada sob temperaturas entre 23 e 30 °C. Estudos divulgados na literatura demonstram que a maior hidrólise foi verificada com o uso de maiores concentrações da enzima lactase. Trevisan, (2008) sugere mais estudos para verificar a viabilidade e o custo x benefício. A maior atividade da enzima transglutaminase nessa temperatura foi mais efetiva em concentrações mais elevadas; tratamentos (T11 e T10) formando ligações cruzadas mais firmes com as proteínas, e formando uma microestrutura mais fina, e possivelmente maior quantidade de substrato pode estar disponível, devido à hidrólise causada pela lactase, aumentando o teor de sólidos do meio.

Proteínas disponíveis para a transglutaminase agir se devem a uma ampla área interfacial óleo-água, local onde as proteínas do leite são altamente ligadas na interface óleo-água. O aumento progressivo da temperatura desorganiza o sistema proteína-água, quebrando as ligações de hidrogênio que estabilizam a estrutura proteica, o que causa o desdobramento e leva à interação proteína-proteína, aproximando as proteínas do sítio ativo da transglutaminase e levando à subsequente formação de ligações cruzadas e também formação de polímeros (NIEUWENHUIZEN et al., 2003).

Os resultados das análises de *overrun* nas diferentes concentrações de transglutaminase combinadas com diferentes concentrações de lactase adicionadas às formulações sorvete de morango na temperatura de 40 °C estão na figura 4, a seguir.

Figura 4 - Gráfico da análise da superfície de resposta para o *overrun* referentes variações da concentração das enzimas transglutaminase e enzima lactase adicionadas às formulações sorvete de morango *diet* na temperatura de 40 °C.



Os valores de *overrun* das amostras de sorvete expostas à temperatura de 40 °C foram superiores a 87 % em concentrações da enzima transglutaminase abaixo de 5 U/g proteína associadas a concentrações da enzima lactase abaixo de 0,3 g/L. Nessa concentração da enzima transglutaminase (5 U/g), quanto maior a concentração da enzima lactase maior será o *overrun*, conforme foi constatado no tratamento T6, evidenciando a ação das enzimas com polímeros de proteínas, formando bolhas de ar cujas propriedades térmicas evitam a transferência de calor, estabilizando a estrutura do sorvete e evitando a formação de cristais de gelo (GOFF, 2006).

Por outro lado, nas concentrações da enzima lactase acima de 0,9 g/L, quanto maior a concentração de transglutaminase, maior será *overrun*; em contrapartida, em concentrações de transglutaminase acima de 6 U/g proteína, quanto maiores as concentrações da lactase, menor será o *overrun*.

O resultado da análise de superfície de reposta nos tratamentos a 40 °C evidenciou elevada hidrólise da lactose, por estar exposta a temperatura ótima de ação da enzima, independentemente da concentração de enzima utilizada. Para ocorrer a hidrólise lactose pela atuação da enzima lactase e a formação de glicose e galactose, há diminuição da quantidade de água livre no meio, ocasionando uma ligeira redução do teor de gordura e aumento no extrato seco total, extrato seco desengordurado e proteínas (TREVISAN, 2008). A diminuição do teor de lactose no meio aumenta o teor de proteína e gordura, aumentando a densidade do meio (TRONCO, 2003).

O elevado *overrun* obtido nessa temperatura acima de 90 % se deve a concomitante atuação das enzimas: a transglutaminase na concentração acima de 1 U/g proteína cria uma rede proteica fina, que imobiliza a água em grande proporção, evitando a formação de cristais, aumentando a formação de bolhas de ar, e, conseqüentemente, aumentando o *overrun* (METWALLY, 2007).

A incorporação de ar durante o processamento do sorvete refere-se ao aumento do volume do produto em relação à calda (NAZARUDDIN; SYALISA; ROSNANI, 2008; CRUZ et al., 2009). Na estrutura do sorvete as proteínas contribuem para a coalescência parcial e formação da rede que aprisiona os glóbulos de gordura que são adsorvidos na interface ar, aumentando a aeração (*overrun*) e a estabilidade da espuma (VEJA; GOFF, 2005).

Adicionalmente, foi observado que nos tratamentos desta pesquisa a transglutaminase adicionada agiu sobre as proteínas do leite,

formando ligações cruzadas que constituíram um filme proteico mais firme e resistente (PINTERITS; ARNTFIELD, 2008).

Conforme os resultados de superfície de resposta os tratamentos T2, T4, T6 e T8 apresentaram *overrun* elevado nessa temperatura, a formação de *overrun* foi maior, devido a melhor atuação da enzima transglutaminase, aumentando a susceptibilidade das proteínas para formar ligações cruzadas. As proteínas do leite são capazes de reagir com a transglutaminase com e sem aquecimento. No leite não aquecido a κ -caseína foi a proteína mais susceptível para formar ligação cruzada; no leite pré-aquecido as caseínas κ e β foram as menos susceptíveis (SHARMA et al., 2001).

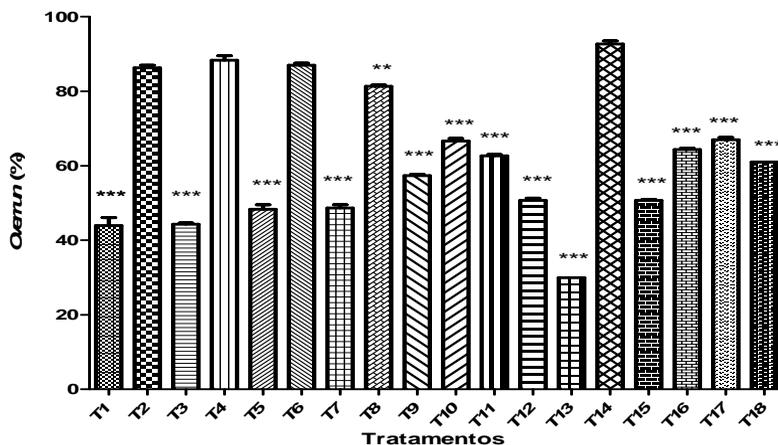
Para Li e Chen (1999), o desnovelamento da estrutura das proteínas do soro é pré-requisito para o acesso da transglutaminase aos sítios de ação. O calor provavelmente introduz alterações conformacionais e estruturais em proteínas e mudanças proximais em alguns resíduos lisil e glutamil. As caseínas são mais susceptíveis a ligação cruzada que as proteínas do soro, e a quantidade de polímeros formados aumenta com o tempo de incubação (ABOUMAHMOUD; SAVELLO, 1990).

Além disso, a transglutaminase tem a capacidade de alterar a conformação do gel, retendo água na estrutura proteica; e através da sua ação, formam-se ligações cruzadas com as proteínas, afetando a microestrutura do sorvete, que apresenta pequenos agregados proteicos unidos, que permanecem intactos em condições de estocagem e impedem que a água saia da estrutura do gel (SCORSCH et al., 2000b).

Nesses tratamentos, devido à imobilização da água, evitando a formação de cristais de gelo, estabilizando a interface ar/água, ocorrendo uma maior incorporação de bolhas de ar no meio, levando ao aumento do *overrun* e formando uma estrutura de sorvete mais firme e suave.

A análise de ANOVA para o *overrun* em todos os tratamentos T1 a T18 apresentou (***) diferenças estatísticas significativas ($p < 0.0001$) e (**) diferenças significativas ($p < 0.001$) entre todos os tratamentos, conforme figura 5.

Figura 5 - Gráfico das análises estatísticas do *overrun* nos tratamentos T1 a T18 dos sorvetes de morango *diet*. (*) diferenças estatísticas significativas ($p < 0.0001$); e (**) diferenças significativas ($p < 0.001$) em relação ao tratamento T2.**



Em relação ao tratamento T2, observamos que houve diferenças estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) para os tratamentos T1, T3 T5, T7, do T9 ao T18, exceto para o T14, que apresentou diferença significativa menor em relação ao T02 ($p < 0,001$).

As formulações T2, T4, T6, T8 e T14 apresentaram os melhores valores de *overrun*. Os tratamentos T2, T4, T6 e T8 não apresentaram diferenças significativas entre si ($p > 0,05$), enquanto o tratamento T14 diferiu significativamente ($P < 0,05$).

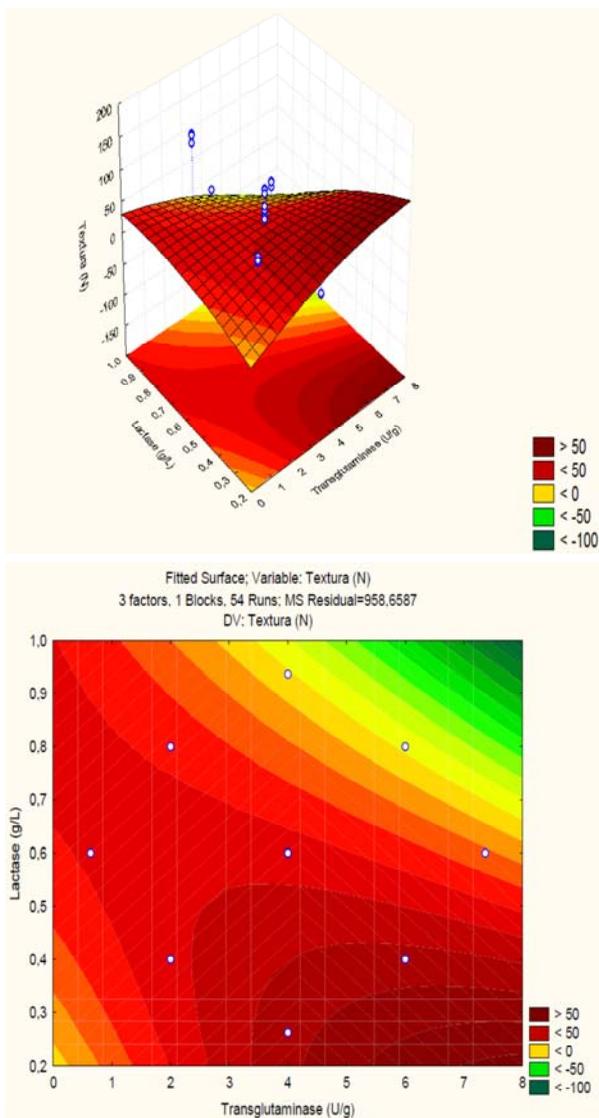
3.3.2 Avaliações da textura

Nos Apêndices F, G e H são apresentadas as tabelas de ANOVA, efeitos dos fatores e coeficientes de regressão do modelo de superfície de resposta de segunda ordem para a textura (N). As variáveis em vermelho são significativas para a taxa de derretimento (g/min) em nível de 5 % ($p < 0,05$). Os efeitos menos significativos podem ser ignorados na construção do modelo, sendo o coeficiente de determinação encontrado no modelo de superfície de resposta para a textura $R^2 = 0,4979$ indicando que o modelo não é adequado para representar os dados experimentais, o que pode ser explicado pela

grande variabilidade encontrada no procedimento experimental para determinar a textura.

Os resultados das análises de textura nas diferentes concentrações da enzima transglutaminase combinadas com diferentes concentrações das enzimas lactase adicionadas em sorvete de morango *diet* na temperatura de 20 °C são apresentados na figura 6, a seguir.

Figura 6 - Gráfico da análise da superfície de resposta para textura referentes às variações da concentração das enzimas transglutaminase e lactase adicionadas às formulações sorvete de morango *diet* preparadas na temperatura de 20 °C.



Sob a temperatura de 20 °C utilizando as concentrações da enzima lactase (0,3 g/L) foram obtidas texturas superiores a 50 N em concentrações acima de 7 U/g de transglutaminase.

No entanto, em menores concentrações da enzima de transglutaminase (1 U/g proteína) e utilizando concentrações de lactase acima de 0,65 g/L, maior foi a textura; valores de textura mais baixos serão obtidos com maiores concentrações de lactase e transglutaminase associadas.

Podemos concluir que utilizando maiores concentrações da enzima transglutaminase e baixas concentrações de lactase em temperaturas baixas, obtém-se maior textura.

As reações enzimáticas são fortemente dependentes de ótima temperatura, que influencia diretamente a atividade da enzima, aumentando a velocidade da reação e, por consequência, a conversão do substrato em produto. Temperaturas abaixo ou acima dessa faixa inibem a atividade enzimática; por outro lado, sob temperaturas muito superiores ocorre a inativação da enzima, devido a sua desnaturação (CARMINATTI, 2001).

Mesmo sob temperatura baixa (20 °C) e menores concentrações de lactase, conforme os tratamentos T3 e T7, maiores concentrações de transglutaminase aumentaram a textura do sorvete. Damodaran (2007) observou que o gel de proteína é responsável pela formação de uma rede tridimensional de moléculas de proteínas agregadas. Essa rede protéica aprisiona a água por forças capilares, formando pequenos cristais de gelo que influem diretamente na textura.

Quando usada maior concentração da enzima, ocorre um decréscimo na força do gel, e este, por sua vez, fica mais fraco e perde sua capacidade de reter água, podendo ocorrer a sinérese. O excesso de ligações ϵ -(γ -Glu) Lys pode inibir o desenvolvimento uniforme da rede proteica (KURAISHI et al., 1996).

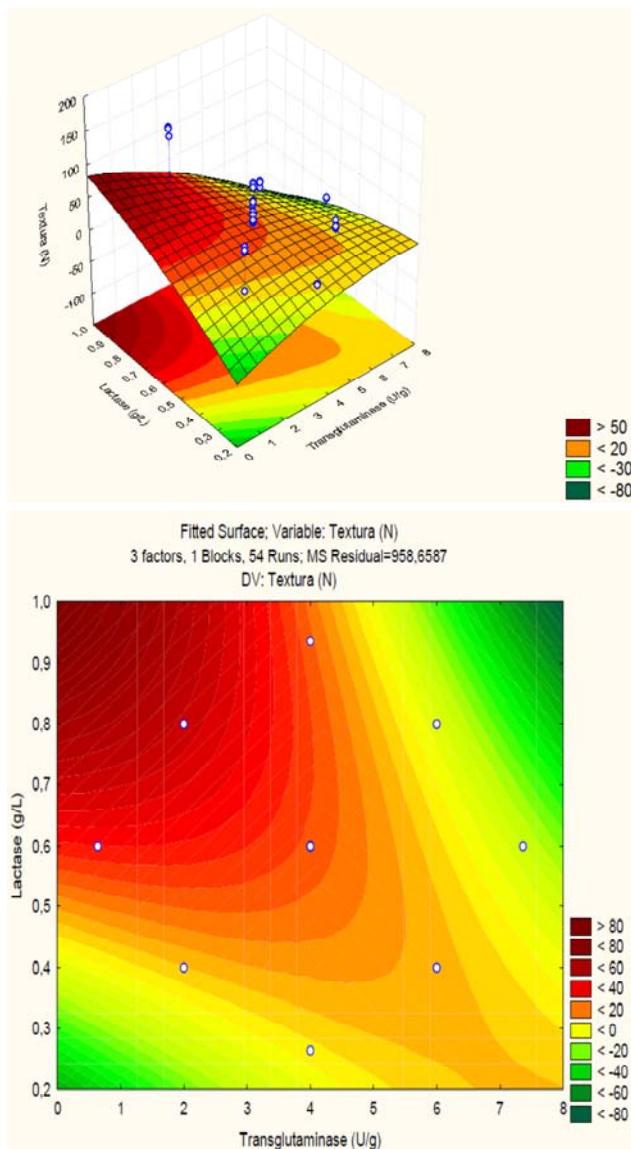
Estudos relatam que polimerização proteica excessiva da enzima transglutaminase favorece a formação de estrutura com maior força de quebra, mas com textura frágil, quebradiça e não flexível (KURAISHI, YAMAZAKI; SUSA, 2001); demonstrando a necessidade de utilizar quantidades apropriadas da enzima transglutaminase para cada tipo de alimento, evitando a polimerização excessiva.

A textura do sorvete depende de muitos fatores, como: a agregação dos glóbulos de gordura, quantidade de ar, viscosidade da fase aquosa e tamanho dos cristais de gelo. A qualidade final do produto, particularmente a textura refinada e a sensação de frescor percebida pelo consumidor, depende, além da formulação, da sua estrutura, que é

definida principalmente pela distribuição, tamanho, morfologia das bolhas de ar e cristais de gelo. (Kus; ALTAN; KAYA, 2005).

O resultado das análises de textura para as diferentes concentrações da enzima transglutaminase combinadas com diferentes concentrações da enzima lactase adicionadas em sorvete de morango *diet* na temperatura de 30 °C está apresentado na figura 7, a seguir.

Figura 7 - Gráfico da análise da superfície de resposta para textura referente às variações da concentração das enzimas transglutaminase e lactase adicionadas às formulações sorvete de morango *diet* preparadas sob temperatura de 30 °C.



Na temperatura de 30 °C, ocorre interação entre as concentrações das enzimas lactase e transglutaminase. Em concentrações menores que 0,3 g/L da enzima lactase, utilizando maiores concentrações da enzima transglutaminase, obtiveram-se valores de textura inferiores a 10 N, confirmando que a enzima transglutaminase aumenta a firmeza dos sorvetes, devido ao fortalecimento da rede proteica, produzindo uma emulsão uniforme estável e diminuindo a formação de cristais de gelo (GOFF, 2006).

Por outro lado, em maiores concentrações da enzima lactase, acima de 0,55 g/L, com concentrações maiores da enzima transglutaminase, foi menor a textura obtida. Isso se explica pela atuação combinada das enzimas lactase e transglutaminase, que, reduzindo a quantidade de água do meio pela hidrólise da lactose, elevou a quantidade de sólidos totais (proteínas), podendo ter polimerizado as proteínas, formando ligações cruzadas sob temperaturas próximas da temperatura ótima das enzimas.

O fortalecimento da rede de proteínas produz uma textura uniforme e emulsão estável, reduzindo a formação de cristais de gelo durante o armazenamento (EL-NAGAR et al., 2002). A atuação da enzima transglutaminase na formação de uma rede de proteínas mais coesa através das proteínas do leite polimerizadas, podendo reduzir a cristalização do gelo, o que torna o sorvete mais macio.

Em concentrações de enzima lactase maiores que 0,9 g/L, as texturas foram as maiores encontradas, variando de 40 a 80 N para baixa concentração de transglutaminase (< 4 U/g).

Conclui-se que para obter maiores texturas – acima de 80 N – sob a temperatura 30 °C, o ideal é utilizar maiores concentrações da enzima lactase com menores concentrações da enzima transglutaminase.

A polimerização das proteínas pela enzima transglutaminase formou um gel mais firme, exigindo maior força para romper o gel, devido ao maior número de ligações cruzadas formadas no produto (KURAIISHI; SAKAMOTO; SOEDA, 1996; BONISCHI et al., 2007). Todavia, convém salientar que a textura elevada não é característica de qualidade desejada no sorvete.

A desejável leveza do sorvete está intimamente relacionada com sua firmeza: um produto mais leve, menos denso, apresentará menor firmeza e menor força será necessária para cisalhá-lo (SILVA, 2004).

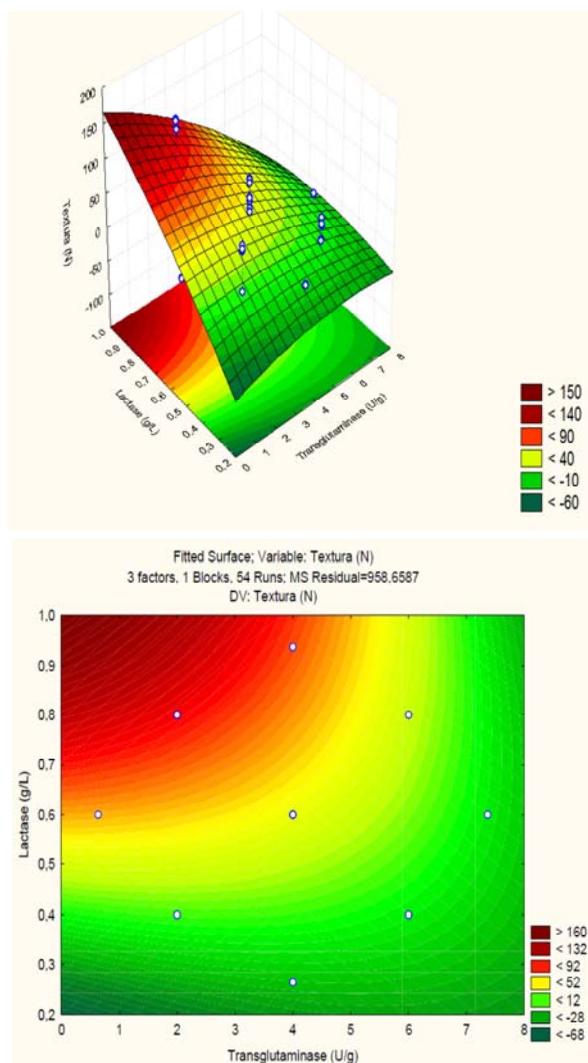
Andrade (2005) obteve maior hidrólise da lactose a 35 °C, reduzindo o teor de lactose e conseqüentemente aumentando o teor de sólidos totais do leite (proteínas), o que pode ter contribuindo para

melhor polimerização das proteínas do leite pela enzima transglutaminase, favorecendo a formação de textura mais firme.

Quando incubada a 35 °C por 100 minutos, a região N-terminal hidrofílica da β -caseína guarda resíduos de glutaminas que se tornam disponíveis à ação de polimerização pela transglutaminase no meio aquoso. Esse processo é altamente específico, pois os resíduos de glutamina da β -caseína são preferencialmente modificados pela transglutaminase. A exposição dos resíduos de glutamina resulta da interação com o solvente aquoso ou com a carga dos aminoácidos adjacentes à glutamina. (O'CONNEL; KRUIF, 2003).

O resultado das análises de textura das diferentes concentrações da enzima transglutaminase combinadas com diferentes concentrações da enzima lactase adicionadas em sorvete de morango *diet* sob temperatura de 40 °C são apresentados na figura 8, a seguir.

Figura 8 - Gráfico da análise da superfície de resposta para textura referente às variações de concentração das enzimas transglutaminase e lactase adicionadas às formulações sorvete de morango *diet* preparadas sob temperatura de 40 °C.



Para concentrações da enzima lactase abaixo de 0,4 g/L na temperatura de 40 °C, as texturas obtidas foram inferiores a 12 N nas concentrações da enzima transglutaminase, variando em toda a faixa estudada.

Entretanto, em concentrações acima de 0,6 g/L da enzima lactase, utilizando maiores quantidades da enzima transglutaminase, foram obtidas menores texturas, com variações maiores em função do aumento da concentração da lactase, possivelmente as enzimas formaram uma estrutura mais coesa, formando bolhas de ar, cujas propriedades térmicas evitam a movimentação da água do meio para formar cristais de gelo, que afetariam a textura do sorvete, tornando-o mais duro.

Um sorvete com menor textura apresenta menor firmeza, mais leveza e, portanto, menor força será necessária para cisalhá-lo. De maneira semelhante, Wang et al. (2007) observaram que a atuação da enzima transglutaminase formou uma rede proteica mais coesa através da polimerização das proteínas lácteas presentes no sorvete, diminuindo a formação de cristais e melhorando-lhe a firmeza.

Desta forma, concentrações da enzima lactase superiores a 0,8 g/L resultaram em textura maior que 160 N com utilização da enzima transglutaminase em concentração de até 3 U/g proteína.

O efeito do tempo de incubação foi também investigado por outros grupos de investigação (LAUBER et al., 2000; DE JONG; KOPPELMAN, 2002; JAROS et al., 2006b, 2010), que têm enfatizado a importância de controlar o grau da polimerização promovida pela enzima transglutaminase, uma vez que a polimerização excessiva provoca a formação de grandes oligômeros que reduzem, ou mesmo inibem, o desenvolvimento de uma rede proteica mais uniforme, formando regiões com estruturas de diferentes graus de rigidez.

Entretanto, quando foram utilizadas as mesmas concentrações de lactase (0,8 g/L), as texturas encontradas foram menores que 12 N com utilização da enzima transglutaminase em concentrações maiores que 6,5 U/g proteína.

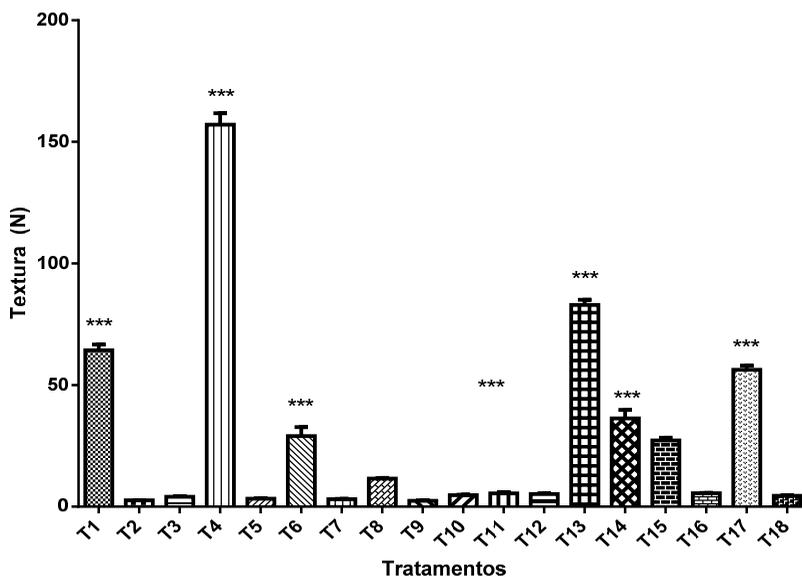
Para Jaros et al. (2010), em soluções de caseína e leite cru bovino na presença de enzima transglutaminase inativada por processos distintos (calor ou enzimático), causou máxima rigidez do gel proteico (monitorada em função do tempo de armazenamento), após incubação na concentração de 3 U/g proteína sob temperatura de 40 °C.

Eissa e Khan (2006) encontraram resultados semelhantes para isolado proteico de soro desnaturado quimicamente. Segundo esses autores, o reduzido grau de interações hidrofóbicas pode ter sido

causado pela estrutura compacta da proteína resultante das ligações cruzadas promovidas pela transglutaminase; na formação dessa rede proteica, os agregados formados apresentaram em seu interior os resíduos hidrofóbicos que levaram a formar textura mais firme.

Na figura 9, as análises de ANOVA para textura nos tratamentos T1 a T18 apresentaram (***) diferenças estatísticas significativas ($p < 0.0001$) e diferenças estatísticas significativas para (**) ($p < 0.001$) em relação ao tratamento T2.

Figura 9 – Gráfico das análises estatísticas da textura nos tratamentos T1 a T18 dos sorvetes de morango *diet*. (*) diferença estatística significativa ($p < 0.0001$); (**) significativo ($p < 0.001$) em relação ao tratamento T2.**



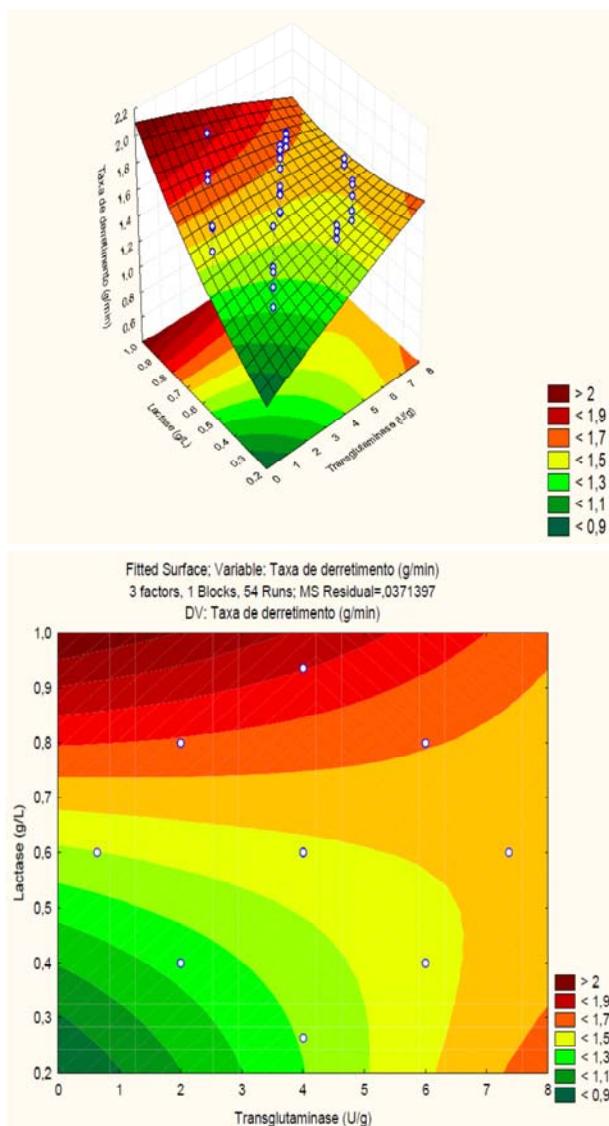
3.3.3 Avaliação da taxa de derretimento (g/min)

Nos Apêndices I, J e K são apresentadas as tabelas de ANOVA, efeitos dos fatores e coeficientes de regressão do modelo de superfície de resposta de segunda ordem para a taxa de derretimento (g/min). As variáveis em vermelho são significativas para a taxa de derretimento (g/min) em nível de 5 % ($p < 0,05$). Os efeitos menos significativos

podem ser ignorados na construção do modelo, sendo o coeficiente de determinação encontrado para o modelo de superfície de resposta para a taxa de derretimento $R^2 = 0,35397$, indicando que o modelo não é adequado para representar os dados experimentais, provavelmente pela grande variabilidade encontrada no procedimento experimental.

Na figura 10, resultado das análises de taxa de índice de derretimento para a concentração da enzima transglutaminase combinadas com diferentes concentrações da enzima lactase adicionadas em sorvete de morango *diet* na temperatura de 20 °C.

Figura 10 - Gráfico da análise da superfície de resposta para a taxa de índice de derretimento referente às variações da concentração das enzimas transglutaminase e lactase adicionadas às formulações de sorvete de morango *diet* preparadas na temperatura de 20 °C.



Sob temperatura de 20 °C e em concentrações da enzima lactase menores que 0,6 g/L associadas com concentrações maiores da enzima transglutaminase ocorrem maiores índices de derretimento. Conclui-se que em temperaturas baixas de incubação (20 °C) ocorreram maiores índices de derretimento, em concentrações altas da enzima transglutaminase e baixas concentrações da enzima lactase, demonstrando que a enzima transglutaminase não formou ligações cruzadas coesas, afetando o índice de derretimento, pela taxa de formação de ar e cristais de gelo. Segundo Goff (2005), a temperatura e a taxa de transferência de calor podem influir no derretimento de sorvetes.

O menor índice de derretimento (0,9 g/min) ocorreu em concentrações da enzima transglutaminase até 1 U/g proteína e concentrações da enzima lactase menores de 0,3 g/L, alcançando índices de derretimento maiores (1,7 g/min) com concentrações da enzima transglutaminase maior que 7 U/g proteína com as mesmas concentrações de enzima lactase (0,3 g/L).

Contudo, em concentrações da enzima lactase superiores a 0,7 g/L, menor será o índice de derretimento quanto maior for a concentração da enzima transglutaminase; os tratamentos T5 e T7 apresentaram menor índice de derretimento.

Pode ter ocorrido maior polimerização das proteínas pela enzima transglutaminase, aumentando o peso molecular e formando uma rede tridimensional proteica mais coesa e firme, que estabiliza os glóbulos de gordura, afetando o derretimento dos sorvetes, resultando num derretimento mais lento (MUSE; HARTEL, 2004; CRUZ et al., 2009).

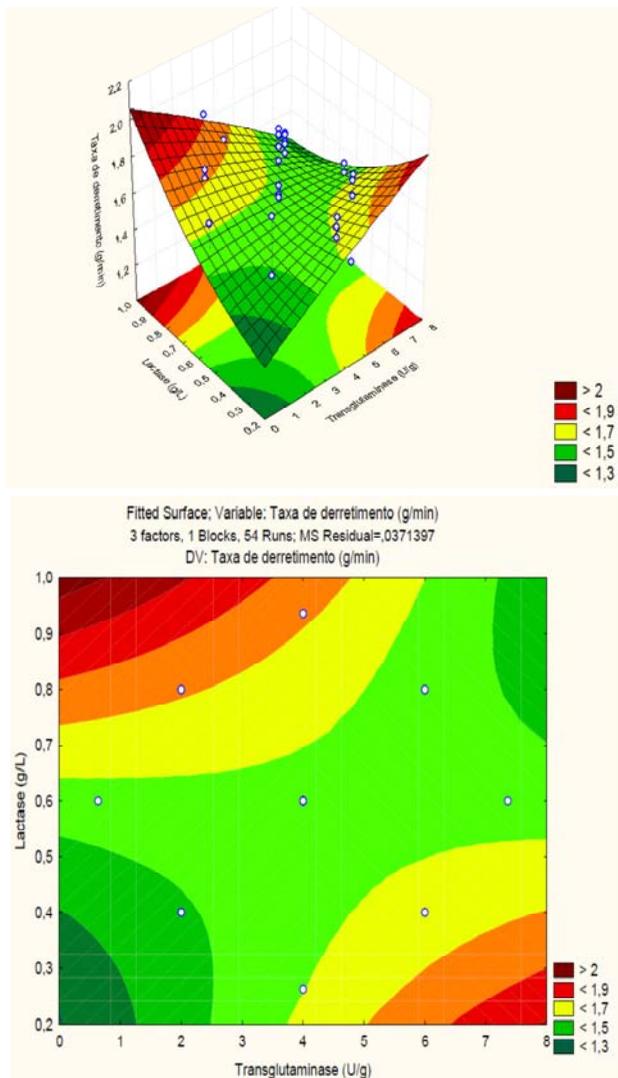
Estudos realizados por Goff (2006) e Metwally (2007) demonstraram que a associação dos glóbulos de gordura com as proteínas do soro do leite e das caseínas aumentou as propriedades de coesão das membranas das bolhas de ar e a aderência do filme adsorvidos dos glóbulos de gordura, ao serem polimerizados pela enzima transglutaminase. Esses glóbulos de gordura coalescidos constroem uma rede semicontínua que estabiliza as bolhas de ar, resultando em propriedades benéficas na formação de corpo, como textura mais suave e maior resistência ao derretimento (GOFF, 2007).

Maiores concentrações da enzima lactase podem ter contribuído para melhorar a polimerização das proteínas pela enzima transglutaminase, devido ao aumento do teor de sólidos totais do leite (Longo, 2006), induzindo a uma maior atuação da enzima

transglutaminase, melhorando o corpo do produto e aumentando sua resistência à fusão (derretimento).

Os resultados da análise de índices de derretimento para a concentração da enzima transglutaminase combinada com diferentes concentrações da enzima lactase adicionadas a sorvete de morango *diet* na temperatura de 30 °C são apresentados na figura 11, a seguir.

Figura 11 - Gráfico da análise da superfície de resposta para a taxa de derretimento para a concentração da enzima transglutaminase combinada com diferentes concentrações da enzima lactase adicionadas a sorvete de morango *diet* na temperatura de 30 °C.



Temperatura de 30 °C e menores concentrações de lactase (até 0,4 g/L) aumentaram a taxa de derretimento do sorvete em função do aumento da concentração de transglutaminase.

Podemos afirmar que no tratamento realizado nesta temperatura (T11), ou seja, em condições mais próximas da temperatura ótima das enzimas utilizadas no presente estudo, houve maior taxa de derretimento, devido a maior formação de ligações cruzadas com as proteínas e a hidrólise da lactose, formando grandes aglomerados que reduzem ou mesmo inibem o desenvolvimento de uma rede proteica mais firme, diminuindo a formação de bolhas de ar, que são bons isolantes térmicos, afetando a taxa de derretimento do sorvete.

Quando são formadas, as bolhas de ar são envolvidas por gorduras e proteínas e definem a estrutura do produto final, proporcionando ao sorvete uma maior quantidade de espuma, estabilidade, maior textura e maior porcentagem de derretimento (SOFJAN. HARTEL, 2004, SOUKOULIS. CHANDRINOS, TZIA, 2008, CRUZ et al., 2009, AKHTAR et al., 2009).

As menores taxas de derretimento foram encontradas quando combinadas concentrações inferiores a 0,4 g/L de lactase e inferiores a 1,3 U/g proteína de transglutaminase, obtendo-se índice de derretimento menor que 1,3 g/min.

Os tratamentos T15, T16, T17 e T18 apresentaram taxas de derretimento menores que 1,3 g/min, evidenciando provável formação de ligações cruzadas menos firmes pela enzima transglutaminase, afetando a distribuição das bolhas de ar, a coalescência dos glóbulos de gordura, que pode ser afetada pelo batimento durante o processamento do sorvete.

O fenômeno do derretimento é governado por vários fatores, entre os quais a taxa de incorporação de ar ou *overrun* (SOFJAN; HARTEL, 2004), as interações lipídicas e a cristalização da gordura (GRANGER et al., 2005).

Em concentrações acima de 0,7 g/L de lactase, houve diminuição na taxa de derretimento com o aumento na concentração de transglutaminase, mas se obteve taxa de derretimento menores que 1,5 g/min, quando usadas concentrações da enzima lactase maiores que 0,7 g/L e concentrações da enzima transglutaminase maiores que 7 U/g proteína.

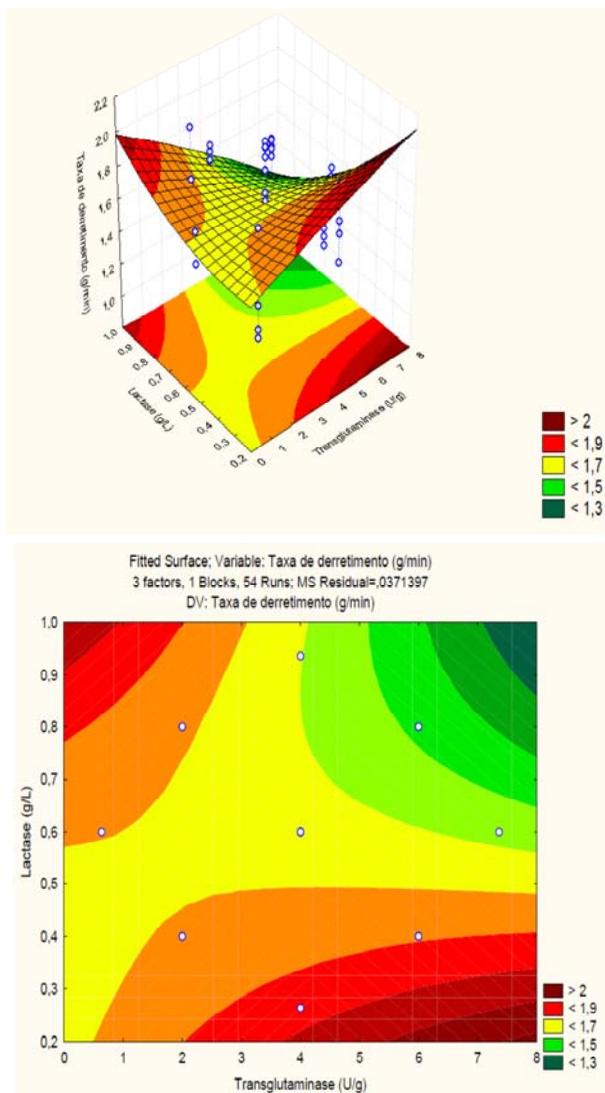
O tratamento T18, com concentrações maiores da enzima transglutaminase, apresentou taxa de derretimento mais baixo. GOOF (2006), demonstrou em estudos que para formar uma rede semicontínua, os glóbulos de gordura coalescidos estabilizam as bolhas de ar e inibem

a formação de cristais de gelo, formando uma rede mais firme e diminuindo a taxa de derretimento.

Normalmente a taxa de derretimento do sorvete envolve tanto a transferência de calor quanto o fenômeno de transferência de massa. Durante o descongelamento, quando ocorre a condução de calor gradual da região externa para a região interna do sorvete, o descongelamento leva a uma troca de calor que promove o derretimento de cristais de gelo. A fase líquida produzida é difundida juntamente com a fase contínua que vai de uma parte líquida descongelada para uma parte sólida (com maior viscosidade), fluindo devido à gravidade, por meio de uma estrutura complexa de espuma do sorvete (MUSE; HARTEL, 2004; SOULOULIS; CHANDRINOS; TZIA, 2008).

Os resultados da análise de taxa de índice de derretimento para a concentração da enzima transglutaminase combinada com diferentes concentrações da enzima lactase adicionadas em sorvete de morango *diet* na temperatura de 40 °C são apresentados na figura 12, a seguir.

Figura 12 - Gráfico da análise superfície de resposta para a taxa de índice de derretimento para a concentração da enzima transglutaminase combinada com diferentes concentrações da enzima lactase adicionadas a sorvete de morango *diet* na temperatura de 40 °C.



Sob temperatura de 40 °C em concentrações da enzima lactase menores que 0,4 g/L ocorreu maior taxa de derretimento em função do aumento na concentração da enzima transglutaminase.

Por outro lado, concentrações da enzima lactase maiores que 0,6 g/L diminuíram a taxa de derretimento para as maiores concentrações da enzima transglutaminase que apresentaram menores taxas de derretimento; a temperatura de 40 °C, próxima da ótima de atuação da enzima lactase, proporcionou a polimerização das proteínas, formando uma rede mais firme.

A κ - e a β -caseína são proteínas do leite presentes nas formulações de sorvete, mais susceptíveis ao ataque da enzima transglutaminase (LORENZEN, 2007); o aquecimento prévio das proteínas do soro α -lactoalbumina e β -lactoglobulina promovem a desnaturação e aumentam a interação dessas proteínas com as micelas de caseínas, aumentando a polimerização das proteínas pela enzima transglutaminase (RODRIGUES-NOGALES, 2008), construindo uma rede tridimensional mais firme, com a interação proteína/glóbulos de gordura/bolhas de ar, reduzindo a velocidade do derretimento do sorvete.

Dessa forma, a taxa de derretimento foi obtida com a combinação de concentrações da enzima transglutaminase maiores que 7 U/g proteína e concentrações da enzima lactase maiores que 0,85 g/L, obtendo-se taxa de derretimento de 1,3 g/min.

Nos tratamentos T2, T4 e T6 houve uma taxa de derretimento maior do que os demais. A reação das enzimas lactase e transglutaminase, atuando em temperaturas ótimas, pode ter provocado maior aglomeração de sólidos totais, (aumentando a viscosidade do meio) inibindo a formação de bolhas de ar, cujas propriedades térmicas evitam a movimentação da água do meio para formar pequenos cristais de gelo que auxiliam na manutenção da estrutura do sorvete (KURAISHI; SAKAMOTO; SOEDA, 1996; BONISCHI et al., 2007), formando uma rede proteica menos firme, o que aumenta sua taxa de derretimento.

A presença do ar na estrutura do sorvete auxilia no controle do tamanho dos cristais de gelo e torna a textura mais leve e suave, além aumentar a resistência ao derretimento, por ser uma barreira térmica, não favorecendo as trocas de calor necessárias para o derretimento dos cristais de gelo (KOXHOLT; EISENMANN; HINRICHS, 2001; CLARKE, 2004; SOFJAN; HARTEL, 2004).

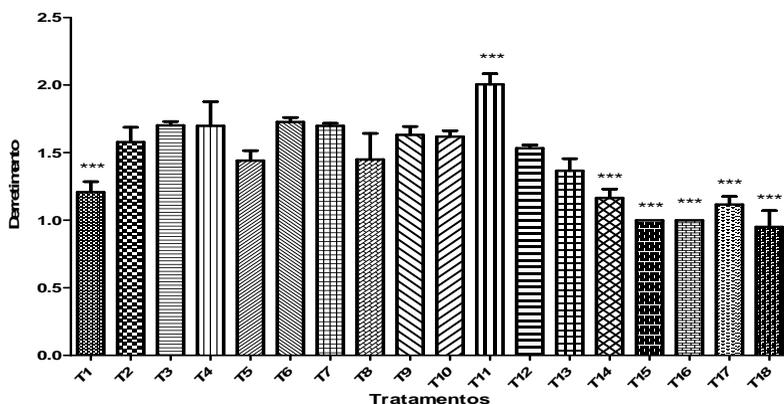
Durante o derretimento, dois eventos principais acontecem: o derretimento dos cristais de gelo e o colapso da estrutura espumosa

lipídica estabilizada (GOFF, 2005). O fenômeno derretimento pode ser controlado por vários fatores, destacando-se: a taxa de incorporação de ar ou *overrun* (SOFJAN; HARTEL, 2004); as interações lipídicas e a cristalização da gordura (GRANGER et al., 2005); tipo e concentração de emulsificante (BOLLIGER et al., 2000), além do diâmetro dos glóbulos de gordura (KOXHOLT et al., 2001; OLSON et al., 2003).

A gordura e as proteínas envolvem as bolhas de ar formadas, definindo a estrutura do produto e proporcionando maior estabilidade à espuma do sorvete, melhor textura e menor taxa de derretimento. (SOFJAN; HARTEL, 2004; SOULOUKIS; CHANDRINOS; TZIA, 2008; CRUZ et al., AKHTAR et al., 2009).

Nas análises de ANOVA (figura 13) da taxa do índice de derretimento nos tratamentos T1 a T18 dos sorvetes de morango *diet* apresentaram (***) diferença estatística significativa ($p < 0.0001$); (**) e diferenças significativas ($p < 0.001$) em relação ao tratamento T2.

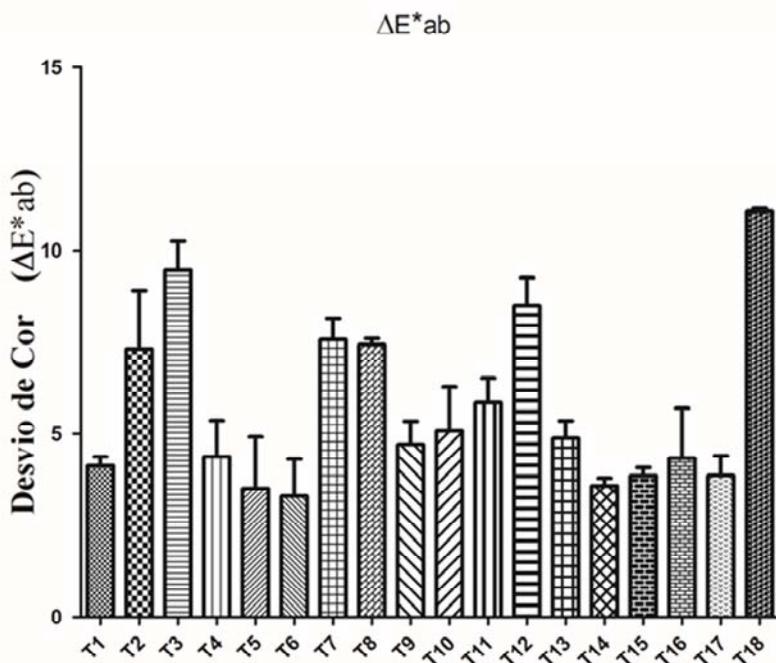
Figura 13- Gráfico da análise estatística da taxa do índice de derretimento nos tratamentos T1 a T18 dos sorvetes de morango *diet*. (*) diferença estatística significativa ($p < 0.0001$); (**) significativo ($p < 0.001$) em relação ao tratamento T2.**



3.3.4 Avaliação da colorimetria

Os resultados da análise de colorimetria dos tratamentos são apresentados nas figuras abaixo. Não houve diferenças significativas entre todos os tratamentos, quando comparados ao padrão estabelecido, conforme figura 14, a seguir.

Figura 14 - Gráfico da análise do desvio de cor (ΔE^*ab) dos tratamentos de sorvete de morango *diet*, calculado com base nos valores de L^* , a^* e b^* do padrão produzidos a 40 °C.



Para calcular o (ΔE^*ab) foi necessário escolher um único padrão externo aos tratamentos realizados, uma vez que se fossem usados os valores de tratamentos T1 a T18, o cálculo seria inviável para o tratamento selecionado.

Nessa escolha, foi considerado o padrão do tratamento T2, pois essa formulação foi selecionada para a análise sensorial por ter apresentado melhor índice de derretimento e bandas de polimerização decorrentes da ação da enzima transglutaminase, na eletroforese.

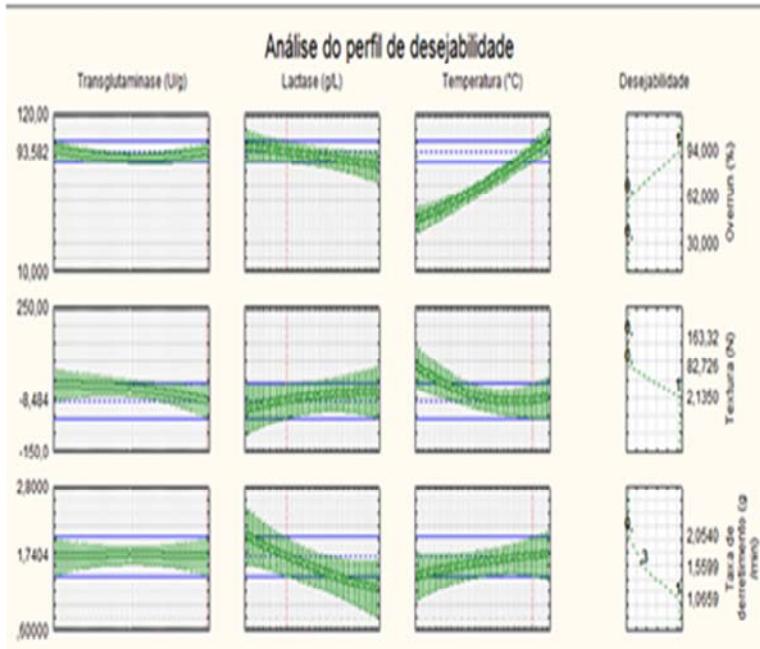
Os resultados da análise do desvio de cor dos sorvetes de morango *diet* não apresentaram diferenças significativas em nível de ($P < 0,05$), segundo análise ANOVA de uma via. Estes resultados estão de acordo com Tseng et al. (2000), que não encontraram efeito negativo da transglutaminase em relação à cor do produto elaborado.

3.3.5 Otimização

3.3.5.1 Análise do perfil de desejabilidade

Análise do perfil de desejabilidade demonstra que para manter o equilíbrio entre as variáveis respostas, maior *overrun*, menor textura, menor taxa de derretimento sugere condições operacionais ótimas de maior temperatura no preparo da calda (40 °C), maior concentração de transglutaminase (7,4 U/g proteína) e uma concentração média de lactase (0,5 g/L). Essas condições podem levar a um sorvete com maior *overrun* e textura, taxa de derretimento e formação de cristais reduzidas, conforme figura 15, a seguir.

Figura 15 - Gráfico da análise do perfil de desejabilidade.



3.3.5.2 Comparação das amostras

Dentre todos os tratamentos (T1 a T18), o tratamento T02 foi o que apresentou melhor desempenho nas avaliações de *overrun*, textura e índice de derretimento, demonstrando que as enzima lactase e transglutaminase promoveram reações adequadas de hidrólise e polimerização das proteínas, formando um produto com alto *overrun*, textura adequada e baixo índice de derretimento.

O melhor perfil de desejabilidade foi obtido com o tratamento TD (Tratamento de Desejabilidade) que apresentou maior *overrun*, menor textura, menor taxa de derretimento e menor quantidade de cristais. Portanto, a condição dessa formulação é sugerida nas condições operacionais ótimas de maior temperatura no preparo da calda (40 °C), maior concentração de transglutaminase (7,4 U/g proteína) e uma concentração média de lactase (0,5 g/L).

Com base nesses resultados foram realizadas análises microbiológicas e sensoriais, para determinar qual sorvete era mais

aceito por provadores não treinados e assíduos consumidores de sorvetes.

As amostras produzidas foram: T02 com concentração de 0,4 g/L de enzima lactase e concentração de 2 U/g proteína de enzima transglutaminase; a amostra que apresentou melhor desejabilidade (TD) com concentrações de 0, 5 g/L de enzima lactase e concentrações de 7,4 U/g proteína de enzima transglutaminase e tratamento padrão (TP) sem adição de nenhuma enzima.

3.3.5.3 Análises microbiológicas

O resultado das análises microbiológicas dos tratamentos T02, TD e TP são apresentados na tabela 3, a seguir.

Tabela 3 - Resultado das análises microbiológicas dos tratamentos T02, TD e TP.

Análises Microbiológicas	T2	TD	TP
Contagens de coliformes a 45 °C (NMP/g)	< 2	< 2	< 2
Contagem Staphylococcus aureus, coagulase positiva/g (NMP/g)	<10 ²	< 10 ²	< 10 ²
Contagem de bolores e leveduras UFC/g	<10 ²	<10 ²	<10 ²
Pesquisa de Salmonella sp/25g (NMP/g)	Ausência em 25g	Ausência em 25 g	Ausência em 25g

Todos os tratamentos apresentaram-se dentro dos padrões estabelecidos pela Resolução da ANVISA Brasil (2001), demonstrando que as boas práticas de fabricação foram rigorosamente seguidas durante todo o processamento.

A aplicação das Boas Práticas de Fabricação – BPF e do sistema de Análise Perigos de Pontos Críticos de Controle – APPCC é de fundamental importância para evitar a contaminação dos sorvetes durante o processamento (EL-SHAREF et al., 2006), com vistas a obter um alimento seguro.

A qualidade do alimento compreende três aspectos fundamentais: nutricional, sensorial e microbiológico. O aspecto de qualidade sensorial é o mais intimamente relacionado à escolha do produto alimentício. Convém lembrar que a qualidade sensorial não é

uma característica própria do alimento: é o resultado da interação alimento/homem, com suas características intrínsecas, como aparência, sabor e textura, numa interação entre com as condições fisiológicas, psicológicas e sociais do indivíduo (DUTCOSTKY, 2007).

3.3.5.4 Análises sensoriais

O resultado das análises sensoriais dos tratamentos T02, TD e TP são apresentados abaixo.

As análises sensoriais dos produtos foram obtidas comparando-os por meio de duas escalas sensoriais tradicionalmente conhecidas: escala do ideal e escala hedônica (Apêndice A e B).

A escala do ideal utilizada tem 5 pontos, onde os valores de 1 e 2 significam um produto inferior ao considerado ideal pelo provador para o atributo avaliado. O valor 3 representa o ideal e, portanto, a quantidade do atributo suficiente e que representa o valor satisfatório ao provador naquilo que ele procura no produto. Os valores 4 e 5 representam qualidades acima do ideal, cujos atributos estão com seus valores sensoriais acima da expectativa dos provadores com relação ao produto.

A tabela 4 apresenta os resultados médios obtidos na análise sensorial realizada com base na escala do ideal. Nota-se que o tratamento T02 diferiu significativamente em nível de 5% com base no teste de comparação de média de Tukey, da amostra TP em todos os atributos avaliados.

Quando comparado com o tratamento TD, o tratamento T02 apresentou diferenças estatisticamente significativas em todos os atributos avaliados, exceto no atributo aparência.

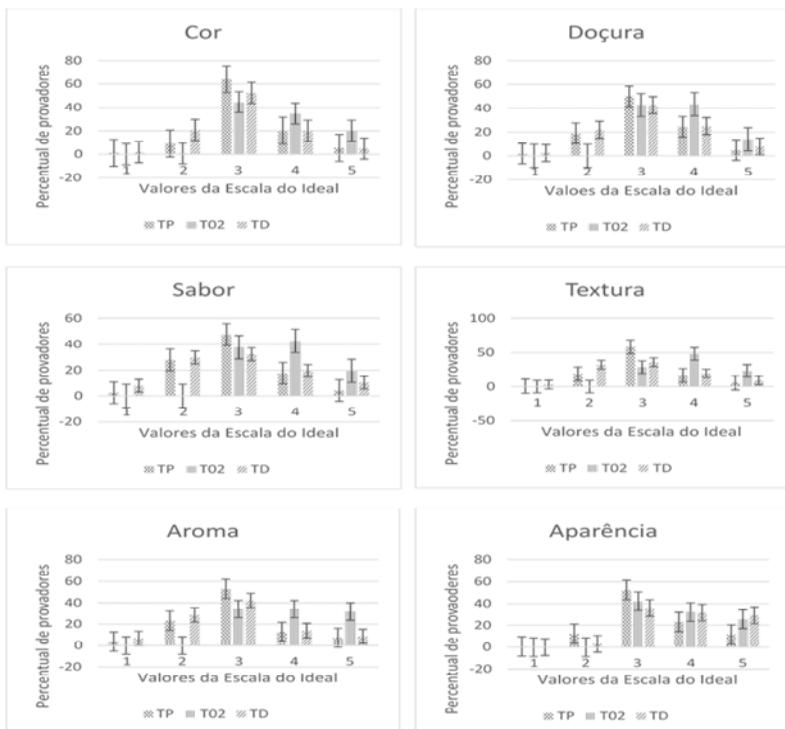
Tabela 4 - Resultados médios das notas atribuídas aos diferentes atributos sensoriais avaliados na análise sensorial por meio da escala do ideal de 5 pontos, realizada com o sorvete de morango *diet* obtido em duas formulações diferentes em comparação com o produto padrão.

Atributos sensoriais avaliados	Médias \pm desvio padrão das notas obtidas na escala do ideal		
	TD	T02	TP
Cor	3,2b \pm 0,73	3,7a \pm 0,78	3,1b \pm 0,82
Doçura	3,1b \pm 0,83	3,7a \pm 0,70	3,1b \pm 0,93
Sabor	2,9b \pm 0,85	3,8a \pm 0,74	2,9b \pm 1,11
Textura	3,1b \pm 0,77	3,9a \pm 0,72	3,0b \pm 1,01
Aroma	3,0b \pm 0,90	4,0a \pm 0,81	2,9b \pm 1,02
Aparência	3,3b \pm 0,86	3,8a \pm 0,81	3,9a \pm 0,87

Obs.: Médias seguidas por letras iguais nas linhas não diferem estatisticamente em nível de 5 % de probabilidade ($p < 0,05$).

Os tratamentos TP e TD tiveram suas médias mais próximas do valor 3, considerado ideal para o atributo pela escala, sendo que a T02 apresentou valores superiores aos considerados ideais para todos os atributos avaliados: mais cor, doçura, sabor, textura, aroma e aparência que o ideal. A figura 16 representa graficamente os resultados dessa análise.

Figura 16 - Gráficos obtidos com base nos seis atributos avaliados pela escala do ideal nos 3 sorvetes comparados.



Esses gráficos mostram que os quesitos sabor e doçura tiveram menor percentual de ideal, sendo avaliados, em todos os tratamentos, abaixo de 50 %, o que indica que o sabor do produto poderia ser melhorado, na opinião dos provadores.

Isto pode ser facilmente explicado por tratar-se de sorvete *diet*, sem sacarose em sua formulação, o que reduz a aceitação do produto por consumidores comuns não acostumados a consumir produtos adoçados com edulcorantes.

O tratamento TP apresentou percentual de ideal superior aos demais, em todos os atributos avaliados; os tratamentos T02 e TD apresentaram muitas avaliações superiores ao ideal. Acredita-se que os provadores tenham entendido que a quantidade superior dos atributos seria melhor e que nesse caso estariam qualificando produtos melhores

com valor mais que o ideal. Isso fica ainda mais claro quando se avaliam os resultados atribuídos aos produtos com base na escala hedônica. Para explorar de maneira mais completa esses dados, os provadores foram agrupados por meio da análise multivariada.

Essa análise fornece um mapa de preferência interno contendo três fatores (three-way preference mapping) (NUNES; PINHEIRO; BASTOS; 2011; NUNES et al., 2012), e pode ser utilizada para verificar a posição dos tratamentos na preferência dos provadores e aos atributos avaliados. No caso deste estudo, foi feita com base na nota atribuída ao produto pela escala do ideal.

Na figura 16, resultante da aplicação de tal técnica, observa-se que em relação aos dois principais fatores utilizados pelo modelo aplicado, prevalece a tendência de os provadores escolherem o tratamento T02, exatamente a amostra que apresentou as maiores médias.

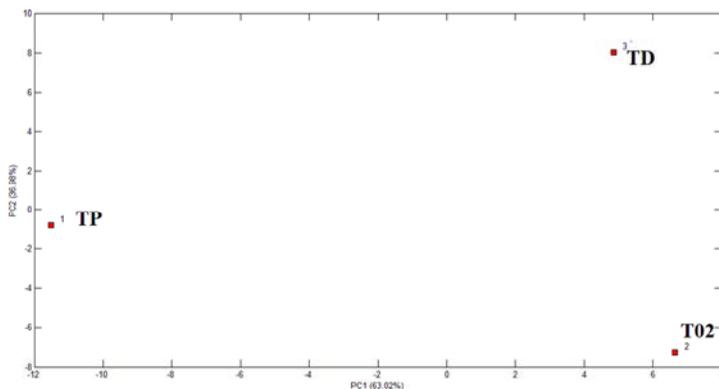
No caso de muitos atributos o tratamento T02 foi significativamente maior que os demais tratamentos (tabela 3). Tal constatação confirma a nota superior atribuída aos atributos do tratamento T02, ou seja, os provadores acreditaram que o tratamento T02 poderia ser relacionado com as notas equivalentes àquelas acima do ideal para todos os atributos avaliados.

Já o tratamento TD, que foi considerado ideal pela análise de superfície de resposta, ao ser submetida a avaliação sensorial humana apresentou valores abaixo do esperado, principalmente nos atributos cor, doçura, sabor, textura e aroma.

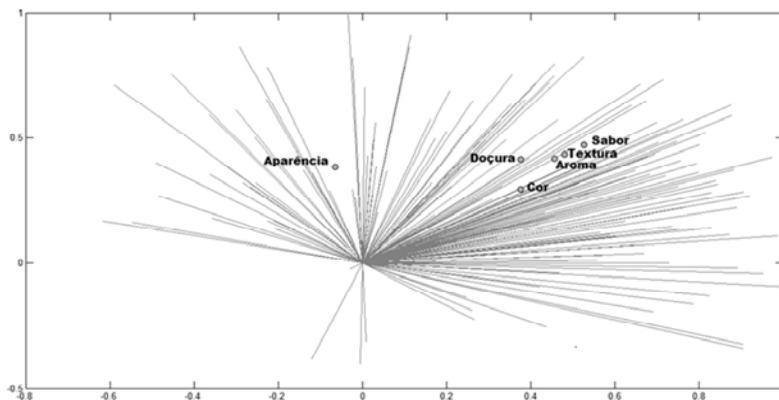
O TP apresentou-se mais distante de todos os atributos sensoriais avaliados, tendo sido o que apresentou valores inferiores ao ideal em todos os atributos avaliados.

Na figura 17, a seguir, o resultado de avaliação dos tratamentos pela escala do ideal.

Figura 17 - Gráficos obtidos com base nos resultados de avaliação por meio de escala do ideal.



(A) localização dos três diferentes tratamentos de sorvetes.



(B) Vetores individuais de cada provador e posicionamento relativo de cada um dos 6 atributos sensoriais

Quanto à concordância entre os provadores, nota-se que o TP foi o que apresentou menores valores nos atributos doçura, sabor, textura, aroma e aparência, tendo sido a amostra que mais discordância apresentou entre os degustadores. O T02 apresentou maiores valores de

concordância nos atributos cor, textura, aroma e aparência, enquanto a TD apresentou maiores valores para doçura e sabor (tabela 5).

Tabela 5 - Resultados do percentual de concordância das notas atribuídas aos diferentes atributos sensoriais avaliados na análise sensorial por meio da escala do ideal de 5 pontos, realizada com o sorvete de morango *diet* obtido em duas formulações diferentes em relação ao produto padrão.

Atributos Sensoriais Avaliados	Coeficiente de Concordância das notas obtidas na escala do ideal		
	T02	TD	TP
Cor	57,22	44,64	44,88
Doçura	43,00	48,64	35,31
Sabor	41,62	45,16	24,70
Textura	51,05	45,81	31,87
Aroma	44,47	40,88	33,65
Aparência	44,30	42,87	38,17

Obs.: Coeficiente de concordância calculado de acordo com SILVA; DUARTE; CAVALCANTI-MATA (2010).

Quando perguntado qual o produto preferido ficou clara a preferência pelo tratamento T02, que foi escolhido por 49 % dos provadores. Os dois tratamentos ficaram muito próximos, com 27 % em segundo lugar para a amostra TD e em último para o tratamento TP que apresentou 24 % de preferência dos provadores. Tal resultado mostrou-se consistente com a avaliação hedônica realizada pela escala hedônica de 9 pontos, cujos valores vão desde 1 - Desgostei muitíssimo; 5 – Indiferente até 9 - Gostei muitíssimo (Apendice A).

Essa escala foi utilizada para avaliar a preferência dos consumidores pelos atributos dos sorvetes como um todo, numa avaliação global. Na tabela 6, os resultados obtidos.

Tabela 6 - Resultados médios da avaliação hedônica e do percentual de concordância das notas atribuídas aos três sorvetes *diet* de morango obtidos em duas formulações diferentes, em comparação com o produto padrão.

Cálculos sensoriais avaliados	Médias \pm desvio padrão das notas obtidas na escala hedônica e % de concordância e aceitabilidade		
	TP	T02	TD
Avaliação Global	6,14c \pm 1,66	7,79a \pm 0,94	7,32b \pm 1,01
Coefficiente de Concordância	29,48	44,53	42,90
Índice de Aceitabilidade	68,22	86,58	81,30

Obs.: Médias seguidas por letras iguais nas linhas não diferem estatisticamente em nível de 5 % de probabilidade ($p < 0,05$). Coeficiente de concordância (CC) calculado de acordo com SILVA; DUARTE; CAVALCANTI-MATA (2010). Índice de Aceitabilidade (IA) conforme DUTCOSKY (2007).

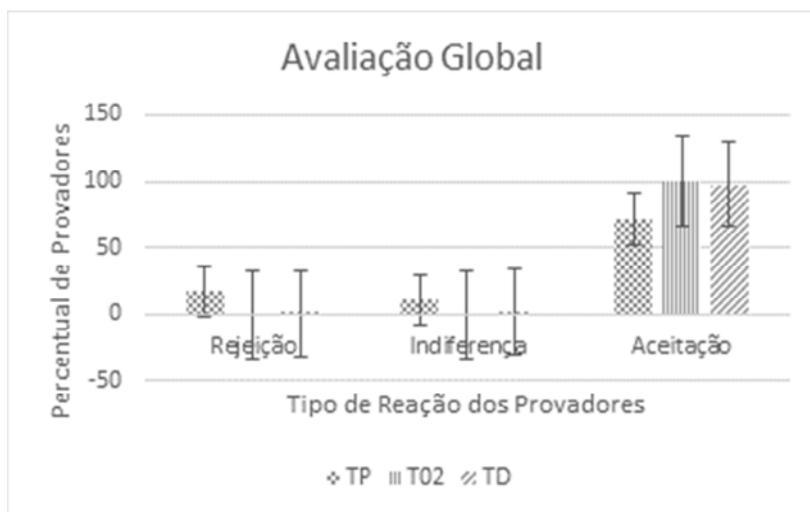
Entre todos os tratamentos houve diferença estatisticamente significativa em nível de 5 % pelo teste Tukey. Os resultados mostram com clareza a ordem de preferência dos provadores que consideraram o tratamento TP o menos preferido, enquanto o tratamento T02 foi o mais preferido.

O tratamento T02 foi a aquele que apresentou maior média significativamente melhor que os demais, tendo igualmente apresentado maior coeficiente de concordância e maior Índice de Aceitação (IA).

De acordo com Dutcosky (2007), para boa repercussão sensorial, o produto deve apresentar um IA maior do que ou igual a 70 %. Portanto, o tratamento TP apresentou baixa aceitabilidade, não sendo adequado para comercialização, enquanto os tratamentos T02 e TD foram aprovados sensorialmente podendo ser indicados para comercialização.

No gráfico da figura 18, os percentuais de aceitação, indiferença e rejeição dos três produtos.

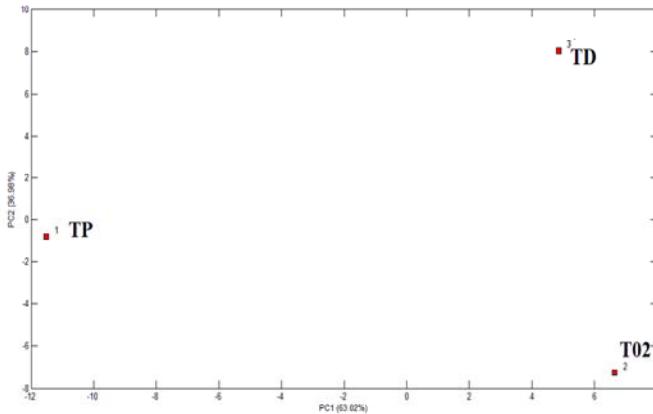
Figura 18 - Gráfico obtido com base nas notas dadas aos produtos segundo a escala hedônica.



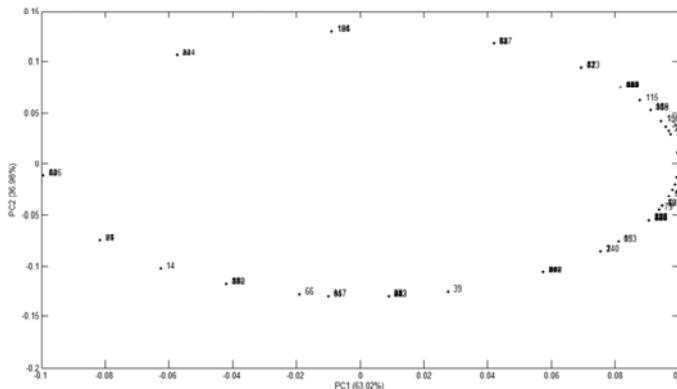
Na avaliação global dos tratamentos (figura 18), observa-se que apenas o tratamento TP apresentou leve rejeição; os demais foram muito bem aceitos. Portanto, esses resultados são consentâneos com as notas atribuídas aos diferentes atributos sensoriais (tabela 5).

Na figura 19, a seguir, o mapa de preferência interno para os tratamentos de sorvete de morango *diet*.

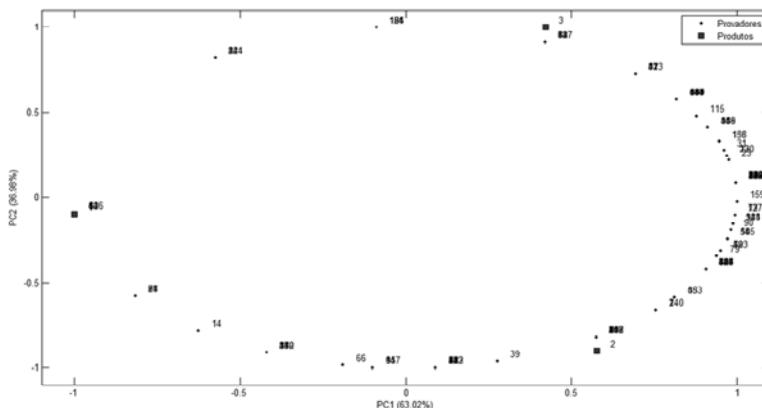
Figura 19 - Mapa de Preferência Interno para os tratamentos de sorvete de morango *diet* onde os tratamentos TP, T02 e TD representam as 3 formulações de sorvete de morango *diet* avaliados e os números de cada provador com sua respectiva opinião a respeito dos produtos.



A – Dispersão das amostras de sorvete *diet* em relação à aceitação pelos consumidores.



B-Correlação entre os dados de aceitação de cada um dos 164 consumidores e os dois primeiros componentes principais.



O mapa de preferência interno identifica a principal variação extraíndo as duas primeiras dimensões da preferência (MININ, 2006). No presente estudo, a soma dos dois componentes principais foi capaz de explicar 100 % da variação contida nos dados: o primeiro componente PC1 explicou 63,02 %, e o segundo PC2 explicou 36,98 %. Os provedores se segmentaram mais nos dois primeiros quadrantes, deixando claro o direcionamento da preferência para os tratamentos T02, TD e TP.

Observa-se que o tratamento TD está no primeiro quadrante, correlacionando-se positivamente com os dois componentes; o tratamento TP está no terceiro quadrante, correlacionando-se negativamente com os dois componentes; e o tratamento T02 está no segundo quadrante, guardando correlação positiva com o primeiro componente principal e negativa com o segundo.

3.4 CONCLUSÃO

A análise dos resultados da superfície de resposta foi suficiente para estabelecer a combinação de variáveis independentes que apresentaram as melhores variáveis respostas, com base na análise do perfil de desejabilidade, que sugeriu as condições operacionais ótimas de maior temperatura no preparo da calda, maior concentração de transglutaminase e uma concentração maior de lactase.

As formulações desenvolvidas apresentaram diferenças significativas entre si em todos os parâmetros analisados: *overrun*, textura, taxa de derretimento e colorimetria.

Todas as formulações ficaram dentro dos padrões microbiológicos estabelecidos pela legislação.

A formulação desenvolvida (TD) foi considerada ideal com base nas informações obtidas pela superfícies de resposta e determinada pela análise do perfil de desejabilidade. No entanto, ao ser submetida a avaliação sensorial humana, apresentou valores de aceitabilidade abaixo do esperado, mormente nos atributos cor, doçura, sabor, textura e aroma.

Do exposto, conclui-se que a utilização das concentrações (de 2 U g⁻¹ proteína) da enzima transglutaminase e das concentrações (de 0,4g/L) da enzima lactase promoveu efeito sinérgico da ação dessas enzimas, resultando na melhoria significativa da qualidade e da aceitabilidade do sorvete (T02). Esse tratamento (T02) apresentou aumento da consistência, do *overrun*, da textura e recebeu na avaliação sensorial global o maior coeficiente de concordância e maior índice de aceitação pelos provadores.

3.5 AGRADECIMENTOS

Pelo apoio financeiro, agradecemos às indústrias Frimesa; Alibra - Sooro; Kerry do Brasil; Candon Aditivos para Alimentos Ltda e Gemacon.

Pelo apoio para realizar este trabalho, agradecemos à Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Medianeira – PR (UTFPR) e da Universidade Federal de Santa Catarina – SC (UFSC).

REFERÊNCIAS

- ABOUMAHMOUD, R.; SAVELLO, P. Crosslinking of whey protein by transglutaminase. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 256-263, 1990.
- AIME, D. B.; ARNTFIELD, S. D.; MALCOLMSON, L. J.; RYLAND, D. Textural analysis of fat reduced vanilla ice cream products. **Food Research International**, v. 34, n. 2-3, p. 237-246, 2001.
- AJINOMOTO. **Propriedades Básicas da Transglutaminase**. Catálogo, 2008.
- AKHTAR, M.; BLAKEMORE, I.; CLAYTON, G.; KNAPPER, S.; The use of spinning disc reactor for processing ice cream base – effect of ageing in making model ice cream. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, n. 6, p.1139-1145, 2009.
- ALVAREZ, V. B.; WOLTERS, C. L.; VODOVOTZ, Y.; JI, T. Physical properties of ice cream containing milk protein concentrates. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, n. 3, p. 862-871, 2005.
- ANDRADE, V. T.; BRANDÃO, S. C. C.; ALVIM, T. C. Sorvete de doce de leite delactosado. In: XXI CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 2004, Juiz de Fora. **Anais. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 126-30, 2004.
- ANDRADE, A. C. **Estudo da fermentação simultânea á hidrólise, de soro de queijo, utilizando lactase e *Saccharomyces cerevisiae***. 2005, 97f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, 2005.
- BOLLIGER, S.; GOFF, H. D.; THARP, B. W. Correlation between colloidal properties of ice cream mix and ice cream. **International Dairy Journal**, v.10, p.303-309, 2000.
- BONISCH, M. P; LAUBER, S; KULOZIK, U. Improvement of enzymatic cross-linking of casein micelles with transglutaminase by glutathione addition. **International Dairy Journal**, v.17, p. 3-11, 2007.
- BRASIL. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n. 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos

para alimentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, 10 de jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 22. Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 abr. 2003a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 de dezembro, 2006.

CAMPOS T. C. A. S.; D'ALMEIDA W. K.; ARAGON-ALEGRO, L. C.; ROIG, S. M.; SUGUIMOTO H. H. Utilização da β -Galactosidase na hidrólise da lactose do leite em baixa, **Revista Ciência Biológicas da Saúde**, v.11, n. 4, p. 51-54, 2009.

CARMINATTI, C. A. **Ensaio de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando beta-galactosidase *Kluyveromyces lactis***. 79p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC. 2001.

COSTA, F. F.; RESENDE, J. V.; ABREU, L. R.; GOFF, H. D. Effect of calcium chloride addition on ice cream structure and quality. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 6, p. 2165-2174, 2008.

CLARKE, C. **The science of ice cream**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 187p, 2005.

CHANG, Y.; HARTEL, R. W. Measurement of air cell distributions in dairy foams. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 63-472, 2002.

CRUZ, A. G.; ANTUNES, A. E. C.; SOUSA, A. L. O. P.; FARIA, J. A. R.; SAAD, S. M. I. Ice cream as a probiotic food carrier. **Food Research International**, v. 42, n. 9, p. 1233-1239, 2009.

DAMODARAN, S. Inhibition of ice crystal growth in ice cream mix by gelatin hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 26, p.10918-10923, 2007.

DE JONG, G. A. H.; KOPPERMAN, S. J. Transglutaminase catalyzed reactions: impact on food applications. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 8, p. 2798-2806, 2002.

DICKINSON, E.; STAINSBY, G. **Colloids in foods**. London: Applied Science Publ., 383p. 1982.

DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos e bebidas**. 2. Ed. Curitiba: Champagnat, 239 p., 2007.

EISSA, A. S.; BISRAM, S.; KHAN, S. A. Polymerization and gelation of whey protein isolates at low pH using transglutaminase enzyme. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 52, p. 4456-4464, 2004.

EL-NAGAR, G.; CLOWES, G.; TUDORICA, C. M.; KURI, V.; BRENNAN, C. S. Rheological quality and stability of yog-ice cream with added inulin. **International Journal of Dairy Technology**, v. 55, n. 2, p-89-93, 2002.

EL-SHAREF, NAGAT.; GHENGHESH, K. S.; ABOGNAH, Y. S.; GNAN, S. O.; RAHOUMA, A. Bacteriological quality of ice cream in Tripoli-Libya. **Food Control**, v. 17. n. 08, p. 637-641, 2006.

EXTRALAB BRASIL – **Manual de instrumentação científica**, São Paulo, 2010.

FAERGEMAND, M., MURRAY, B. S., DICKINSON, E.; QVIST, Q. B. Cross-linking of adsorbed casein films with transglutaminase. **International Dairy Journal**, 9(3e6), 343e346. 1999.

GILLES; GREENLEY; SUTCLIFFE, L.H. ESR/spin probe study of ice cream. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n.14, p.4943-4947, 2006.

GIL-MUÑOZ, R.; GÓMEZ-PLAZA, E.; MARTÍNEZ, A.; LÓPEZ-ROCA, J. M. Evolution of the CIELAB and other spectrophotometric parameters during wine fermentation. Influence of some pre and postfermentative factors. **Food Research International**, v.30, n. 9, p. 699-705, 1997.

GOFF, H. D. Colloidal aspects of ice cream. **Journal Dairy Science**, v.7, p. 363- 373, 1997.

GOFF, H.D.; VERESPEJ, E.; SMITH, A.K. A study of fat and air structures in ice cream. **International Dairy Journal**, v.9, p. 817-829, 1999.

GOFF, H. D. **Structure of ice cream**: Dairy Science and Technology website. Disponível em: <<http://www.foodsci.uoguelph.ca/dairyedu/icstructure.html>> . Acesso em: 12 out. 2005.

GOFF, H. D. University of Guelph. Dairy Science and Technology. <http://www.foodsci.uoguelph.ca/dairyedu/home.html>. 10/05/2006.

GOFF, H. D. Solving color measurement challenges of the Food Industry. *Hunter Lab*, Reston, VA, 2007.

GRANGER, C.; LEGER, A.; BAREY, P.; LANGENDORFF, V.; CANSELL, M. Influence of formulation on the structural networks in ice cream. **International Dairy Journal**, Barking, v. 15, n. 3, p. 255-262, 2005.

HARTEL, R. W.; MUSE, M.; SOFJAN, R. Effects of structural attributes on hardness and melting rate of ice cream. In: ICE CREAM SYMPOSIUM, 2, 2003. Thessliniki. **Proceedings...** Thessoliniki: IDF, 2003.

HWANG, J. Y.; SHYU, Y. S.; HSU, C. K. Grape wine lees improves the rheological and adds antioxidant properties to ice cream, **Food Science and Technology**, v. 42, p. 312-318, 2009.

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

JAROS, D.; JACOB, M.; OTTO, C.; ROHM, H. Excessive cross-linking of caseins by microbial transglutaminase and its impact on physical properties of acidified milk gels. **International Dairy Journal**, v. 20, 321-327. 2010.

KAYA, S.; TEKIN, A. R. The effect of salep content on the rheological characteristics of a typical ice cream mix. **Journal of Food Engineering**, London, v. 47, n.1, p.59-62, Jan. 2001.

KONICA MINOLTA. 2003. Comunicación precisa de los colores. Konica Minolta Sensing, Inc. <http://www2.konicaminolta.eu/eu/Measuring/pcc/es/part4/04.html> [15 noviembre 2011].

KOXHOLT, M. M. R; EISENMANN, B; HINRICHS, J. Effect of fat globule sizes on the meltdown of ice cream. **J. Dairy Science**.v. 84, p.31-37, 2001.

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

KURAIISHI, C; SAKAMOTO, J; SOEDA, T. The usefulness of transglutaminase for food processing. In *Biotechnology for Improved Foods and Flavors* (G.R. Takeoka, R. Teranishi, P.J. Williams and A. Kobayashi, eds.) pp. 29–38, ACS Symposium Series 637, **American Chemical Society**, Columbus, OH, 1996.

KUS, S., ALTAN, A.; KAYA, A. Rheological behavior and time-dependent characterization of ice cream mix with different salep content. **Journal of Texture Studies**, v.36, n.3, p. 273-288, 2005.

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

LEANDRO, E. S.; PAULA, R. A; CARVALHO, A. F.; BRANDÃO, S. C.; MORAES, C. A. Sobrevivência de *Lactobacillus delbrueckii* UVF H2b20 em sorvete. **Instituto Cândido Tostes**, v. 64, n. 1, p. 300-303, 2006.

LEE, F.Y.; WHITE, C. H. Effect of ultrafiltration retentates and whey protein concentrates on ice cream quality during storage. **Journal Dairy Science**., v.74, n.4, p.1171-1180, 1991.

LI, P.; CHEN, H. Transglutaminase catalyzed crosslinking on functional properties of whey protein-based edible films. **In:** 1999 IFT Annual Meeting, Chicago (USA). IFT Annual Meeting Abstracts, n. 79, A-6, 1999.

LONGO, G. **Influência da adição de lactase na produção de iogurtes**, 2006. 89f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

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

MACEDO, J. A. **Produção, purificação, caracterização e aplicação de transglutaminase de *Streptomyces* sp.** CBMAI 837. 2009, 171f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, SP, 2009.

MARSHALL, R. T.; ARBUCKLE, W. S. **Ice cream**, Hapman & Hall, 1996.

METWALLY, A. M. M. E. Effect of enzymatic cross-linking of milk proteins on properties of ice cream with different composition. **International Journal of Food Science and Technology**, v.42, p. 939-947, 2007.

MINIM, V. P. R. **Análise Sensorial: Estudos com consumidores**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 225p. 2006.

MYERS, R. H. **Response surface methodology**, U.S.A., Library of Congress, 1976.

MUSE, M. R.; HARTEL, R. W. Ice cream structural elements that affect melting rate and hardness. **Journal of Dairy Science**. Champaing, v. 87, n.1, p.1-10, 2004.

NAZARUDDIN, R.; SYALIZA, A. S.; ROSNANI, A. I. W. The effect of vegetable fat on the physicochemical characteristics of dates ice cream. **International Journal of Dairy Technonology**, v.61, n. 3, p. 265-269, 2008.

NIEUWENHUIZEN, W. F.; DEKKER, H. L.; DE KONING, L. J.; GRONEVELD.; DE KOSTER, C. G.; DE JONG, G. A. H. Modification of glutamine and lysine residues in holo and apo α -lactalbumin with microbial transglutaminase. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, n. 24, p. 7132-7139, 2003.

NUNES, C. A.; PINHEIRO, A. C. M.; BASTOS, S. C. Evaluating consumer acceptance tests by three-way internal preference mapping obtained by parallel factor analysis. **Journal of Sensory Studies**, v.26, n. 2, p.167-174, 2011.

NUNES, C. A.; BASTOS S. C.; PINHEIRO, A. C. M.; PIMENTA, C. J.; PIMENTA, M. E. S. G. Relating consumer acceptance to descriptive attributes by three-way external preference mapping obtained by parallel factor analysis - PARAFAC. **Journal of Sensory Studies**, Malden, v.27, n.4, p.209-216, 2012.

O'CONNEL, J. E.; KRUIF, C. G. β -Casein micelles: cross-linking with transglutaminase. **Colloids and Surfaces A - Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 216, p. 75-81, 2003.

OLIVEIRA, C. C. M. **Produção de β -galactosidase por levedura recombinante** - Desenvolvimento de um sistema de produção estável. 2005, 100f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade do Minho, Braga, 2005.

OLSON, D.; WHITE, C.; WATSON, C. Properties of frozen dairy desserts processed by microfluidization of their mixes. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 1157-1162, 2003.

PINTERITS, A.; ARNTFIELD, S. D. Improvement of canola protein gelation properties through enzymatic modification with transglutaminase. **LWT - Food Science and Technology**, v.41, n.1, p. 128-138, 2008.

RODRIGUEZ-NOGALES, J. M. Enhancement of transglutaminase-induced protein cross-linking by preheat treatment of cows' milk: a statistical approach. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 1, p. 26-32, 2006.

SAKAMOTO, H.; KUMASAWA, Y.; MOTOKI, M. Strength of protein gels prepared with microbial transglutaminase as related to reaction conditions. **Journal of Food Science**, v. 59, n. 4, 866-871, 1994.

SAKAMOTO, H.; KUMASAWA, Y.; MOTOKI, M. Strength of protein gels prepared with microbial transglutaminase as related to reaction conditions. **Journal of Food Science**, v. 59, n. 4, 866-871, 1998.

SANTIAGO, P. A.; MARQUEZ, L. D. S.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 567-572, 2004.

SANTOS, GRAZIELLE G. **Características físicas, químicas e aceitabilidade de sorvete com mangaba e reduzido teor energético. Goiânia**, 2008. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás, 2008.

SILVA, K. **Sorvetes com diferentes produtos de soro de leite bovino: avaliações sensoriais, físico-químicas e ultra-estruturais**, 2004. 125f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade de Campinas. 2004.

SILVA, D. O.; CARDOSO, V. L. **Hidrólise da lactose do soro de queijo utilizando a enzima β galactosidase**. Disponível em: http://www.propp.ufu.br/revistaeletronica/edicao2004/exatas/hidrolies_d_a_lactose.p DF>. Acesso em: 26 fev. 2007.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: **WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7**, Reno-NV-USA: **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, 2009.

SILVA, F. A. S.; DUARTE, M. E. M.; CAVALCANTI, M. E. R. M. Nova metodologia para interpretação de dados de análise sensorial de alimentos. **Revista Engenharia Agrícola**. V.30, n.5, p.967-973, 2010.

SOFJAN, R. P.; HARTEL, R. W. Effects of *overrun* on structural and physical characteristics of ice cream. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 255-262, 2004.

SOUKOULIS, C.; CHANDRINOS, I.; TZIA, C. Study of the functionality of selected hydrocolloids and their blends with k-carrageenan on storage quality of vanilla ice cream. **LWT – Food Science and Technology**, v. 41, n. 10, p.1816-1827, 2008.

SOUKOULIS, C.; LEBESI, D.; TZIA, C. Enrichment of ice cream with *dietary fibre*: Effects on rheological properties, ice crystallisation and glass transition phenomena. **Food Chemistry**, v. 115, p. 665-671, 2009.

SCHORSCH, C.; CARRIE, H.; NORTON, I.T. Cross-linking casein micelles by a microbial transglutaminase: influence of cross-links in acid-induced gelation. **International Dairy Journal**, v. 10, p. 529-539, 2000b.

SHARMA, R.; LORENZEN, P; G.; QVIST, K, B. Influence of transglutaminase treatment of skim milk on the formation of ϵ -(γ -glutamyl)Lysine) and the susceptibility of individual proteins towards crosslinking, **International Dairy Journal**, v. 11, n. 10, p. 785-783, 2001.

THARP, B.W.; BOLLIGER, S.; GOFF, H. D. Correlation between colloidal properties of ice cream mix and ice cream, **International Dairy Journal**, v. 10, p. 303-309, 2000.

TREVISAN, A. P. **Influência de diferentes concentrações de enzimas lactase e temperaturas sobre a hidrólise da lactose em leite pasteurizado**. 2008. 60p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria – RS.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. Santa Maria: Ed. da UFSN, 192p, 2003.

TSENG, T. F.; LIU, D. C.; CHEN, M. T. Evaluation of transglutaminase on the quality of low salt chicken meat balls. **Meat Science**, v. 55, p. 427-431. 2000.

VASQUES, C. T. **Reologia do suco de goiaba**: efeito da diluição e do tamanho de partícula. Florianópolis, 2003. 66p. Dissertação - (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

WALSTRA, P.; JONKMAN, M. Emulsion and foam stabilization. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM HELD IN ATHENS, 1998. Brussels: **International Dairy Federation**, p. 60, 1998.

WHELAN, A. P.; VEGA, C.; KERRY, J. P.; GOFF, H. D. Physicochemical and sensory optimisation of a low glycemic index ice cream formulation. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, n.9, p.1520-1527, 2008.

YAM, K.; PAPADAKIS, S. A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces. **Journal of Food Engineering**, v. 61, n. 1, p.137-142. 2004.

YOKOYAMA, K.; NIO, N.; KIKUCHI, Y. Properties and applications of microbial transglutaminase. **Applications in Microbiological biotechnology**, v. 64, p. 447- 454, 2004.

ZADOW, J. G. Lactose – Properties and Uses. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n.11. p. 2654-2679, 1984.

CAPÍTULO 4

OTIMIZAÇÃO ENZIMÁTICA DA LACTASE E DA TRANSGLUTAMINASE E ANÁLISE DOS CRISTAIS FORMADOS NO SORVETE DE MORANGO *DIET*

RESUMO

O método de superfície de resposta (RSM) é um método empregado na otimização de processos industriais. O sorvete é considerado um sistema coloidal contendo cristais de gelo, bolhas de ar com gordura cristalizada e água, numa solução de açúcar altamente concentrada, contendo hidrocolóides, micelas de caseína e outras proteínas. A lactase (enzima β -galactosidase) (EC. 3.2.1.23) atua hidrolisando a lactose em seus monossacarídeos e a enzima transglutaminase (EC 2.3.2.13) atua como uma acil-transferase catalisando ligações entre resíduos de Glutamina e Lisina. O presente trabalho aplicou a metodologia de superfície de resposta na avaliação da atividade da enzima lactase e transglutaminase na obtenção da melhor formulação de sorvete com base na observação dos efeitos sobre cristais e sobre proteínas do soro de leite. Foram preparadas 18 formulações de sorvetes por processo descontínuo empregando diferentes concentrações das enzimas e temperaturas de incubação, segundo delineamento fatorial 3^4 , com quatro repetições. Para quantificar a ação enzimática sobre as proteínas procedeu-se a retirada de lipídeos dos sorvetes, em seguida foi efetuada a avaliação da expressão das proteínas presentes na amostra, e realizando a densidade das amostras. A hidrólise da lactose foi comprovada por extração etanólica dos açúcares por CLAE com detector de índice de refração. Na quantificação dos cristais dos sorvetes ($0,5 \text{ cm}^3$; $- 28 \text{ }^\circ\text{C}$) foram espalhadas em lâminas, adicionando-se um agente dispersor de cristais (álcool isoamílico) e após resfriamento em criostato (3 minutos; $- 28 \text{ }^\circ\text{C}$), as imagens dos cristais foram obtidas sob microscópio óptico de campo claro para a contagem e determinação do tamanho dos cristais empregando software ImageJ. As análises foram realizadas em triplicatas. Para a análise estatística empregou-se o método de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey com 5 % de probabilidade. A eletroforese evidenciou a formação de polímeros entre 60 kDa e 100 kDa para o tratamento 2 na amostra a temperatura de $40 \text{ }^\circ\text{C}$, revelando a presença de proteínas características do leite, como α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, caseínas e indicando formação de ligações cruzadas de resíduos de glutamina e lisina pela ação da enzima transglutaminase. As

análises cromatográficas de sorvete *diet* evidenciaram que a enzima lactase foi mais eficiente no tratamento a 40 °C. Nesta mesma temperatura foi observada uma menor formação de cristais, contribuindo para uma textura mais lisa. Pode-se concluir que a adição da enzima lactase e transglutaminase em sorvetes proporcionou um produto com melhor cremosidade, viscosidade e textura macia.

Palavras-chave: gelados comestíveis, tecnologia alimentar, CLAE, enzima, eletroforese, alimentos *dietéticos*

ENZYMATIC OPTIMIZATION OF LACTASE AND TRANSGLUTAMINASE AND ANALYSIS OF CRYSTALS FORMED IN DIET STRAWBERRY ICE CREAM

ABSTRACT

The surface response method (SRM) is employed in the optimization of industrial processes. Ice cream is considered to be a colloidal system containing ice crystals and air bubbles with crystallized fat and water, in a highly concentrated sugar solution containing hydrocolloids, casein micelles and other proteins. Lactase (β -galactosidase enzyme) (EC 3.2.1.23) hydrolyses lactose into its monosaccharides and the enzyme transglutaminase (EC 2.3.2.13) acts as an acyl-transferase catalyzing the bonding between glutamine and lysine residues. In this study, RSM was applied to the evaluation of the enzymatic activity of lactase and transglutaminase aimed at obtaining a better ice cream formulation based on observation of the effects on the crystals and on the milk whey proteins. A total of 18 formulations were prepared by a discontinuous process employing different enzyme concentrations and incubation temperatures, according to a 3^4 factorial design, with four repetitions. To quantify the enzymatic action on the proteins, the lipids were removed from the ice cream sample and the protein expression and density of the sample were evaluated. The lactose hydrolysis was verified through the ethanol extraction of sugars by HPLC with a refractive index detector. To quantify the crystals present in the ice cream (0.5 cm^3 ; $-28 \text{ }^\circ\text{C}$) the samples were spread on slides and a crystal dispersion agent (isoamyl alcohol) was added followed by cooling in a cryostat (3 min; $-28 \text{ }^\circ\text{C}$). Images of the crystals were obtained under a light field optical microscope in order to count them and determine their size employing the software ImageJ. The analysis was carried out in triplicate. For the statistical analysis the method analysis of variance (ANOVA) was employed, followed by the Tukey test with 5 % probability. The electrophoresis showed the formation of polymers of between 60 kDa and 100 kDa in the sample for treatment 2 at a temperature of $40 \text{ }^\circ\text{C}$, revealing the presence of proteins characteristic of milk, such as α -lactalbumin, β -lactoglobulin and caseins and indicating the formation of cross-links of glutamine and lysine residues through the action of the enzyme transglutaminase. The chromatographic analysis of the diet ice cream indicated that the enzyme lactase was the most efficient in the

treatment at 40 °C. At the same temperature a lower number of crystals were formed, contributing to a smoother texture. It can be concluded that with the addition of the enzymes lactase and transglutaminase to the ice cream formulations improvements in the creamosity, viscosity and soft texture of the product were obtained.

Keywords: edible ices, food technology, HPLC, enzyme, electrophoresis, dietetic foods.

4.1 INTRODUÇÃO

A metodologia de superfície de resposta (MSR) é um método matemático e estatístico efetivamente utilizado para desenvolver, melhorar e otimizar processos em que se busca a formulação de novos produtos. Sendo de otimização mais popular usado nos últimos anos para o desenvolvimento de novos produtos e processos; melhoria de produtos ou processos existentes; otimização da qualidade e do desempenho de um produto; otimização de um processo de fabricação existente e minimização dos custos de produção. ABDULLAH; SALAMATNIA; KAMARUDDIN, 2009).

Neste trabalho empregou-se a MSR que é uma ferramenta muito útil para otimizar a produção de sorvete com qualidade rigorosamente controlada empregando como parâmetros as concentrações das enzimas (lactase e transglutaminase) em temperaturas crescentes, de maneira a definir a relação entre as respostas e as variáveis independentes (DRUZIAN et al, 2005; FARRIS; PIERGIOVANNI, 2009).

As enzimas são utilizadas em uma ampla variedade de aplicações na indústria de alimentos. A lactase (enzima β -galactosidase) (EC. 3.2.1.23) atua hidrolisando a lactose em seus monossacarídeos. A hidrólise da lactose é cada vez mais importante para o uso alimentar, pois modifica a solubilidade da lactose, o dulçor, o poder redutor e a fermentabilidade dos produtos lácteos, permitindo sobretudo, o aumento da digestibilidade destes alimentos por consumidores intolerantes a lactose (SILVA, CARDOSO, 2007).

A incorporação da enzima lactase é um processo promissor, porque possibilita o desenvolvimento de novos produtos sem lactose em sua composição, previne a cristalização da lactose na produção de sorvetes, de produtos fermentados como iogurte, leite condensado e doce de leite (CARMINATTI, 2001; SANTIAGO et. al., 2004; OLIVEIRA, 2005). Desta forma a hidrólise enzimática da lactose promove modificações físicas e químicas dos produtos, melhorando as características tecnológicas e sensoriais de produtos lácteos melhorando a viscosidade, o corpo, a textura e o paladar de sorvetes (VINHAL, 2001; ANDRADE, 2005).

A enzima transglutaminase (EC 2.3.2.13) é uma transferase que catalisa a reação de transferência de grupos acil entre resíduos de aminoácidos da proteína. Ela forma ligações covalentes, crosslinks, entre os resíduos de aminoácidos Glutamina e Lisina (ligações G-L), e reage muito bem com a caseína do leite que têm uma conformação

aberta, enquanto que as proteínas do soro que apresentam conformação globular, a transglutaminase reage apenas em condições que favorecem o desdobraimento da estrutura globular das proteínas, facilitando a ação enzimática (MATSUMURA et al., 2000; LORENZEN et al., 1998). Adicionalmente, a aplicação da transglutaminase na fabricação de produtos lácteos permite a produção de sorvetes de baixas calorias, sem açúcar, mais suave e de mais fácil manipulação na colher (MOTOKI; SEGURO, 1998; KURAISHI et al., 2001).

A ação das enzimas lactase e enzima transglutaminase, isoladamente ou em conjunto, pode ser visualizada através de eletroforese em gel de poliacrilamida, este é um método de análise simples, rápido e altamente sensível, constituído por um sistema descontínuo formado por um gel de empacotamento (4 %) e um gel de separação (12 %) (PATEL, 1994; SHI; JACKOWSKI, 1998; ALOMIRAH; ALLI, 2004).

Para avaliar a polimerização das proteínas do soro de leite por transglutaminase, a identificação das proteínas β -lactoglobulina e α -lactoalbumina, de concentrado protéico de soro e proteínas isoladas de soro de leite geralmente são realizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida, sendo este o método de análise em que as proteínas são fracionadas estritamente pelo peso molecular (SHI; JACKOWSKI, 1998).

O gel de poliacrilamida é utilizado para analisar tamanho, quantidade, pureza e o ponto isoelétrico de polipeptídeos e proteínas. Como as proteínas do soro possuem baixo peso molecular e os polímeros formados possuem alto peso molecular, o padrão de peso molecular utilizado deve apresentar ampla faixa de variação (EISSA, BISRAM; KHAN, 2004).

Para efetuar a quantificação da hidrólise da lactose, um dos métodos de análises de alimentos mais indicados é a cromatografia líquida de alta eficiência, em função de ser uma metodologia simples no manuseio das amostras, práticos, precisos, possuem grande habilidade de separação e rapidez, e são mais facilmente interpretados, pois cada açúcar origina somente um pico e a análise é realizada a temperatura ambiente (IVERSON et al., 1981; BARTOLOZZI et al., 1997; NOJIRI et al., 1999; ADAMS et al., 1999; LI et al., 2001).

Para as amostras de sorvete é necessário utilizar a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção do índice de refração (CLAE-RI), por ser a melhor técnica para a quantificação de carboidratos em alimentos (CHÁVEZ-SERVÍN et al, 2004).

A quantificação de cristais é necessária para determinar se o sorvete, apresenta a distribuição e o tamanho de cristais nas quantidades adequadas, que resulte numa textura lisa e refinada, além de proporcionar uma sensação de frescor percebida pelo consumidor, sendo assim, utiliza-se a técnica de microscopia, por ser de fundamental relevância para a realização de análises qualitativa e quantitativa em amostras de sorvetes, pois permite visualizar e analisar o tamanho, a quantidade e a distribuição dos cristais e de demais partículas do sorvete (GOFF et al., 1989; HARTEL, 1996; BERGER, 1997; GOFF, 2003).

O sorvete um dos derivados lácteos mais apreciados pela população em geral (ALVAREZ et al., 2005), é considerado um sistema coloidal (sistema de partículas de 1nm a 1 µm de tamanho), constituído de cristais, bolhas de ar com gordura cristalizada e água, numa solução de açúcar altamente concentrada, contendo hidrocolóides, micelas de caseína e outras proteínas (CASTRO FRANCO, 2002; MESICH, 2006).

Por fim, deve ser ressaltado que a composição química do sorvete determina vários parâmetros estruturais e sensoriais importantes. Portanto, com a adição das enzimas lactase e enzima transglutaminase, buscou-se obter um produto inovador, com valor agregado e com propriedades funcionais desejáveis, como firmeza, maciez, alto *overrun* e resistência ao derretimento (GRANGER et al., 2005).

O objetivo deste trabalho foi aplicar a metodologia de superfície de resposta na avaliação da atividade da enzima lactase e transglutaminase sobre as proteínas do leite e distribuição do tamanho do cristal buscando a melhor formulação de sorvete de morango *diet*.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1. Material

Os sorvetes foram elaborados no laboratório de Laticínios da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus de Medianeira. A produção dos sorvetes *diet* de morango foi realizada por processo descontínuo (BRASIL, 2003a).

4.2.2 Matérias-primas

Os ingredientes utilizados na formulação base de cada amostra de sorvete foram utilizados 2 litros leite pasteurizado, leite em pó integral e creme de leite pasteurizado da Frimesa®, concentrado protéico de soro (CPSs)® (Sooro, Brasil), estabilizante super liga

neutra® (Duas Rodas, Brasil), emulsificante Emustab® (Duas Rodas, Brasil), edulcorantes: sucralose/acessulfame-k, sabor morango algemix® (Duas Rodas, Brasil), corante carmin de colchonilha® (Gemacom, Brasil), aroma de morango® (Givaudan, Brasil), enzima Prozin lactase® (Candon Aditivos, Brasil) e enzima transglutaminase YG - Activia® (Ajinomoto, Brasil). O leite utilizado na fabricação das formulações de sorvete foi padronizado a 8 % de gordura com creme de leite pasteurizado e adicionadas de CPSs (concentrado proteico de soro) a 10 %.

4.2.3 Delineamento Experimental e Análise Estatística

Foram preparadas formulações de sorvetes com diferentes concentrações de enzima lactase, transglutaminase e temperatura de incubação, segundo planejamento composto central composto 2^k ($k = 3$ fatores, 5 níveis) com quatro repetições do ponto central para a estimativa do erro experimental, levando a 18 experimentos, realizados em ordem aleatória e em triplicado (total de 54 experimentos) (tabela 1).

As variáveis avaliadas no planejamento experimental para determinar as melhores condições para o ensaio foram: concentração de transglutaminase, concentração lactase, e temperatura. Para avaliar os efeitos e as interações destas três variáveis, a metodologia de superfície de resposta foi utilizada por um planejamento composto central (CCD).

As variáveis independentes foram estudadas em 5 níveis diferentes: concentração da enzima lactase (A) (0,3 %, 0,4 %, 0,6 %, 0,8 % e 0,9 %), concentração da enzima transglutaminase (B) (0,6 %, 2 %, 4 %, 6 % e 7,4 %) e a temperatura de incubação (C) (13 °C, 20 °C, 30 °C, 40 °C, 47 °C), e seus níveis serão codificados (-1, 0, +1, +1,68, -1,68).

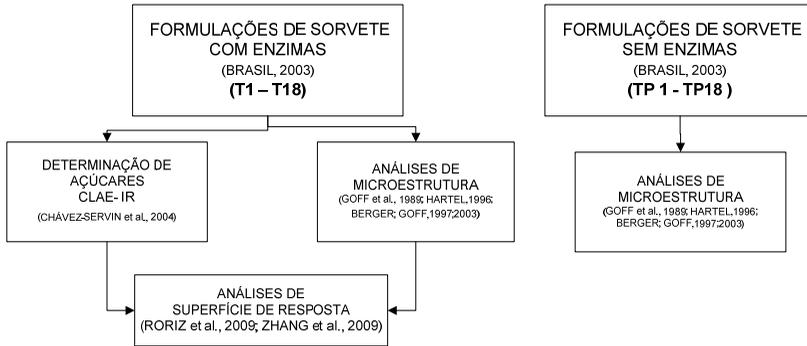
Tabela 1 - Delineamento experimental para a elaboração dos sorvetes.

Tratamentos	Variáveis independentes			Níveis originais		
	Níveis codificados			Níveis originais		
	(A)	(B)	(C)	(A)	(B)	(C)
T1	-1,0000	-1,0000	-1,0000	0,4	2	20
T2	-1,0000	-1,0000	1,0000	0,4	2	40
T3	-1,0000	1,0000	-1,0000	0,4	6	20
T4	-1,0000	1,0000	1,0000	0,4	6	40
T5	1,0000	-1,0000	-1,0000	0,8	2	20
T6	1,0000	-1,0000	1,0000	0,8	2	40
T7	1,0000	1,0000	-1,0000	0,8	6	20
T8	1,0000	1,0000	1,0000	0,8	6	40
T9	-1,6818	0,0000	0,0000	0,3	4	30
T10	1,6818	0,0000	0,0000	0,9	4	30
T11	0,0000	-1,6818	0,0000	0,6	0,6	30
T12	0,0000	1,6818	0,0000	0,6	7,4	30
T13	0,0000	0,0000	-1,6818	0,6	4	13
T14	0,0000	0,0000	1,6818	0,6	4	47
T15	0,0000	0,0000	0,0000	0,6	4	30
T16	0,0000	0,0000	0,0000	0,6	4	30
T17	0,0000	0,0000	0,0000	0,6	4	30
T18	0,0000	0,0000	0,0000	0,6	4	30
Níveis Codificados e seus correspondentes				Níveis Originais		
Fatores		-1,68	-1	0	1	1,68
A) Lactase (G/L)		0,3	0,4	0,6	0,8	0,9
(B) Transglutaminase (U g1proteína)		0,6	2	4	6	7,4
(C) Temperatura (°C)		13	20	30	40	47

Foram realizados testes de análise de variância (ANOVA) e de multicomparação, pós teste Tukey-Kramer ao nível de significância ($p < 0,05$), para os tratamentos.

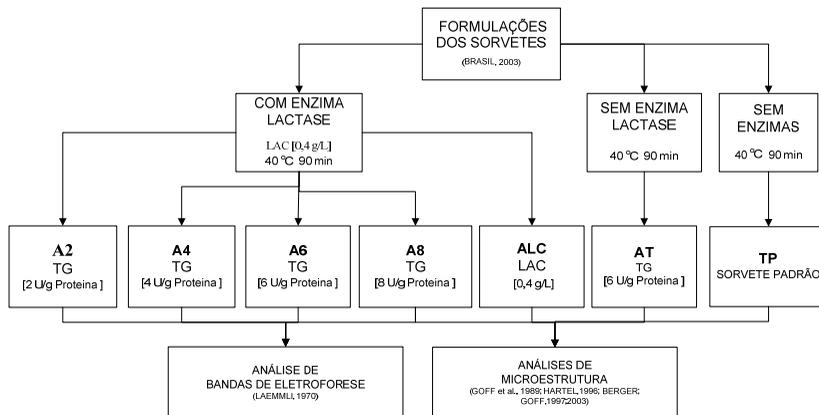
As análises de microscopia e análises da hidrólise da lactose por cromatografia líquida de alta eficiência foram realizadas para os tratamentos T1 a T18 e para os tratamentos padrões (sem adição de enzima) foram realizadas análises de microscopia (figura 1) em triplicatas.

Figura 1 - Fluxograma das análises das formulações de sorvete de morango *diet* com adição das enzimas lactase e transglutaminase (T1 - T18) e sem adição de enzimas (TP1- TP18).



As amostras de sorvete de morango *diet* que apresentaram melhor palatabilidade e cremosidade na temperatura de 40 °C que são os aspectos mais relevantes em termos de aceitabilidade sensorial (DUTCOSKY, 2007; MINIM, 2010) foram submetidas a análise de eletroforese e microscopia (figura 2). Os tratamentos foram denominados TA2, TA4, TA6, TA8 TALC, TAT e TP, e utilizaram-se concentrações iguais da enzima lactase, concentrações diferentes da enzima transglutaminase e sem adição das enzimas conforme tabela 2 e etapas de fabricação para todas as formulações estão especificadas na figura 3.

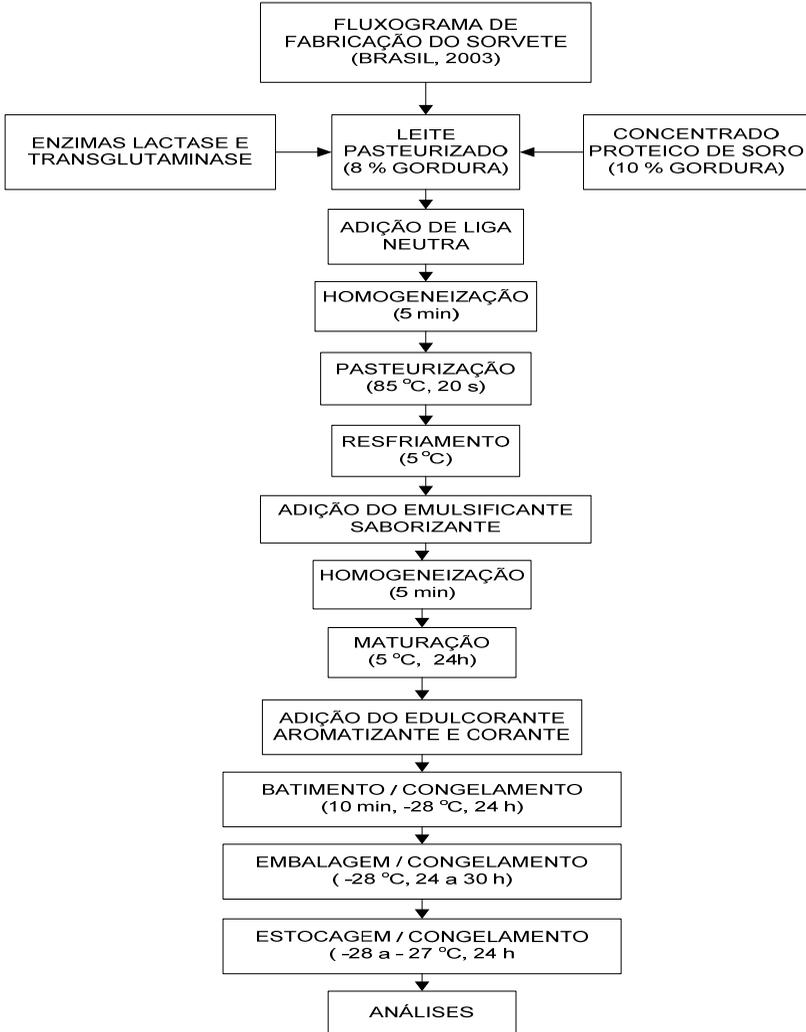
Figura 2 - Fluxograma das análises das formulações de sorvete de morango *diet* com adição da enzima lactase e transglutaminase (TA2, TA4, TA6, TA8), e com adição da enzima lactase (TALC), com adição da enzima transglutaminase (TAT) e sem adição de enzimas (TP).



4.2.4 Elaboração dos sorvetes

As caldas dos sorvetes nos diferentes tratamentos foram inicialmente aquecidas 85 °C por 20 segundos para causar a desnaturação das proteínas do soro e facilitar a sua interação com as micelas de caseína aumentando a susceptibilidade das proteínas à reação com a transglutaminase (SHARMA; LORENZEN; QVIST, 2001). Este aumento progressivo da temperatura desorganiza o sistema proteína-água quebrando as ligações de hidrogênio que estabilizam a estrutura proteica, causando o desdobramento e promovendo a interação proteína-proteína, desta forma permite a aproximação das proteínas ao sítio ativo da transglutaminase, levando à subsequente formação dos polímeros (NIEUWENHUIZEN et al., 2003). A seguir as caldas foram resfriadas na temperatura de incubação conforme o delineamento (tabela 1) e posteriormente adicionou-se as enzimas lactase e transglutaminase, sendo incubadas por 90 minutos nas temperaturas determinadas no delineamento. Para tanto foi utilizada uma B.O.D. (modelo NT705), após a incubação, as amostras foram inativadas conforme método de Rodriguez-Nogales (2006), com adaptações. Para todos os tratamentos foram realizadas amostras padrões sem adição da enzima nas mesmas temperaturas, a seguir iniciou-se a fabricação dos sorvetes conforme o fluxograma apresentado na figura 3.

Figura 3 - Fluxograma de fabricação de sorvete de morango *diet* com adição de concentrado protéico de soro, sucralose/acessulfame-k e enzima lactase e enzima transglutaminase.



4.2.5 Análises de eletroforese

A avaliação da polimerização das proteínas do sorvete pela ação da enzima transglutaminase foi avaliada por eletroforese segundo LAEMMLI (1970), com adaptações. Para a avaliação da presença das proteínas procedeu-se primeiramente a retirada de lipídeos dos sorvetes, através da centrifugação das amostras 8000 rpm por 5 minutos, retirando-se com auxílio de uma pipeta Pasteur a amostra líquida formada abaixo da camada de gordura, que foi utilizada para quantificar o teor de proteína das amostras conforme metodologia descrita por BRADFORD (1976), e 50 µg/mL foram aplicadas em gel de acrilamida (12 %), utilizando padrão de peso molecular (8 a 220 kDa). As análises foram realizadas no Laboratório de Bioquímica Experimental (Labioex) da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC.

Os tratamentos do sorvete de morango *diet* selecionadas para a análise de eletroforese estão descritas na tabela 2, a seguir.

Tabela 2 - Relação dos tratamentos de sorvete de morango *diet* selecionados do delineamento experimental com concentrações iguais da enzima lactase, diferentes concentrações da enzima transglutaminase, e sem adição das enzimas para a análise de eletroforese a temperatura de 40 °C.

Tratamento	Enzima lactase (g/L)	Enzima transglutaminase (U g ⁻¹ proteína)	Temperatura (°C)	Tempo de incubação (Minutos)
TA2	0,4	2	40	90
TA4	0,4	4	40	90
TA6	0,4	6	40	90
TA8	0,4	8	40	90
TAT	-	6	40	90
TALC	0,4	-	40	90
TP (padrão)	-	-	40	90

(-) sem adição

4.2.6 Análises da hidrólise da lactose por cromatografia líquida de alta eficiência

Para averiguar a hidrólise da lactose pela enzima lactase nas amostras de sorvete, efetuou-se primeiramente a extração das amostras, segundo metodologia previamente descrita por Wathesed; Kramer, (1979). O resultado do grau de hidrólise da lactose foi confirmado por cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu Class-VP) com detector de índice de refração (modelo RID 6 A). A fase móvel foi constituída por acetonitrila: água (75:25, v/v) em vazão de 1,0 mL min⁻¹, na temperatura de 30 °C, tendo sido injetados 20 µL em coluna Shimadzu (CLC-NH2, 6,0 x 150 mm), segundo o método previamente descrito por Burgner; Feinhberg (1992), com adaptações. As análises foram realizadas no Laboratório DIA (Laboratório de Desenvolvimento de Instrumentação, Automação e Metodologia Analítica da Universidade Estadual de Londrina- PR). Foram realizadas análises dos tratamentos T1 a T18. Todas as análises foram realizadas em duplicatas.

4.2.7 Análises de microscopia

Para avaliar o tamanho dos cristais formados nas amostras de sorvete armazenadas a 28 ° - 30 °C foram coletadas (cubos de, aproximadamente, 0,3 cm³) e espalhadas em lâminas para microscopia, adicionando-se um agente dispersor de cristais (álcool isoamílico). Para melhor visualização das amostras foi utilizado (álcool isopropílico) sobre as lâminas cobertas com lamínulas, sendo a seguir resfriadas por 3 minutos a - 28 °C em criostato (Micrótomos Criostatos Leica modelo CM 1850 - Origem: Alemanha), segundo metodologia de Regand; Goff (2006) e Costa et al. (2008) com adaptações.

Todos os utensílios e reagentes utilizados na preparação das amostras foram pré-resfriados a - 28 °C. As imagens dos cristais foram obtidas utilizando Microscópio óptico Olympus modelo Bx41 (Origem: Japão) com câmera digital colorida com 3.3 mpixel da Q-imaging e programa de captura de imagens Q-capture Pro 5.1 da Q-imaging. Diferentes campos em cada lâmina foram fotomicrografados com magnitudes de 400X para obtenção das medidas dos cristais (300 cristais) por amostra.

A quantificação dos diâmetros dos cristais foi realizada por meio do software Imagej. Os valores de diâmetro dos cristais foram distribuídos em uma curva de frequência para se obter a mediana (X50), conforme modelo apresentado por Flores e Goff (1999). Todas as

análises das características micro estruturais dos sorvetes - tamanho dos cristais foram realizadas no Laboratório LAMEB-2 (Laboratório de Multiusuário) do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina – SC. Foram realizadas análises dos tratamentos (T1 a T18), Tratamentos Padrão (sem adição das enzimas) e dos tratamentos TA2, TA4, TA6, TA8 TALC, TAT e TP que foram submetidos a análise de eletroforese.

As análises estatísticas para comparação das variáveis numéricas entre os tratamentos foi realizada utilizando-se análise de variância ANOVA, adotando a análise por Kruskal-Wallis (não paramétrico) seguida pelo teste Dunn, ao nível de significância de 5%, através do auxílio do programa BioEstat 5,0. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

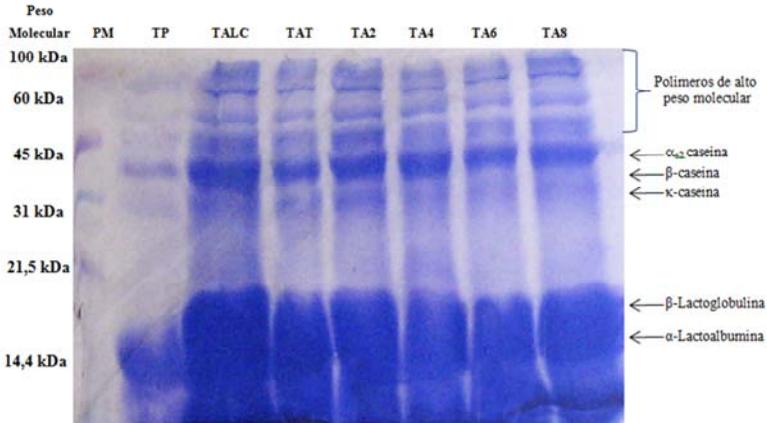
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.3.1 Análises de eletroforese

4.3.1.1 Análises de eletroforese dos tratamentos de sorvete de morango *diet* na temperatura de 40 °C

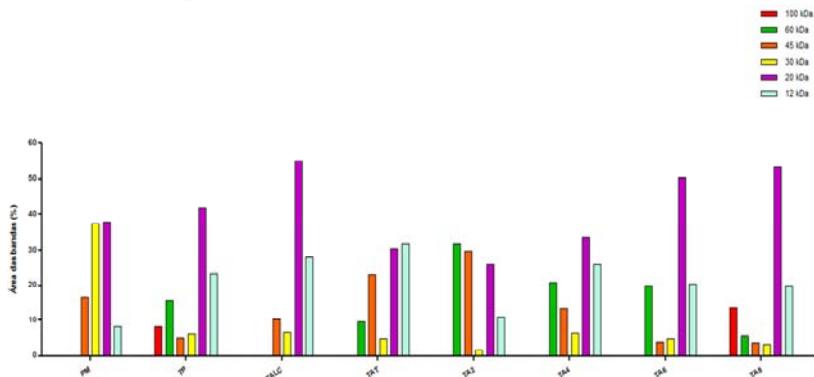
As análises de eletroforese em gel de poliacrilamida foram realizadas para confirmar o grau de polimerização das proteínas do sorvete de morango *diet* produzidas com adição da enzima lactase e enzima transglutaminase. Na figura 4 podemos observar a formação de bandas de polímeros de peso molecular elevado decorrentes da atuação da enzima transglutaminase e aglomerados de proteínas.

Figura 4 - Eletroforese dos tratamentos dos sorvetes de morango *diet* com concentrações iguais da enzima lactase, diferentes concentrações da enzima transglutaminase e sem adição das enzimas na temperatura de 40 °C.



As áreas das bandas (%) formadas dos tratamentos dos sorvetes de morango *diet* com concentrações iguais da enzima lactase, diferentes concentrações da enzima transglutaminase e sem adição das enzimas na temperatura de 40 °C são apresentados na figura 5.

Figura 5 - Gráfico das áreas das bandas (%) dos tratamentos dos sorvetes de morango *diet* com concentrações iguais da enzima lactase, diferentes concentrações da enzima transglutaminase e sem adição das enzimas na temperatura de 40 °C.



A adição da transglutaminase causou a aglomeração parcial das proteínas formando polímeros de maior peso molecular, que é evidenciado na primeira linha do gel de empilhamento entre 45 a 100 kDa, evidenciando a formação de polímeros de massa molecular elevada, aparentemente seria a lactoferrina (80 kDa), lactoperoxidase (78,4 kDa), albuminas do soro (66,176 kDa), imunoglobulina (53 kDa) e proteose-Peptonas (4 - 40 kDa) (figura 4). Faergemand et al. (1997), encontrou resultados semelhantes, quando realizou a incubação de concentrado proteico de soro à 10 % com 5 U/g de transglutaminase, obtendo bandas maiores associadas a formação de polímeros de elevado peso molecular.

Podemos observar a evidente formação de polímeros de 14,4 a 60 kDa induzida pela ação de enzima transglutaminase para todos os tratamentos, no tempo de incubação (90 minutos) e temperatura de exposição da enzima (40 °C), diferindo apenas as concentrações das enzimas, sendo a temperatura utilizada próxima à ótima das enzimas (figura 4).

Segundo Sakamoto; Kumazawa; Motoki (1998), o desempenho da enzima transglutaminase depende do tipo, da quantidade e da modificação sofrida pelo substrato, da concentração da enzima, do pH, da temperatura e do tempo de incubação. Faergemand et al. (1997) observaram, por eletroforese, que quanto maior a concentração da enzima e do substrato disponível, maior a formação de polímeros de alto peso molecular (> 100 kDa).

Na figura 4, observa-se que o tratamento TA2 apresentou formação de bandas de polímeros de 45 kDa (29,70 %) e 60 kDa (31,72 %) induzida pela ação da transglutaminase em relação ao tratamento TP (padrão sem enzima), indicando que pode ter ocorrido ligação cruzada da enzima transglutaminase com α -caseína e a β -caseína, e também com a κ -caseína. Observamos duas bandas de α -caseína e β -caseína para este tratamento, além de verificar a formação de bandas mais densas constituída por proteína de maior peso molecular em relação ao tratamento sem enzima.

A conjugação da caseína com outras proteínas pela ação da enzima transglutaminase resulta na formação de proteínas de elevado peso molecular que apresentam solubilidade dependente do pH do sorvete (YOKOYAMA; NIO; KIKUCHI, 2004) (Apêndice R).

Neste trabalho, obtivemos uma boa atuação das enzimas nas concentrações de 2 U g⁻¹ proteína da enzima transglutaminase combinadas com concentrações de 0,4 g/L de enzima lactase.

No tratamento TA2, ação da enzima transglutaminase ficou nítida, uma vez que as bandas formadas para a β -caseína apresentaram-se mais densas, evidenciando a que β -caseína tem a maior capacidade de formação de ligação cruzadas com a enzima transglutaminase. Por está razão podem ser formados aglomerados proteicos de alto peso molecular. Kuraishi et al. (2001); Kruif; Huppert; Hinz et al. (2002), em estudos realizados afirmaram que α -s caseína tem menor capacidade de realizar ligação cruzada com enzima transglutaminase do que a β -caseína.

A κ -caseína, é mais susceptível a polimerização pela enzima transglutaminase do que a α -caseína e β -caseína, podemos notar neste trabalho que a κ -caseína formou um aglomerado de bandas que se misturam às bandas da β -caseína, tornando-as mais densas (figura 4). Tolkach; Kulozik (2005), mencionaram em estudos realizados, que a alta disponibilidade de κ -caseína a ação da transglutaminase, porque ela possui quatro ativos resíduos de glutamina, dois dos quais estão presentes na região caseinomacropéptido hidrofílico (CMP), que são suscetíveis a ligação cruzada.

A transglutaminase forma ligações intramicelares entre as micelas de proteínas, devido ao fato da κ -caseína estar localizada na superfície da micela, está se torna o monómero mais acessível e reativo, seguido da β -caseína e α -caseína, pois apesar de posicionadas na camada mais interna da micelas as frações de caseínas apresentam estrutura terciária aberta que favorecem a interação com a enzima transglutaminase (CHRISTENSEN et al., 1996; FAERGEMAND;

QVIST, 1997; JAROS; JACOB; OTTO; ROHM, 2010), sendo estes estudos consistentes com os citados na literatura (SHARMA et al, 2001; HUPPERTZ; KRUIF; 2006 a, b).

Com relação as proteínas do soro (figura 4) não houve formação aglomerados de proteínas globulares (α -Lactoalbuminas e β -lactoglobulinas principalmente), demonstrando que estas proteínas foram menos eficientes na formação de ligações cruzadas com a enzima transglutaminase do que as caseínas. Estas proteínas possuem estrutura globular compacta mais estável e elevada presença de pontes dissulfeto, que dificultam a interação com a enzima transglutaminase. Para contornar este impedimento, efetuou-se o pré aquecimento do leite, de maneira provocar a desnaturação das proteínas do soro, ocorrendo o desnovelamento das proteínas globulares facilitando o ataque pela enzima transglutaminase, levando a polimerização destas proteínas, uma vez que, a ação da enzima transglutaminase é mais efetiva quando ocorre pelo pré- aquecimento do leite (BÖNISCH et al., 2007).

Faergemand, Otte e Qvist (1998), observaram que α -Lactoalbumina participou mais efetivamente na formação dos polímeros do que a β -Lactoglobulina. Isto ocorre porque α -Lactoalbumina apresenta resíduos de glutamina e lisina disponíveis para a reação cruzada com a transglutaminase, enquanto que na β -Lactoglobulina esses resíduos estão menos disponíveis à reação.

Nas formulações de sorvete as proteínas do leite fazem parte dos sólidos não gordurosos (SNGL), e contribuem com a coalescência parcial e formação da estrutura do sorvete. Adicionalmente, o teor de sólidos totais (proteínas) aumenta quando ocorre a hidrólise da lactose pela enzima lactase. Por sua vez, este processo requer mais água do meio, aumentando a viscosidade do mesmo e contribuindo para uma melhor polimerização das proteínas presentes na calda do sorvete pela enzima transglutaminase.

Estas proteínas permanecem adsorvidas na interface proteína-ar, aumentando a aeração e estabilidade da espuma (VEJA, GOFF, 2005). Este processo é favorecido pela ação da transglutaminase que aumenta a polimerização das proteínas do leite, proporcionando a formação de um filme protéico mais resistente, melhorando a características estruturais e funcionais dos sorvetes (PINTERITS; ARNTFIELD, 2008).

Estudos envolvendo sorvetes e transglutaminase são escassos. Metwally (2007) produziu sorvetes com baixo teor de gordura e diferentes concentrações de estabilizantes. Foi observado que as amostras contendo transglutaminase melhoraram as propriedades

funcionais do sorvete, aumentando a viscosidade aparente, e promovendo uma maior resistência ao derretimento.

Farnsworth, Hendricks e Guo (2006), relatam resultados semelhantes ao encontrados nesta pesquisa, eles afirmam que o pré-aquecimento do leite antes da incubação com enzima transglutaminase em diferentes concentrações (2 e 4U g⁻¹ proteína), aumentou significativamente a viscosidade e diminuiu a sinérese de produtos lácteos nas duas concentrações de enzimas. O efeito do tratamento com a transglutaminase no aumento da viscosidade, apresenta-se mais efetivo quando comparado a alguns métodos adotados para padronizar o teor de sólidos totais, isto pode ser confirmado pelo aumento das bandas de polimerização das proteínas encontrados no tratamento TA2 (figura 4). Considerando as bandas obtidas para o tratamento AT (contendo apenas a enzima transglutaminase), observa-se na figura 4 a predominância de formação bandas de polímeros de proteínas de 14,4 a 20 kDa (30,47 %) e bandas com valores para polímeros de proteínas de 45 kDa (23,12 %) em relação ao tratamento sem enzima (TP).

No tratamento TAT contendo apenas a enzima transglutaminase, a predominância de bandas de baixo peso molecular (α -Latoalbumina e β -Lactoglobulina), pode ser explicada, devido ao fato, destas proteínas globulares serem menos eficientes na formação de ligações cruzadas com a enzima transglutaminase. Estas proteínas possuem estrutura globular compacta mais estável e elevada presença de pontes dissulfeto, que dificultam a interação com a enzima transglutaminase.

Desta forma, o número de ligações cruzadas nestas proteínas tende a ser menor quando comparado ao formado pelas caseínas, uma vez que, as ligações cruzadas ocorrem com maior número em proteínas que contêm o resíduo de glutamina em sua região mais flexível, como ocorre com caseínas que são bons substratos para ação da enzima transglutaminase (GERRARD, 2002; EISSA et al., 2006).

Adicionalmente neste tratamento TAT onde a enzima transglutaminase foi utilizada em maior quantidade (6 U/g proteína) houve formação de bandas de polímeros de proteínas de menor peso molecular (figura 4), que pode ser decorrente da ausência da enzima lactase, pois no tratamento TA2 onde a lactase foi utilizada em combinação com a enzima transglutaminase (2 U/g proteína) observou-se formação de bandas de polímeros de alto peso molecular.

No tratamento Padrão TP (sem adição de enzimas) (figura 4) houve formação de bandas de polímeros de proteínas de 14,4 kDa (37,45 %) e 30 kDa (37,83 %). Considerando que neste tratamento não

houve adição da enzima transglutaminase, pode-se considerar que devido ao ao tratamento térmico da caldas do sorvete ocorreu a desnaturação das proteínas do leite.

O aquecimento do leite causa a desnaturação das proteínas do soro e afeta a sua interação com as micelas de caseína, desorganizando o sistema proteína-água, quebrando as ligações de hidrogênio que estabiliza a estrutura protéica, causando o desdobramento das proteínas e aumenta a interação proteína-proteína (SINGH; CREAMER, 1992; SHARMA; LORENZEN; QVIST; 2001; O'SULLIVAN; KELLY; FOX, 2002; NIEUWENHUIZEN et al., 2003; MACEDO; SATO, 2005), provavelmente a precipitação e formação deste gel de proteínas em solução resultou na formação destas bandas de empilhamento no gel de acrilamida (Figura 4).

Com relação aos demais tratamentos houve empilhamento de proteínas na faixa de 14,4 a 20 kDa, comparativamente ao tratamento padrão (TP-sem enzima), pois foi observada uma pronunciada formação de aglomerados proteicos.

Nos tratamentos TA4 (33,45 %), TA6 (50,51 %), TA8 (53,42 %) empregando a mesma concentração da enzima lactase (0,8 g/L) e variando as concentrações da enzima transglutaminase (4, 6 e 8 U/g proteína, respectivamente), houve a formação de aglomerados de proteínas globulares, isto pode ser explicado pela maior quantidade da enzima lactase, que pode ter contribuído maior a hidrólise da lactose com consequente consumo de água que proporcionou um maior aumento do teor de sólidos totais de meio (proteínas), elevando a viscosidade que favoreceu a aglomeração destas proteínas formando as bandas de empilhamento durante a eletroforese.

Finalmente no tratamento TALC no qual apenas uma concentração da enzima lactase foi adicionada (0,8 g/L) na ausência da enzima transglutaminase, observou-se formação de aglomerados de proteínas globulares na região de 20 kDa obtendo-se o maior valor (55,28 %) em relação ao padrão.

Em estudo realizado por Longo (2006), foi verificado que após a realização da hidrólise da lactose, ocorreu uma redução do teor de gordura do leite, porém um aumento no teor de proteína e aumento da densidade, o que pode ter ocorrido também neste trabalho, devido a padronização do leite ao valor mínimo 8 % de gordura, considerada baixa, segundo a legislação brasileira (BRASIL, 2005).

Ressaltando-se que as proteínas presentes no leite quando submetidas a aquecimento em temperaturas elevadas durante a

fabricação dos sorvetes, precipitam formando um aglomerado (gel), e este aglomerado formado poderá ser visualizado no gel de acrilamida.

4.3.2 Análises da hidrólise de lactose por cromatografia líquida de alta eficiência

O planejamento experimental composto central (CCD), analisado com o método de superfície de resposta, foi utilizado para elucidar o efeito principal e a interação dos fatores estudados: a influência da concentração da transglutaminase (TG), concentração de lactase (LC) e a temperatura (T) nas amostras de sorvete.

Os fatores experimentais e as respostas relacionadas com hidrólise da lactose pela enzima lactase obtidos pelo planejamento experimental, onde encontram-se as estimativas dos efeitos da variação das concentrações das enzimas e da temperatura são apresentados ns (Apêndices N e O).

As análises de CLAE foram realizadas para verificar a percentagem de lactose hidrolisada pela enzima lactase nos tratamentos do sorvete de morango *diet* produzidas com adição da enzima lactase. (Tabela contendo o resultado da análise no programa Statistica 8.0) (Apendice N e O). Os efeitos em vermelho foram significativos sobre a degradação da lactose ao nível de 5% ($p < 0,05$).

Os efeitos menos significativos foram ignorados a fim de promover uma maior simplificação do modelo. Podemos observar que o coeficiente de determinação e o ajuste para o modelo formado pelos coeficientes contidos na tabela foi de $R^2 = 0,76634$. Podemos observar o percentual de hidrólise da lactose decorrentes da atuação da enzima lactase apresentados nas (tabelas 3, 4 e 5).

A maior quantidade de glicose hidrolizada deu-se à temperatura de 40 °C (0,04284 %) (tabela 3). Nas demais temperaturas não houve diferenças significativas.

Tabela 3 - Porcentagem de glicose e lactose hidrolisada pela enzima lactase adicionadas nos sorvetes de morango *diet* nas temperaturas de 20, 30 e 40°C, determinada por CLAE.

Temperatura (° C)	Glicose (%)	Lactose (%)
20	0,03 ^b	0,14 ^a
30	0,03 ^b	0,16 ^a
40	0,04 ^a	0,17 ^a

Não houve diferenças nas percentagens de glicose hidrolisada em função da concentração de transglutaminase. Porém, a média dos controles foi superior aos tratamentos. Não houve diferença na percentagem de lactose hidrolisada entre as concentrações de 2 e 7,4 U/g proteína, as quais foram superiores ao controle (tabela 4).

Tabela 4 - Porcentagem de glicose e lactose hidrolisada pela enzima lactase em função das concentrações da enzima de transglutaminase adicionadas nos sorvetes de morango *diet* nas temperaturas de 20, 30 e 40°C, determinada por CLAE.

Transglutaminase (U/g)	Glicose (%)	Lactose (%)
0,6	0,03 ^b	0,11 ^{ab}
2	0,04 ^b	0,24 ^a
4	0,03 ^b	0,17 ^{ab}
6	0,03 ^b	0,18 ^{ab}
7,4	0,03 ^b	0,31 ^a
Controle	0,05 ^a	0,09 ^b

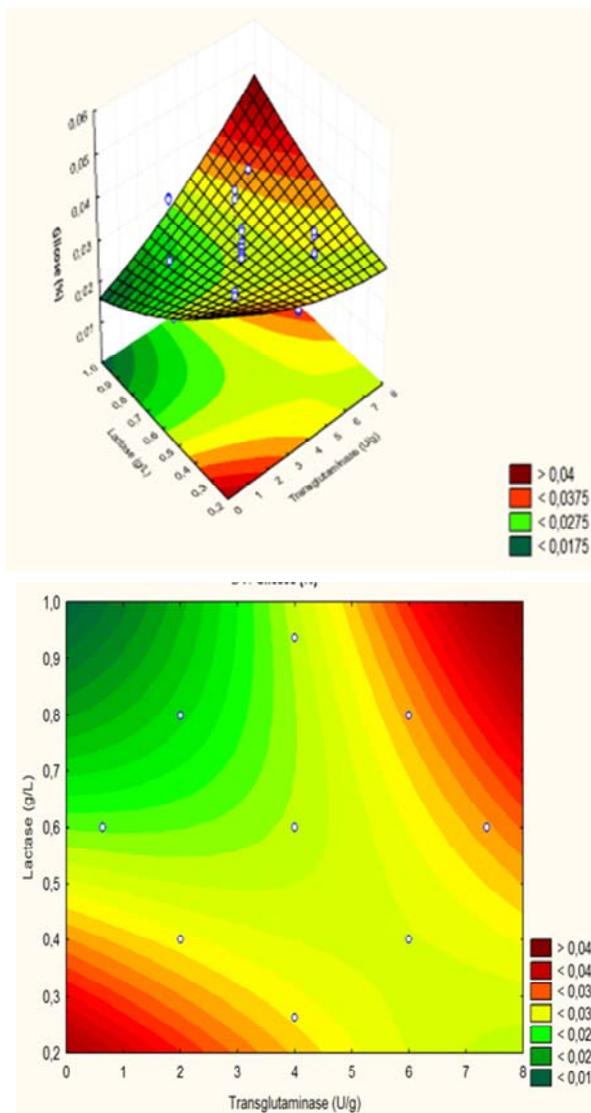
A concentração de glicose não diferiu entre o controle e as concentrações de 0,4; 0,8 e 0,9 g/L de lactase. Porém houve diferença entre o controle e as concentrações de 0,3 e 0,6 g/L. A percentagem de lactose diferiu apenas entre o controle e as concentrações de 0,4 e 0,9 g/L de lactase, que foram estatisticamente superiores.

Tabela 5 - Porcentagem de glicose e lactose hidrolisada pela enzima lactase em função das concentrações da enzima lactase adicionadas nos sorvetes de morango *diet* nas temperaturas de 20, 30 e 40 °C, determinada por CLAE.

Lactase (g/L)	Glicose (%)	Lactose (%)
0,3	0,02 ^b	0,11 ^{ab}
0,4	0,04 ^a	0,24 ^a
0,6	0,03 ^b	0,17 ^{ab}
0,8	0,03 ^{ab}	0,18 ^{ab}
0,9	0,03 ^{ab}	0,31 ^a
Controle	0,04 ^a	0,09 ^b

Resultados da análise da superfície de resposta para a hidrólise da glicose, referentes as variações da concentração das enzimas transglutaminase e lactase adicionadas nas formulações sorvete de morango *diet* na temperatura de 20 °C são apresentadas abaixo na figura 6.

Figura 6 - Gráfico da análise da superfície de resposta para a hidrólise da glicose, referentes as variações da concentração das enzimas transglutaminase e lactase adicionadas nas formulações sorvete de morango *diet* na temperatura de 20 °C.

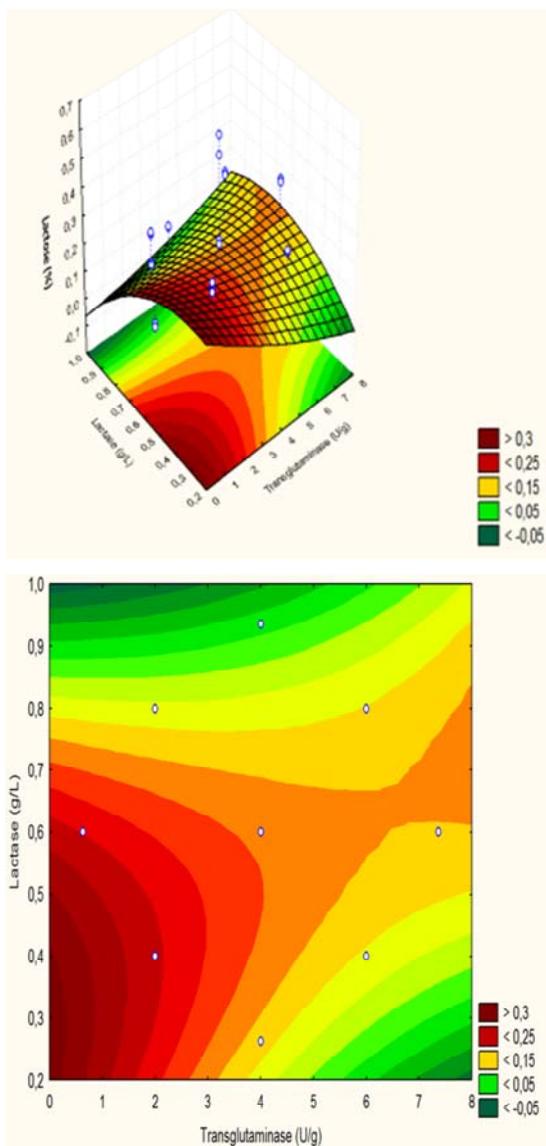


À 20 °C, quanto menor a concentração de transglutaminase, maior a glicose hidrolisada, independente da concentração de lactase. Desta forma, concentrações abaixo de 2,5 U/g proteína de transglutaminase resultaram em valores maiores que 0,032 % de glicose hidrolisada

Este resultados demonstram que a enzima lactase efetuou hidrólise formando glicose no T1 mesmo a baixas temperaturas, utilizando concentrações de 2 U/g da enzima transglutaminase e concentrações de 0,4 g/L da enzima lactase em cerca de 0,38 %, conforme podemos visualizar nos resultados (tabela 6), houve uma pequena formação de cristais que podem ser de lactose e gelo, indicando que a atuação da enzima lactase, aumentando a concentração dos substratos no meio, proporcionou a formação de ligações cruzadas com enzima transglutaminase, pela imobilização da água livre do meio, que é utilizada para a reação de hidrólise. Quando há formação de cristais, de acordo com o tamanho dos cristais formados, eles podem influenciar na firmeza do sorvete, os cristais com maior diâmetro conferem uma textura mais firme ao sorvete (INOUE et al., 2009).

Resultados da análise da superfície de resposta para a hidrólise da lactose, referentes as variações da concentração das enzimas transglutaminase e lactase adicionadas nas formulações sorvete de morango *diet* na temperatura de 20 °C são apresentadas na figura 7.

Figura 7 - Gráfico da análise da superfície de resposta para a hidrólise da lactose, referentes as variações da concentração das enzimas transglutaminase e lactase adicionadas nas formulações sorvete de morango *diet* na temperatura de 20 °C.



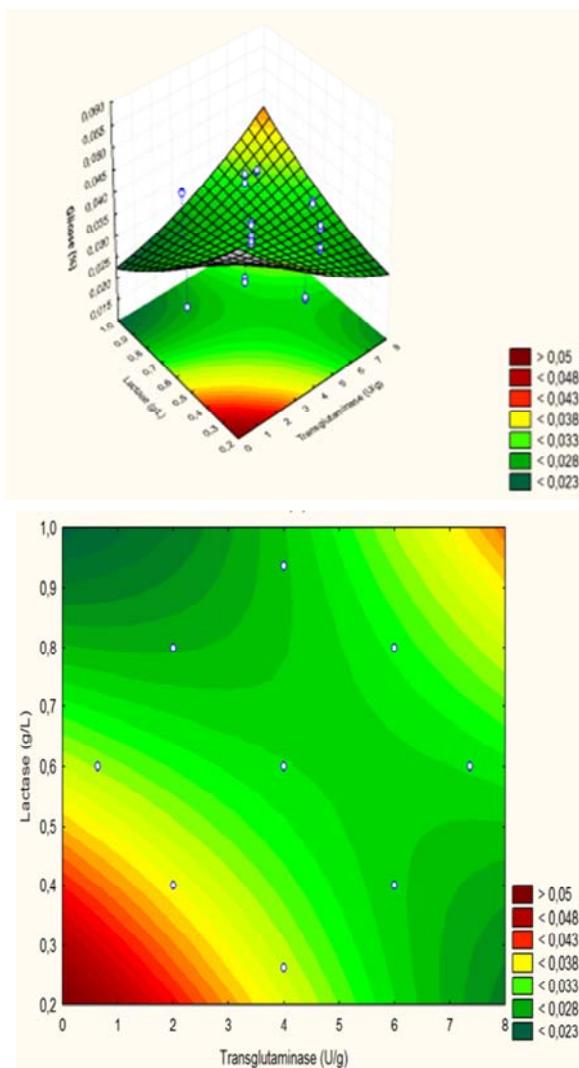
À temperatura de 20 °C, e em concentrações da enzima lactase maiores que 0,80 g/L resultaram em teores de lactose hidrolisadas inferiores a 0,08 %, enquanto em concentrações menores que 0,45 g/L de enzima lactase resultaram em valores superiores a 0,3 % de hidrólise da lactose.

A concentração da enzima transglutaminase não teve efeito sobre a conversão da lactose em glicose e galactose mesmo em altas concentrações da enzima lactase. Podemos observar que a enzima lactase não foi muito eficiente para realizar hidrólise nestas temperaturas pois a temperatura ótima de atuação desta enzima situa entre 35 a 40 °C. Campos et al., 2009, em estudos demonstraram que a enzima atua em baixas temperaturas, mas em períodos de incubação acima de 7 horas, o que não é condizente com nosso trabalho, pois o tempo utilizado foi de 90 minutos.

No tratamento T5 e T7, houve formação de pequenos cristais que podem ser imperceptíveis ao paladar (tabela 6). Durante o batimento/congelamento do sorvete, pode ter ocorrido uma aglomeração dos glóbulos de gordura junto as micelas de caseína, aumentando a viscosidade do meio, e reduzindo a mobilidade da água, com formação de bolhas de ar (figura 15), que possuem propriedades térmicas, evitando a mobilização da água, com formação de pequenos cristais (GOOF, 1999; CHANG et al., 2002, MUSE; HARTEL; 2004; COSTA, 2006).

Resultados da análise da superfície de resposta para a hidrólise da glicose, referentes as variações da concentração das enzimas transglutaminase e lactase adicionadas nas formulações de sorvete de morango *diet* na temperatura de 30 °C são apresentadas na figura 8.

Figura 8 - Gráfico da análise da superfície de resposta para a hidrólise da glicose, referentes as variações da concentração das enzimas transglutaminase e lactase adicionadas nas formulações sorvete de morango *diet* preparadas na temperatura de 30 °C.



À 30 °C e em concentrações menores que 5 U/g proteína da enzima transglutaminase e concentrações maiores de 0,9 g/L de enzima lactase, resultaram em porcentagens de glicose hidrolisada superiores a 0,034 %. Por outro lado, ao utilizarmos concentrações menores 0,3 g/L da enzima lactase combinadas com concentrações maiores que 4 U/g proteína de enzima transglutaminase resultaram na redução da hidrólise da glicose em porcentagens menores de 0,024 %.

A hidrólise da glicose verificada através de análises de CLAE, ocorreu em concentrações de 2 U/g proteína e concentrações de 0,4 g/L da enzima lactase em quantidade de 0,03 % utilizadas para no tratamentos (T9), que apresentou formação de pequenos cristais (figura 15). Estes cristais podem ter sido formados durante o processo inicial de congelamento no freezer e seu tamanho é crítico para determinar a qualidade do sorvete (COSTA, 2006).

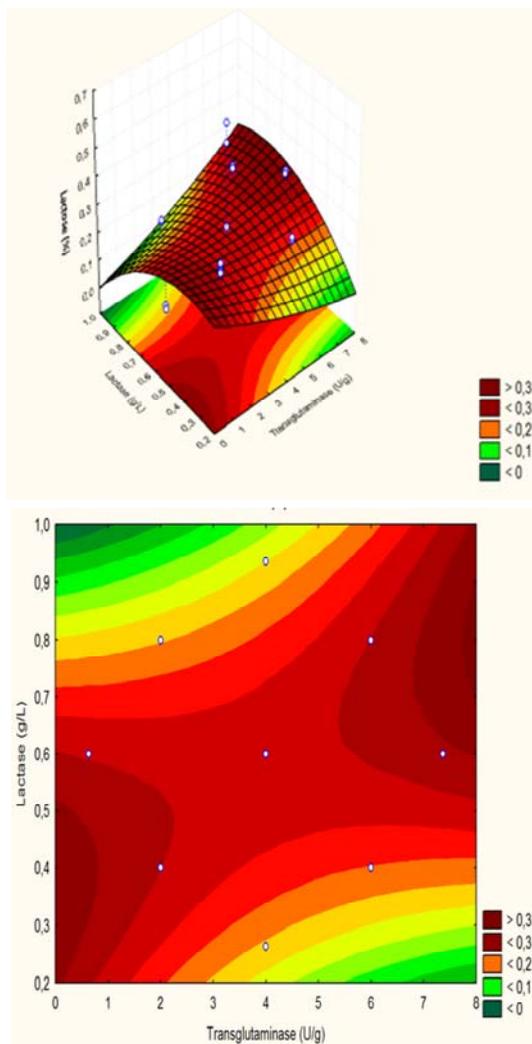
A capacidade de estruturação de cristais varia em soluções aquosas contendo compostos com diferentes polaridades e na presença de diferentes tipos de açúcares. A presença de compostos hidrofílicos ou hidrofóbicos favorece a formação de arranjos cristalinos circulares, por outro lado, a presença da glicose determina a formação de configurações hexagonais, quando submetidas ao congelamento lento (CARNEIRO; CAL-VIDAL, 2000).

Os tratamentos T15, T16, T17 e T18 não apresentaram formação de cristais, isto pode ser devido a estruturação de uma rede proteica firme, com a polimerização das proteínas conduzida pela enzima transglutaminase (tabela 6 e figura 15), segundo GOOF (2005), uma rede proteica fina e coesa, com presença de glóbulos de gordura, micelas de caseína, bolhas de ar, evita a formação de cristais.

Petzold e Aguilera (2009), em estudos realizados, afirmam que emulsificantes presentes na calda do sorvete podem cristalizar, diminuindo a mobilidade na interface da gordura e promovendo a desestabilização desta, aumentando a viscosidade do meio e evitando a formação de grandes cristais que conferem ao sorvete textura mais firme e arenosa (COSTA, 2006; INOUE et al., 2009).

Resultados da análise da superfície de resposta para a hidrólise da lactose, referentes as variações da concentração das enzimas transglutaminase e lactase adicionadas nas formulações sorvete de morango *diet* na temperatura de 30 °C são apresentados na figura 9.

Figura 9 - Gráfico da análise da superfície de resposta para a hidrólise da lactose, referentes as variações da concentração das enzimas transglutaminase e lactase adicionadas nas formulações de sorvete de morango *diet* preparadas na temperatura de 30 °C.

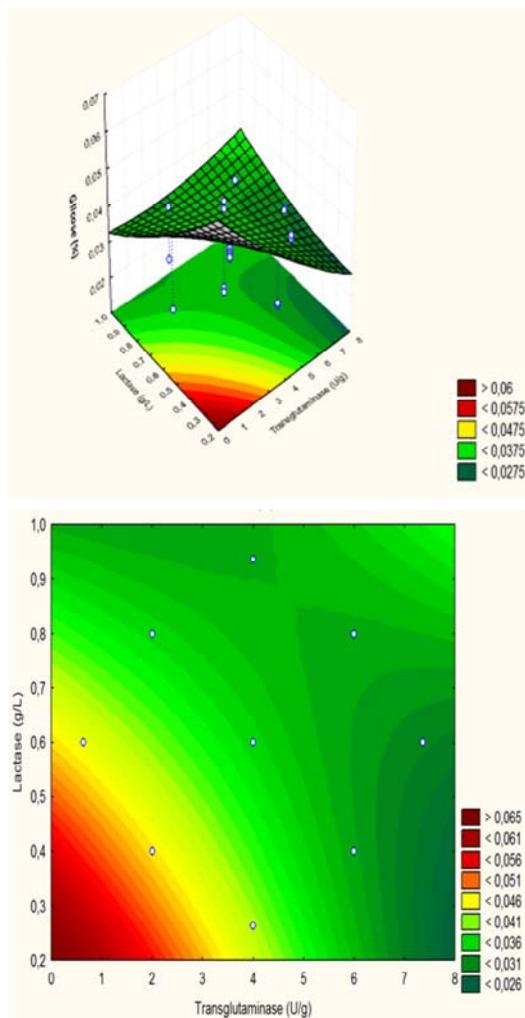


Na temperatura de 30 °C, a concentração de transglutaminase não influenciou na hidrólise da lactose. Porém, a hidrólise da lactose foi diretamente proporcional à adição de lactase. Com concentrações menores que 0,25 g/L da enzima lactase, obteve-se um percentual abaixo de 0,075 % de lactose hidrolisada e com concentrações de 0,95 g/L da enzima lactase, obteve hidrólise da lactose acima de 0,3 %.

O tratamento T12 com concentrações das enzimas lactase e transglutaminase (0,6 g/L e 7,4 U/g proteína respectivamente), não apresentou formação de cristais (figura 15), Pode ter ocorrido reação de hidrólise da lactose nesta temperatura, aumentando a quantidade de substrato do meio, aglutinando gorduras, bolhas de ar e proteínas formando ligações cruzadas induzida pela enzima transglutaminase. A presença do ar na estrutura do sorvete auxilia no controle do tamanho dos cristais, garantido a formação de uma textura mais leve e suave (CLARKE, 2005; SOFJAN; HARTEL, 2004; SOULOULIS et al., 2008).

Resultados da análise da superfície de resposta para a hidrólise da glicose, referentes as variações da concentração das enzimas transglutaminase e lactase adicionadas nas formulações sorvete de morango *diet* na temperatura de 40 °C são apresentadas na figura 10.

Figura 10 - Gráfico da análise da superfície de resposta para a hidrólise da glicose, referente às variações da concentração das enzimas transglutaminase e lactase adicionadas nas formulações sorvete de morango *diet* preparadas na temperatura de 40 °C.



Sob temperatura de 40 °C e em concentrações inferiores a 0,45 g/L da enzima lactase, associadas a concentrações menores de 3,0 U/g da enzima transglutaminase resultaram em concentrações maiores de glicose hidrolizada (maiores que 0,045 %); ao contrário, quando foram empregadas maiores concentrações das enzimas, resultaram em menores porcentagens de glicose hidrolizada (< 0,03 %).

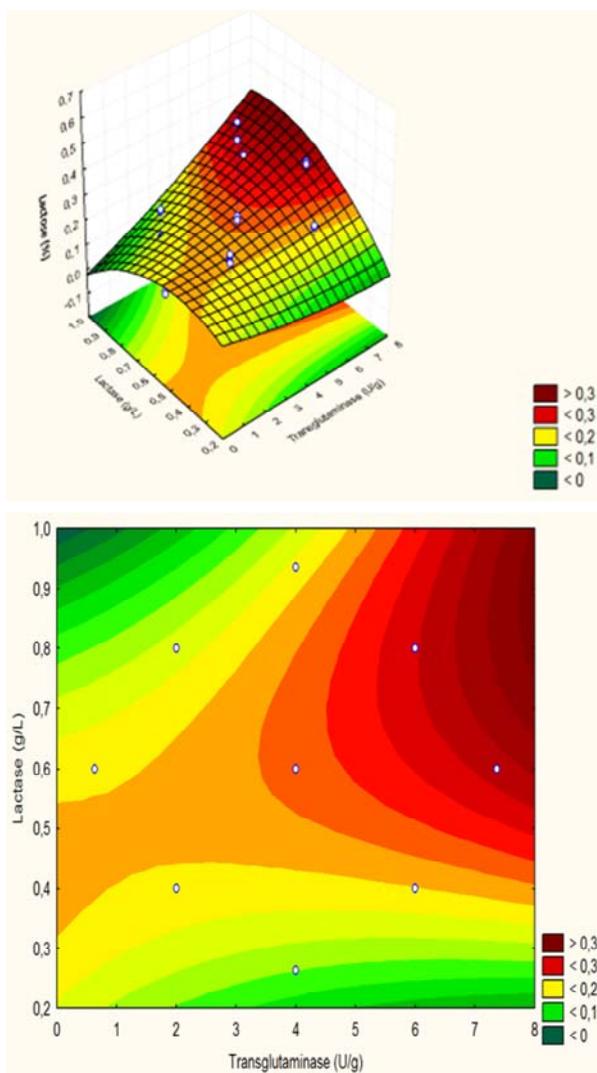
A temperatura (40 °C) e menores concentrações das enzimas pode ter contribuído para maior hidrólise da glicose, induzindo a formação de ligações cruzadas com as proteínas, proporcionado aumento de sólidos totais e diminuindo a disponibilidade de água no meio, evitando a movimentação dos pequenos cristais formados que, eventualmente, poderiam aglomerar-se formando grandes cristais, como no tratamento T4 (tabela 6 e figura 15), afetando a textura do sorvete.

Nos tratamentos T2, T6, T8 (tabela 6) houve formação de pequenos cristais, que não afetaram a textura do sorvete, devido à presença de glóbulos de gordura, micelas de caseína e bolhas de ar, que propiciam estrutura mais firme (GOOF, 1997; GOOF, 2005; DAMODARAN, 2010). Nesses tratamentos observou-se hidrólise pela lactase formando glicose (0,056; 0,035 e 0,036 %, respectivamente). Dessa forma, o tratamento T2 apresentou maior quantidade de glicose, indicando que ocorreu hidrólise da lactose.

Durante o batimento e congelamento da calda dos sorvetes (T2, T6, T8) formam-se duas fases: a fase congelada e a fase não congelada. Na fase congelada, contendo a solução de glicose, podem ter ocorrido alterações significativas nas propriedades físico-químicas, tensão superficial e interfacial. Além disso, podem ocorrer alterações na estrutura da água livre no meio que estiver interagindo com os complexos soluto-água (sólidos totais-água), nos quais as macromoléculas podem unir-se em interações mais próximas, reduzindo os espaços disponíveis para o crescimento de pequenos cristais (ECHLIN, 1992; CARNEIRO; CAL-VIDAL, 2000); isso pode ter ocorrido no tratamento T2.

Resultados da análise da superfície de resposta para a hidrólise da lactose, referentes às variações da concentração das enzimas transglutaminase e lactase adicionadas às formulações de sorvete de morango *diet* na temperatura de 40 °C são apresentados na figura 11.

Figura 11 - Gráfico da análise da superfície de resposta para a hidrólise da lactose, referente às variações da concentração das enzimas transglutaminase e lactase adicionadas às formulações sorvete de morango *diet* preparadas na temperatura de 40 °C.



Sob temperatura de 40 °C, em concentração maior que 6,0 U/g proteína da enzima transglutaminase e concentração maior que 0,45 g/L da enzima lactase, foi maior a porcentagem de lactose hidrolisada (> 0,28 %).

No tratamento T4 (figura 15), a temperatura de 40 °C e maiores concentrações das enzimas favoreceu a hidrólise da lactose em cerca de 0,31 %, demonstrando conseqüentemente a formação de ligação cruzada com as proteínas. A presença de cristais nesse tratamento (figura 15) pode ser explicada pela ocorrência de oscilações e elevação da temperatura durante o batimento e o congelamento dentro da sorveteira, que induziu a fusão dos cristais; entretanto, a diminuição da temperatura nos freezers pode ter ocasionado a recristalização dos cristais pré-existentes. Adicionalmente, durante o batimento e o congelamento pode ter acelerado o fenômeno de coalescência. Essa coalescência, aliada às oscilações de temperatura que normalmente ocorrem na sorveteira, contribuíram para aumentar o tamanho médio dos cristais (KUS; ALTAN; KAYA, 2005; LAL; O'CONNOR; EYRES, 2006; FERNANDEZ et al., 2008).

A textura firme, macia e coesa presente nos tratamentos T2, T6 e T8, demonstra que a hidrólise da lactose promove a formação de ligações cruzadas, formando uma rede tridimensional mais firme, retendo uma grande quantidade de água, diminuindo sua mobilidade e evitando a formação de grandes cristais (GOFF, 2012).

A formação da estrutura mais macia dos sorvetes nesses tratamentos T2, T6 e T8 pode ter sido favorecida pelo desprendimento da β -caseína durante o resfriamento da calda dos sorvetes. Ao serem adsorvidas na estrutura micelar devido ao enfraquecimento das ligações hidrofóbicas, as moléculas de β -caseína aumentam a aeração e a estabilidade da espuma na calda (STANLEY; GOFF, 1996; GOFF, 2005; VEJA; GOFF, 2005).

Ao mesmo tempo, as moléculas de β -caseína aumentam a viscosidade, porque as proteínas não estão presentes nessas interfaces contribuindo para maior absorção de água e aumento das bolhas de ar que podem inibir a formação de cristais (tabela 6) (STANLEY; GOFF, 1996; GOFF, 2005; VEJA; GOFF, 2005).

Durante o batimento e o congelamento do sorvete na sorveteira, aumenta o volume da calda devido a maior incorporação de ar (*overrun*); os cristais são formados para criar uma textura firme e coesa, aumentando a vida de prateleira do sorvete (GOFF, 2002).

4.3.3 Análises de microscopia

O planejamento experimental composto central (CCD), analisado com a metodologia de superfície de resposta, foi utilizado para elucidar o efeito principal e a interação dos fatores estudados: a influência da concentração da transglutaminase (TG), da concentração de lactase (LC) e a temperatura (T) nas amostras de sorvete.

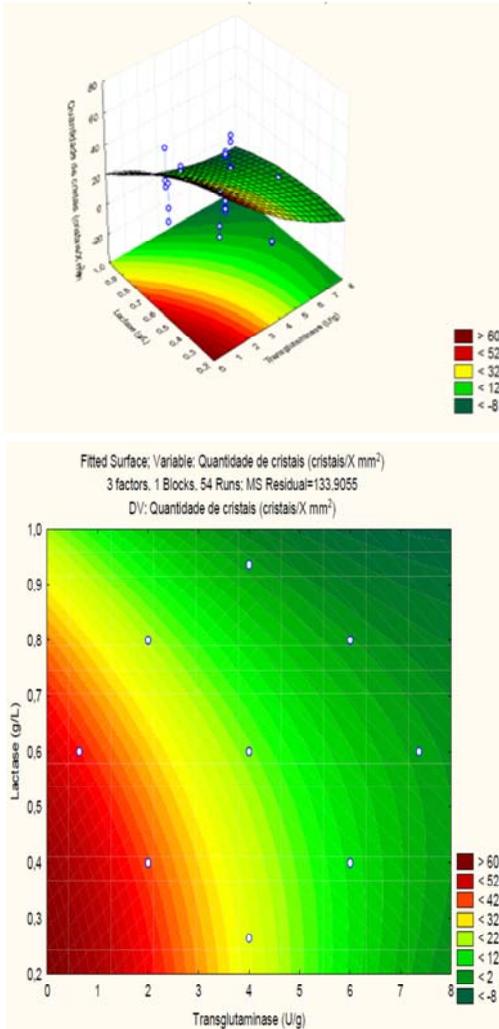
Nos Apêndices P e Q são apresentados os fatores experimentais e as respostas relacionadas com quantidade de cristais (cristais/mm²) obtidos pelo planejamento experimental, onde se encontram as estimativas dos efeitos da variação das concentrações das enzimas e da temperatura e a análise de variância.

Os valores representados em vermelho nos Apêndices P e Q são significativos para a quantidade de cristais (cristais/mm²) em nível de 5% ($p < 0,05$). Os efeitos menos significativos estatisticamente podem ser ignorados no modelo sendo o coeficiente de determinação $R^2 = 0,53651$.

4.3.3.1 Análises da superfície de resposta para as quantidades de cristais/mm² nos tratamentos dos sorvetes de morango *diet* na temperatura de 20 °C

Análises da superfície de resposta para as quantidades de cristais/mm² nos tratamentos dos sorvetes de morango *diet* na temperatura de 20 °C são apresentados na figura 12.

Figura 12 - Gráfico da análise da superfície de resposta para a quantidade de cristais (cristais/mm²), referente às variações da concentração das enzimas lactase e transglutaminase adicionadas às formulações de sorvete de morango *diet* sob temperatura de 20 °C.



Nas análises de superfície de reposta dos tratamentos T1, T3, T5, T7 incubados à temperatura de 20 °C foi observado que em concentrações da enzima transglutaminase menores que 1,5 U/g proteína e concentrações de enzima lactase menores que 5,5 g/L obteve-se maior quantidade de cristais (acima de 60 cristais/mm²). As quantidades de cristais formados nesses tratamentos foram menores (tabela 6), provavelmente pelo fortalecimento das interações das enzimas lactase que, mesmo em baixas temperaturas, foram efetivas na hidrólise da lactose, reduzindo a água livre disponível para formar cristais (LONGO, 2006).

Por outro lado, como as quantidades de cristais formados nesses tratamentos foram menores (tabela 6 e figura 15 a, c, e, g), infere-se que o efeito sinérgico associado com o uso combinado das enzimas elevou a formação de ligações cruzadas, formando grandes polímeros, contribuindo para fortalecer a rede tridimensional que evitou a formação de grandes cristais.

Além disso, supõe-se que a atuação da transglutaminase formou ligações entre as proteínas lácteas, criando uma rede fina que imobilizou a água em grande proporção e provavelmente o mesmo ocorreu com a gordura, formando um gel firme, provocando o endurecimento das proteínas, cobrindo os glóbulos de gordura e participando da rede proteica, o que criou bolhas de ar que ocupam espaços no meio, evitando a movimentação da água no meio (METWALLY, 2007); como consequência, dificultou a formação de grandes cristais, fato observado em sorvetes durante o armazenamento (TANG; YANG; 2007).

Em geral os consumidores preferem sorvetes com cristais menores e imperceptíveis ao paladar, uma vez que cristais grandes resultam em textura mais grosseira (HARTEL, 1996).

No entanto, em maiores concentrações da enzima transglutaminase, a quantidade de cristais foi sempre acima de 2 cristais/mm² independentemente da concentração da enzima lactase, o que condiz com a contagem de cristais obtidos no tratamento T1 e T3 (figura 15 a, c), que apresentaram quantidades de cristais acima dessa faixa.

Assim, os resultados do gráfico da superfície de resposta demonstram que pode ter ocorrido a polimerização das proteínas, formando uma rede proteica firme e coesa, com a presença de aglomerados de proteínas, bolhas de ar e gordura, combinação que pode ter evitado a formação de cristais em maiores quantidades.

A menor quantidade de cristais foi obtida na concentração da enzima transglutaminase acima de 6 U/g proteína associada a concentrações da

enzima lactase acima de 0,9 g/L. Esses resultados corroboram os obtidos nas contagens de cristais dos tratamentos T5 e T7 (tabela 6 e figura 15 c, g), nos quais se utilizou concentração de enzima lactase de 0,8 g/L, podendo ter ocorrido a formação de ligações cruzadas das proteínas, com aglomeração dos glóbulos de gordura nas micelas de caseína, aumentando a viscosidade do meio, e reduzindo a mobilidade da água. O aumento da viscosidade da matriz aumenta a resistência ao fluxo, sendo necessário mais tempo para difundir a água na estrutura do sorvete; conseqüentemente, pequenos cristais são formados (MUSE; HARTEL, 2004).

Além disso, o crescimento de cristais pode ser inibido pela adsorção das proteínas ou polipeptídeos na interface gelo-solução por meio das ligações de hidrogênio (WANG et al., 2007; DAMODARAN et al., 2010).

Os resultados obtidos na contagem dos cristais nos tratamentos T1, T3, T5, T7 e T9 (tabela 6), evidenciam diferenças estatísticas significativas entre as médias, em nível de 5% de probabilidade pelo teste Dunn (não paramétrico).

Provavelmente a atuação da transglutaminase formando ligações entre as proteínas lácteas, criando uma rede fina que imobilizou a água em grande proporção e provavelmente a gordura, formando um gel firme, provocou efeito endurecedor das proteínas, cobrindo os glóbulos de gordura e participando da rede proteica, criando bolhas de ar que ocupam espaços no meio e evitando a movimentação da água no meio (METWALLY, 2007).

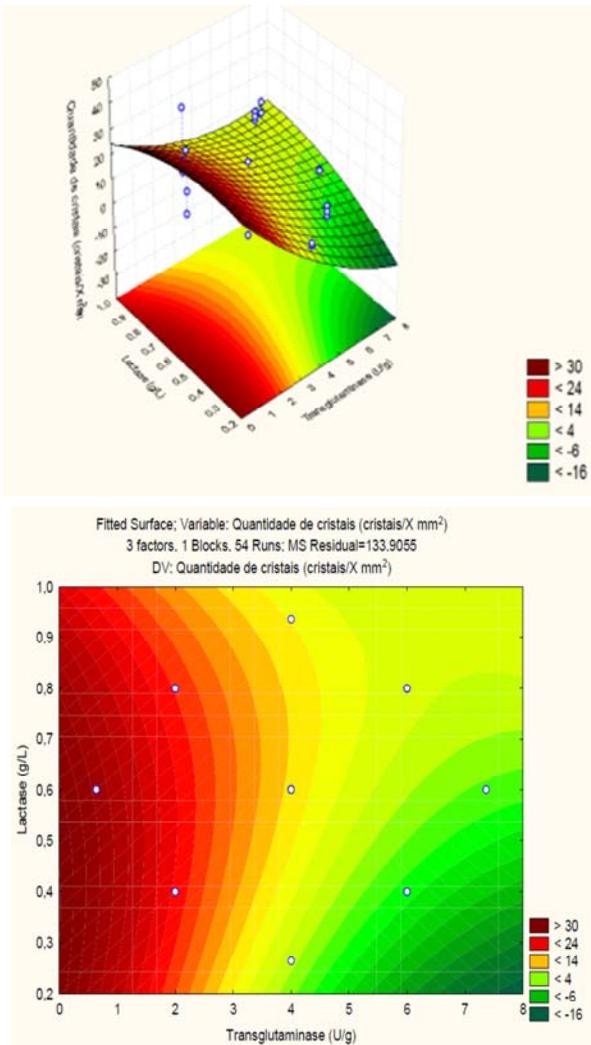
No entanto, em maiores concentrações da enzima transglutaminase, a quantidade de cristais foi sempre acima de 2 cristais/mm², independentemente da concentração da enzima lactase, o que condiz com a contagem de cristais no tratamento T1 e T3 (tabela 6 e figura 15 a, c), que apresentaram quantidades de cristais acima dessa faixa. A polimerização das enzimas pode ter ocorrido, formando uma rede proteica firme e coesa, e a presença de aglomerados de proteínas, bolhas de ar e gordura, possivelmente evitou a formação de cristais em maior quantidade.

A formação de cristais em sorvete determina a sua qualidade final, e tem sido extensivamente estudada. Os cristais são formados durante o processo inicial de congelamento no freezer, e seu tamanho é crítico para determinar a qualidade do sorvete. Geramente são preferidos cristais menores, que sejam imperceptíveis ao paladar, porque cristais grandes resultam em textura mais grosseira, arenosa (HARTEL, 1996).

Os resultados obtidos na contagem dos cristais (tabela 6) nos tratamentos T1, T3, T5 e T7 mostram diferenças estatísticas significativas entre as médias, em nível de 5% de probabilidade pelo teste Dunn (não paramétrico).

4.3.3.2 Análises da superfície de resposta para as quantidades de cristais/mm² nos tratamentos de sorvetes de morango *diet* na temperatura de 30 °C são apresentadas na figura 13.

Figura 13 - Gráfico da análise da superfície de resposta da quantidade de cristais (cristais/mm²) referente às variações da concentração das enzimas lactase e transglutaminase adicionadas às formulações de sorvete de morango *diet* na temperatura de 30 °C.



Nos tratamentos incubados à temperatura de 30 °C, os resultados da análise de superfície de resposta para os tratamentos T9, T10, T11 T12, T15, T16, T17 e T18 notou-se que em concentrações da enzima transglutaminase menores que 1 U g⁻¹ proteína, a concentração da enzima lactase não influenciou na formação de cristais nos tratamentos de sorvetes de morango *diet*; em qualquer concentração da enzima lactase o número de cristais formados foi maior do que 24 cristais/mm².

Na tabela 6 podemos observar que o tratamento T11 apresentou pequeno crescimento de cristais, mas as quantidades formadas foram menores que 24 cristais/mm², evidenciando que houve polimerização e hidrólise da lactase, formando ligação cruzada das proteínas, como se vê na figura 15 k. Possivelmente ocorre uma grande aglomeração de glóbulos de gordura, micelas de caseína e bolhas de ar. Em estudos realizados, com sorvete, Adapa et al., 2000; GOFF; 2006 observaram que a gordura é recoberta por uma camada de proteínas, na forma parcialmente coalescida, estabilizando a estrutura das bolhas de ar e da espuma, o que contribui para melhor textura do sorvete, evitando a formação de grandes cristais (ZHANG; GOFF, 2005).

A hidrólise da lactose pode ter favorecido maior polimerização das proteínas pela enzima transglutaminase, formando uma estrutura mais coesa, diminuindo a água livre do meio e, conseqüentemente, formando menos cristais e diminuindo a firmeza do sorvete, Segundo Nazaruddin; Syalisa; Rosnani, 2008, Cruz et al., 2009, a incorporação de ar durante o processamento do sorvete aumenta o volume do produto em relação à calda. As bolhas de ar formadas são envolvidas por gorduras e por proteínas lácteas e definem a estrutura do produto final, proporcionando maior estabilidade à espuma e maior textura. Diversos fatores são determinantes para desenvolver bolhas de ar no sorvete: a força de cisalhamento aplicada durante o congelamento, a viscosidade da matriz não congelada (calda) e o grau de coalescência parcial dos glóbulos de gordura (CHANG; HARTEL, 2002).

Embora com pouca variação, as concentrações da enzima lactase passam a ter influência sobre a quantidade de cristais formados a partir de concentrações da enzima transglutaminase de 5 U g⁻¹ proteína. Contudo, nos tratamentos T10, T12, T16, T17 e T18 (tabela 6) ocorreu uma pequena formação de cristais, como se pode ver na figura 15 j, l, p, q; os pequenos cristais resultaram da limitação causada pela grande quantidade de gordura e bolhas de ar, que possivelmente impediram a formação de grandes cristais.

Para ocorrer o crescimento de cristais no sorvete, é necessário que haja água livre disponível para iniciar o processo. Isso ocorre quando os sólidos totais do sorvete são empurrados para a região de crescimento dos cristais, causando imediato aumento na concentração do meio, elevando imediatamente a fronteira entre os cristais e a fase descongelada.

Por sua vez, o aumento da concentração no meio aumentará a microviscosidade, formando um gel com dependência cinética da movimentação da água do meio. Portanto, esse aumento da microviscosidade resultará num efeito de retardamento da migração da água que circunda cada cristal que está crescendo na área, dificultando seu crescimento (REGAND; GOFF, 2006).

Contudo, os tratamentos T9 e T15 apresentaram cristais maiores do que os demais tratamentos. A figura 15 I, o, mostra que nesses dois tratamentos não se veem as gotas de gordura nem as bolhas de ar, que, conforme descrito acima, dificultam o crescimento dos cristais.

Segundo a literatura, pode ocorrer a formação de cristais no início da bateção do sorvete na produtora. As condições para que isto ocorra estão perto da superfície do cilindro, que é resfriado pelo líquido refrigerante, de temperatura muito baixa, ocorrendo nucleação dos cristais. Esses núcleos formados na superfície são raspados para o interior da mistura (região mais distante da superfície), onde a temperatura está mais próxima da do início de congelamento, favorecendo o crescimento de cristais (ADAPA et. al., 2000).

A maior variação na quantidade de cristais formados em função da concentração da enzima lactase deu-se na concentração da enzima transglutaminase entre as faixas 7 e 8 U/g proteína. Nessa temperatura, verifica-se que a formação de cristais é mais afetada pela concentração da enzima transglutaminase do que da concentração da enzima lactase.

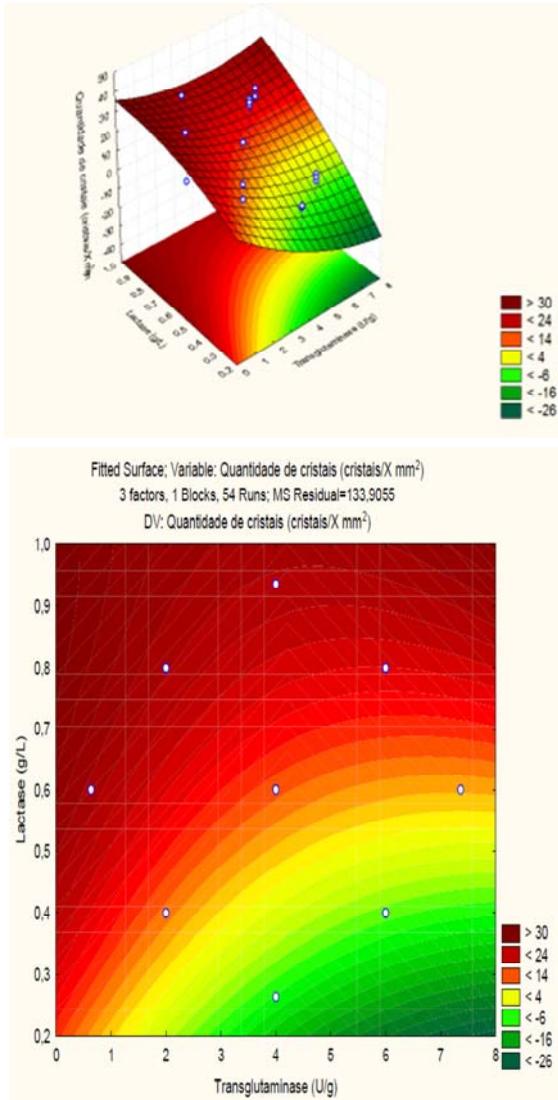
Esses resultados corroboram os dados obtidos no tratamento T12 (tabela 6 e figura 15 l), onde é possível observar que houve polimerização das proteínas pela enzima transglutaminase, com formação de pouquíssimos cristais, apresentando muitas bolhas de ar de formato arredondado, gotículas de gordura bem definidas e algumas micelas de caseínas ou proteínas desnaturadas do soro, presente na emulsão desse sorvete, formando uma emulsão firme e evitando formação de cristais.

Estudos realizados por Flores e Goff (1999) comprovaram que certa quantidade de ar presente no sorvete será necessária para provocar um impacto na microestrutura. Assim, a presença de bolhas de ar pode afetar as propriedades térmicas dos sorvetes, atuando também como uma

barreira fixa durante o congelamento. E numa estrutura de ar bem dispersa, é menor a probabilidade de colisões entre os cristais, reduzindo os fenômenos de re-cristalização.

4.3.3.3 Análise da superfície de resposta para as quantidades de cristais/mm² nos tratamentos dos sorvetes de morango *diet* na temperatura de 40 °C são apresentados na figura 14.

Figura 14 - Gráfico da análise da superfície de resposta da quantidade de cristais (cristais/ mm²) referente às variações da concentração da enzima lactase e da enzima transglutaminase adicionadas às formulações sorvete de morango *diet* na temperatura de 40 °C.



Na análise da superfície de reposta para os tratamentos de sorvetes T2, T4, T6, T8, incubados à temperatura de incubação a 40 °C, notou-se que maiores concentrações de transglutaminase associadas a baixas concentrações de lactase resultaram em baixas quantidades de cristais formados (menor que 26 cristais/mm²). Por outro lado, baixas concentrações de transglutaminase associadas a altas concentrações de lactase resultaram em maior número de cristais formados (acima de 30 cristais/mm²). Em baixas concentrações de transglutaminase (abaixo de 1 U/ proteína), a variação nos teores de lactase teve menos influência na formação de cristais (variando de 14 até acima de 30 cristais/mm²) do que em altas concentrações de transglutaminase, que pode variar desde ausência de cristais até mais do que 30 cristais/mm².

Os resultados obtidos na contagem dos cristais nos tratamentos T2, T4, T6, T8 (tabela 6) evidenciam que houve diferenças estatísticas significativas entre as médias, em nível de 5% de probabilidade pelo teste Dunn (não paramétrico).

Os tratamentos T2, T6 e T8 apresentaram pequenas quantidades de cristais (tabela 6), associadas a grande presença de bolhas de ar, glóbulos de gordura e provavelmente algumas micelas de caseína (tabela 6 e figura 15 b, f, h), que são condições relacionadas com a formação de menor número de cristais.

Nesses tratamentos a água da rede tridimensional por meio de forças capilares propicia condições para formação e crescimento dos cristais; no entanto, esse crescimento também é inibido com a presença das inúmeras bolhas de ar e presença de glóbulos de gordura, conforme já discutido anteriormente.

A pequena quantidade de cristais observada nesses tratamentos influenciou na estrutura dos sorvetes, visível através da microscopia. Convém salientar que pequenos cristais são necessários porque ajudam a manter a estrutura do sorvete, mas devem sempre ser imperceptíveis ao paladar do consumidor (DAMODARAN; 2007).

Tabela 6 - Dados comparativos entre as médias (\pm desvio padrão) das quantidades de cristais em $22.489\mu\text{m}^2$, considerando os tratamentos do sorvete de morango *diet* com concentrações crescentes da enzima lactase e da enzima transglutaminase em diferentes temperaturas.

Tratamentos	(A)	(B)	(C)	Quantidade de Cristais/ $22\mu\text{m}^2$
T1	0,4	2	20	$10,00 \pm 0,00^{\text{a}}$
T2	0,4	2	40	$3,11 \pm 3,43^{\text{de}}$
T3	0,4	6	20	$3,61 \pm 3,08^{\text{cd}}$
T4	0,4	6	40	$10,00 \pm 0,00^{\text{a}}$
T5	0,8	2	20	$0,22 \pm 0,48^{\text{f}}$
T6	0,8	2	40	$0,75 \pm 1,13^{\text{ef}}$
T7	0,8	6	20	$0,94 \pm 1,37^{\text{ef}}$
T8	0,8	6	40	$5,28 \pm 3,50^{\text{bcd}}$
T9	0,3	4	30	$6,89 \pm 3,92^{\text{abc}}$
T10	0,9	4	30	$0,25 \pm 0,55^{\text{f}}$
T11	0,6	0,6	30	$1,19 \pm 1,88^{\text{ef}}$
T12	0,6	7,4	30	$1,80 \pm 2,85^{\text{ef}}$
T13	0,6	4	13	$0,83 \pm 2,00^{\text{ef}}$
T14	0,6	4	47	$0,83 \pm 2,00^{\text{ef}}$
T15	0,6	4	30	$9,86 \pm 0,49^{\text{ab}}$
T16	0,6	4	30	$0,31 \pm 0,62^{\text{f}}$
T17	0,6	4	30	$2,75 \pm 3,80^{\text{de}}$
T18	0,6	4	30	$0,61 \pm 0,84^{\text{ef}}$

Nota: Letras minúsculas diferentes comparadas verticalmente indicam diferenças estatisticamente significativas entre as médias, em nível de 5% de probabilidade pelo teste Dunn (não paramétrico). N= 36. (A) enzima lactase (g/L), (B) enzima Transglutaminase (U/g proteína), (C) Temperatura ($^{\circ}\text{C}$).

Os tratamentos T1, T4, T13 e T15 apresentaram formação de cristais maiores (tabela 6 e figura 15 a, d, m, o), que predominam na imagem da microscopia, como o crescimento dos cristais está relacionado com a presença dos glóbulos de gordura e formação de bolhas de ar. Nesse tratamento se observa que não houve polimerização das proteínas pela enzima transglutaminase. A presença de grande

quantidade de moléculas de água livre no meio favoreceu o crescimento de grandes cristais. Para alguns autores, as flutuações bruscas na temperatura durante o congelamento podem provocar a movimentação água, iniciando a formação de cristais.

A incorporação de ar provoca grande impacto no crescimento, distribuição e tamanho dos cristais, afetando a microestrutura do sorvete. Quando ocorre formação de pequenas quantidades de ar na estrutura do sorvete, o ar formado não consegue impedir a movimentação dos cristais, os quais, não encontrando barreira, chocam-se uns com os outros, formando grandes amontoados de cristais (FLORES; GOFF, 1999).

Os resultados das análises de quantidade de cristais para os tratamentos de sorvete de morango *diet* são apresentados na figura 15.

Figura 15 - Fotomicrografias de esfregaço de sorvete de morango *diet* nos tratamentos T1 a T18 com concentrações crescentes da enzima lactase e da enzima transglutaminase, em diferentes temperaturas.

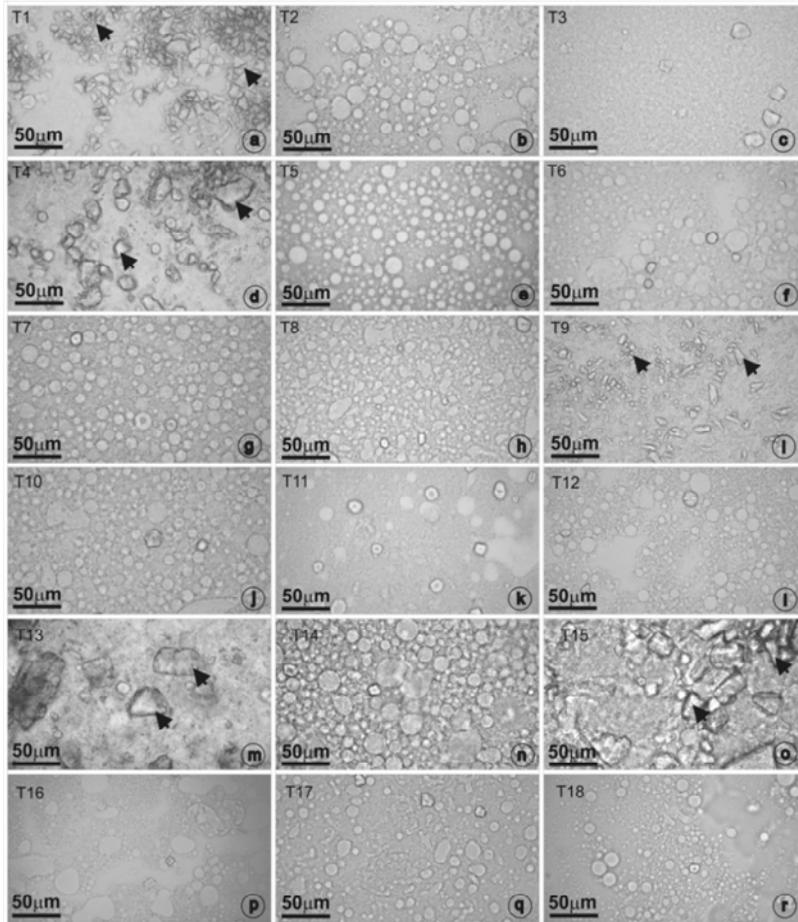


Figura 15a-r Fotomicrografias de esfregaço de sorvete de morango *diet* nos diferentes tratamentos (1 ao 18) sem coloração. a Tratamento 1 (T1). b Tratamento 2 (T2). c Tratamento 3 (T3). d Tratamento 4 (T4). e Tratamento 5 (T5). f Tratamento 6 (T6). g Tratamento 7 (T7). h Tratamento 8 (T8). i Tratamento 9 (T9). j Tratamento 10 (T10). k Tratamento 11 (T11). l Tratamento 12 (T12). m Tratamento 13 (T13). n Tratamento 14 (T14). o Tratamento 15 (T15). p Tratamento 16 (T16). q Tratamento 17 (T17). r Tratamento 18 (T18). As setas indicam os cristais de lactose.

4.3.3.4 Análises das quantidades de Cristais/ $22\mu\text{m}^2$ nos tratamentos-padrão dos sorvetes de morango *diet*.

As análises de microscopia dos tratamentos-padrão (sem adição das enzimas), mostram que não houve diferenças estatisticamente significativas entre as médias de todos os tratamentos em nível de 5% de probabilidade pelo teste Dunn (não paramétrico), exceto para os tratamentos TP4, TP11 e TP15, que apresentaram diferenças entre as médias de todos os tratamentos em nível de 5% de probabilidade.

Os resultados obtidos indicam que houve crescimento de cristais em todos os tratamentos-padrão, à exceção dos tratamentos-padrão TP4, TP11 e TP15 (tabela 7 e figura 16 b, k, o) que apresentaram formação de bolha de ar com formato esférico, pequenos glóbulos de gordura isolados ou aglomerados e concentração de amontoados de cristais pequenos, de formato predominantemente irregular, retangular ou poligonal (figura 16).

Podemos concluir que durante a fabricação desses tratamentos não ocorreram variações de temperatura, principalmente do congelamento ao armazenamento, o que pode ter impedido a formação de cristais maiores.

A qualidade final de um sorvete, particularmente a textura refinada e a sensação de frescor percebida pelo consumidor, depende dos fatores envolvidos no processo de fabricação, da temperatura do congelamento, que é o principal responsável pela estabilização da emulsão formada durante a incorporação de ar à massa do sorvete; da formulação; da sua estrutura, que é definida principalmente pela distribuição, pelo tamanho e pela morfologia das bolhas de ar e dos cristais (HARTEL, 1999).

O processo de congelamento tem seu início na sorveteira produtora, onde o ar é incorporado durante o processo de bateção; quando a calda do sorvete está sendo batida, na superfície metálica do tambor da sorveteira formam-se cristais, que são raspados e incorporados ao meio (COSTA, 2006; GOFF, 2008).

As imagens dos tratamentos TP4, TP11 e TP15 (tabela 7 e figura 16 b, k, o) mostram baixa quantidade de cristais, o que pode ter ocorrido porque no tambor da sorveteira as condições necessárias para a formação de novos núcleos de cristais não foram plenamente atingidas.

Um dos pontos críticos que podem também ser considerados nesta análise se refere à nucleação primária e secundária. Durante a nucleação primária, os cristais são formados por colisão cristal-cristal, gerando pequenos agregados de cristais que formam núcleos que tendem

a atingir um raio crítico, originando núcleos para uma nucleação secundária (GOFF, 2003).

Outro ponto que pode afetar a formação de cristais está relacionado com a estabilização da emulsão do sorvete após ser retirado da sorveteira apresentando uma consistência semi-sólida com mais da metade da água congelada; o processo de congelamento será completado durante o armazenamento em temperaturas abaixo de $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$ (COSTA, 2006).

Entretanto, nos demais tratamentos, todos apresentaram crescimento de cristais (tabela 7). Durante o congelamento e/ou armazenamento podem ter ocorrido oscilações de temperatura, resultando em derretimento parcial seguido de recristalização.

Segundo Goff (2007), pequenas taxas de calor que atingem os sorvetes durante a processamento e estocagem são suficientes para o crescimento de cristais ou são responsáveis pelo processo de recristalização, que podem conferir um aspecto arenoso, frequentemente encontrado em sorvetes de baixa qualidade.

Tabela 7 - Dados comparativos entre as médias (\pm desvio padrão) das quantidades de cristais em $22.489\mu\text{m}^2$, considerando os tratamentos-padrão dos sorvetes de morango *diet* sem adição das enzimas lactase e transglutaminase em diferentes temperaturas.

Tratamentos Padrão	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Quantidade de Cristais/ $22\mu\text{m}^2$
TP1	20	$10,00 \pm 0,00^{\text{a}}$
TP2	40	$10,00 \pm 0,00^{\text{a}}$
TP3	20	$10,00 \pm 0,00^{\text{a}}$
TP4	40	$00,17 \pm 0,51^{\text{d}}$
TP5	20	$10,00 \pm 0,00^{\text{a}}$
TP6	40	$10,00 \pm 0,00^{\text{a}}$
TP7	20	$10,00 \pm 0,00^{\text{a}}$
TP8	40	$6,61 \pm 3,06^{\text{bc}}$
TP9	30	$10,00 \pm 0,00^{\text{a}}$
TP10	30	$9,67 \pm 0,99^{\text{a}}$
TP11	30	$0,47 \pm 1,84^{\text{cd}}$
TP12	30	$10,00 \pm 0,00^{\text{a}}$
TP13	13	$10,00 \pm 0,00^{\text{a}}$
TP14	47	$10,00 \pm 0,00^{\text{a}}$
TP15	30	$8,53 \pm 2,26^{\text{ab}}$
TP16	30	$10,00 \pm 0,00^{\text{a}}$
TP17	30	$10,00 \pm 0,00^{\text{a}}$
TP18	30	$9,94 \pm 0,23^{\text{a}}$

Nota: Letras minúsculas diferentes comparadas verticalmente indicam diferenças estatisticamente significativas entre as médias, em nível de 5% de probabilidade pelo teste Dunn (não paramétrico). N= 36.

Os resultados das análises de quantidade de cristais nos tratamentos-padrão dos sorvetes de morango *diet* são apresentados na figura 16.

Figura 16 - Fotomicrografias de esfregaço de sorvete de morango *diet* dos tratamentos-padrão TP1 a TP18 sem adição das enzimas lactase e transglutaminase em diferentes temperaturas.

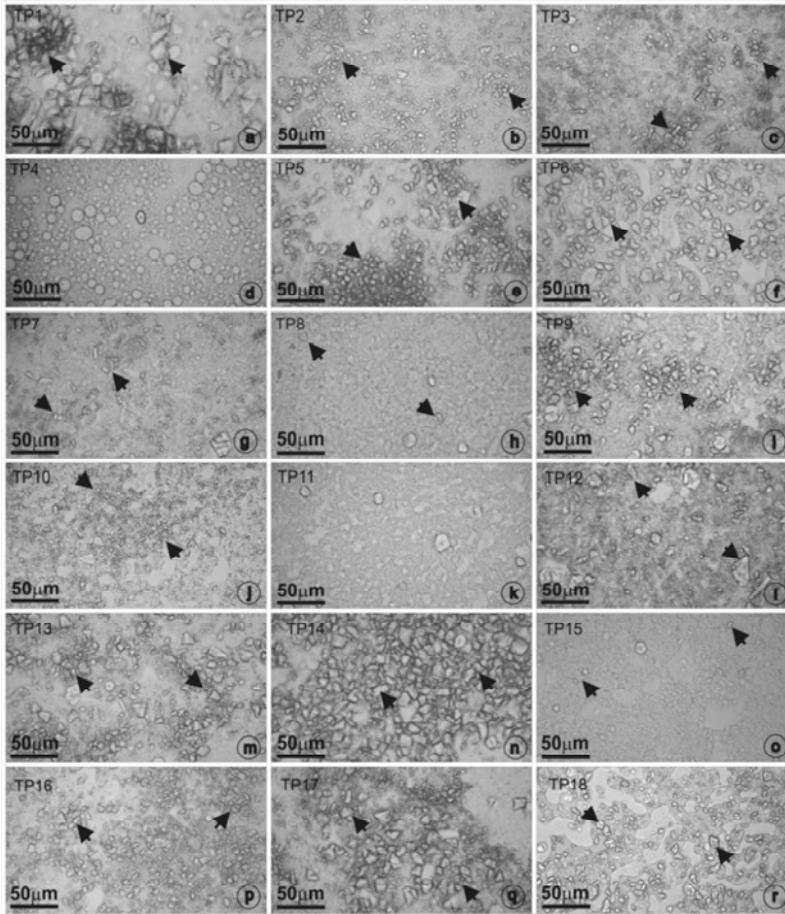


Figura 16a-r Fotomicrografias de esfregaço de sorvete de morango *diet*, sem coloração, nos diferentes tratamentos padrões (sem adição das enzimas) (1 ao 18). a Tratamento padrão 1 (Tp1). b Tratamento padrão 2 (Tp2). c Tratamento padrão 3 (Tp3). d Tratamento padrão 4 (Tp4). e Tratamento padrão 5 (Tp5). f Tratamento 6 (Tp6). g Tratamento padrão 7 (Tp7). h Tratamento padrão 8 (Tp8). i Tratamento padrão 9 (Tp9). j Tratamento padrão 10 (Tp10). k Tratamento padrão 11 (Tp11). l Tratamento padrão 12 (Tp12). m Tratamento padrão 13 (Tp13). n Tratamento padrão 14 (Tp14). o Tratamento padrão 15 (Tp15). p Tratamento padrão 16 (Tp16). q Tratamento padrão 17 (Tp17). r Tratamento padrão 18 (Tp18). As setas indicam os cristais de lactose.

4.3.3.5 Análise das quantidades de cristais/mm² nos tratamentos de sorvetes de morango *diet* com concentrações iguais da enzima lactase, concentrações diferentes da enzima transglutaminase e sem adição das enzimas na temperatura de 40 °C, que foram submetidos a análise de eletroforese.

Os tratamentos TA2, TA4, TA6, TA8 TALC, TAT e TP que foram submetidos a análise de eletroforese foram também submetidos a análise de microscopia para avaliar a quantidade de cristais por área (cristais/ mm²).

Vê-se que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos TA4, TAT e TP. Da mesma forma não houve diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos TA2, TA6, TA8 e TALC (tabela 8).

No entanto, foram encontradas diferenças significativas entre esses dois grupo em nível de 5% de probabilidade pelo teste Dunn (não paramétrico).

Pela análise de ANOVA, utilizada para determinar a quantidade de cristais/mm² nos tratamentos TP, TA4, TA6, TA8, TAT, TALC (figura 18 a, c, d, e, f, g), podemos concluir que houve (***) diferenças estatísticas significativas ($p < 0.0001$) e (**) e não houve diferenças significativas ($p < 0.001$) em todos os tratamentos.

Em termos de contagem do número de cristais, os tratamentos TA4, TAT e TP (tabela 8) não apresentaram diferenças significativas entre si, em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Dunn (não paramétrico).

Nos tratamentos nos quais foram observados cristais predominantemente pequenos (figura 17) na presença de concentração mais alta da transglutaminase e presença de lactase (TA4 c), formaram-se os aglomerados de cristais que não foram observados no tratamento TAT (figura 17 f), no qual apenas foi adicionada a mesma concentração da enzima transglutaminase. Quando comparados com o sorvete padrão sem enzimas fica evidente que o efeito combinado das enzimas favoreceu essa formação.

Patel; Baer e Acharya (2006) observaram que em emulsão de origem láctea, o aumento da concentração de proteínas no meio favorece a formação de pequenos cristais com menores diâmetros médios. Observando a microscopia desses tratamentos, é possível que isso tenha ocorrido, pois Schorsch et al. (2008) verificaram que a ligação de proteínas com transglutaminase afeta a microestrutura do sistema, favorecendo a formação de pequenos agregados unidos que permanecem

intactos em condições de estocagem e impedem que a água saia da estrutura do gel, inviabilizando a sua mobilização para formar grandes cristais.

O fortalecimento da rede proteica produz uma emulsão uniforme e estável, que diminui a formação de grandes cristais durante o armazenamento do sorvete (TANG; YANG; 2007).

No tratamento TP observa-se a formação de cristais na amostra de tamanho médio (figura 17 a). Esses cristais podem ter crescido devido a oscilações de temperatura durante o processamento e ou armazenamento. Fenômenos físicos, como a troca térmica da amostra com o ambiente, variação da temperatura, influência da gravidade, densidade e ou viscosidade afetam a estrutura do sorvete, promovendo a formação de cristais. É o que pode ter ocorrido nesse tratamento (COSTA, 2006; GOFF; 2008).

Nos tratamentos TA2, TA6 e TA8 (tabela 8 e figura 17 b, d, e) o exame microscópico detectou a presença de inúmeras bolhas de ar, grande quantidade de glóbulos de gordura e de micelas de caseína ou proteínas desnaturadas, indicando polimerização das proteínas pela enzima transglutaminase, formando ligações cruzadas firmes, impedindo a movimentação da água na rede tridimensional e impedindo a formação de cristais.

A incorporação de ar durante o processamento gera aumento do volume do produto em relação à calda. As bolhas de ar formadas são envolvidas por gorduras e por proteínas lácteas e definem a estrutura do produto final, proporcionando ao sorvete maior estabilidade da espuma e maior textura, evitando a formação de cristais (SOFJAN. HARTEL, 2004, SOUKOULIS. CHANDRINOS, TZIA, 2008, CRUZ et al., 2009, AKHTAR et al., 2009).

É importante esclarecer que a temperatura de incubação desses tratamentos (40 °C), próxima à temperatura ótima das enzimas lactase e transglutaminase, propiciou as condições adequadas para a atividade enzimática. Estudos indicam que a incubação da β - e da κ -caseína com transglutaminase levou à formação de ligações intramoleculares nas micelas de caseína, efeito esse mais pronunciado no κ -caseína (KRUIF et al., 2002). Convém salientar que a maior reatividade das κ -caseínas deve-se a sua localização na superfície da micela, e também porque os macropeptídios das κ -caseínas são muito acessíveis ao ataque da transglutaminase (RODRIGUEZ-NOGALES, 2005), promovendo a formação de uma rede proteica mais firme.

No tratamento TALC (tabela 8 e figura 17 g) não houve perceptível formação de cristais. Nesse caso, a hidrólise da lactose pela

enzima lactase aumentou a concentração de sólidos totais (proteínas), evitando a movimentação e a disponibilidade da água livre formando uma rede tridimensional mais firme, com presença de bolhas de ar, grande quantidade de glóbulos de gordura e micelas de caseínas.

Os glóbulos de gordura são estáveis em condições estáticas, porém quando se inicia a fase de batimento na sorveteira, a ação de forças cisalhantes sobre a calda base promove a colisão entre os glóbulos de gorduras, favorecendo a ocorrência do fenômeno conhecido como coalescência parcial. Os glóbulos de gordura parcialmente coalescidos controem uma rede semicontínua que estabiliza as bolhas, fortalecendo a rede proteica que produz uma emulsão uniforme e estável, diminuindo a formação de cristais durante o armazenamento, resultando em propriedades benéficas na formação de uma textura mais suave e macia (TANG; YANG; 2007).

Tabela 8 - Dados comparativos entre as médias (\pm desvio padrão) das quantidades de cristais em $22.489 \mu\text{m}^2$, considerando os tratamentos de sorvete de morango *diet* com concentrações iguais da enzima lactase, diferentes concentrações da enzima transglutaminase e sem adição das enzimas na temperatura de $40 \text{ }^\circ\text{C}$, referentes aos tratamentos submetidos a análise de eletroforese.

Tratamentos	(A)	(B)	(C)	Quantidade de Cristais/ $22\mu\text{m}^2$
TP (padrão)	-	-	40	$10,00 \pm 0,00^a$
TA2	0,8	2	40	$0,72 \pm 1,08^b$
TA4	0,8	6	40	$10,00 \pm 0,00^a$
TA6	0,8	6	40	$1,33 \pm 1,45^b$
TA8	0,8	8	40	$1,92 \pm 2,21^b$
TAT	-	2	40	$10,00 \pm 0,00^a$
TALC - controle	0,8	-	40	$0,22 \pm 0,54^b$

Nota: Letras minúsculas diferentes comparadas verticalmente indicam diferenças estatisticamente significativas entre as médias, em nível de 5% de probabilidade pelo teste Dunn (não paramétrico). N= 36. (A) enzima lactase (g/L), (B) enzima Transglutaminase (U/g proteína), (C) Temperatura ($^\circ\text{C}$).

Figura 17 - Fotomicrografias de esfregaço de sorvete de morango *diet* nos tratamentos TP, TA2, TA4, TA6, TA8, TAT e TALC com concentrações iguais da enzima lactase, diferentes concentrações da enzima transglutaminase e sem adição das enzimas na temperatura de 40 °C.

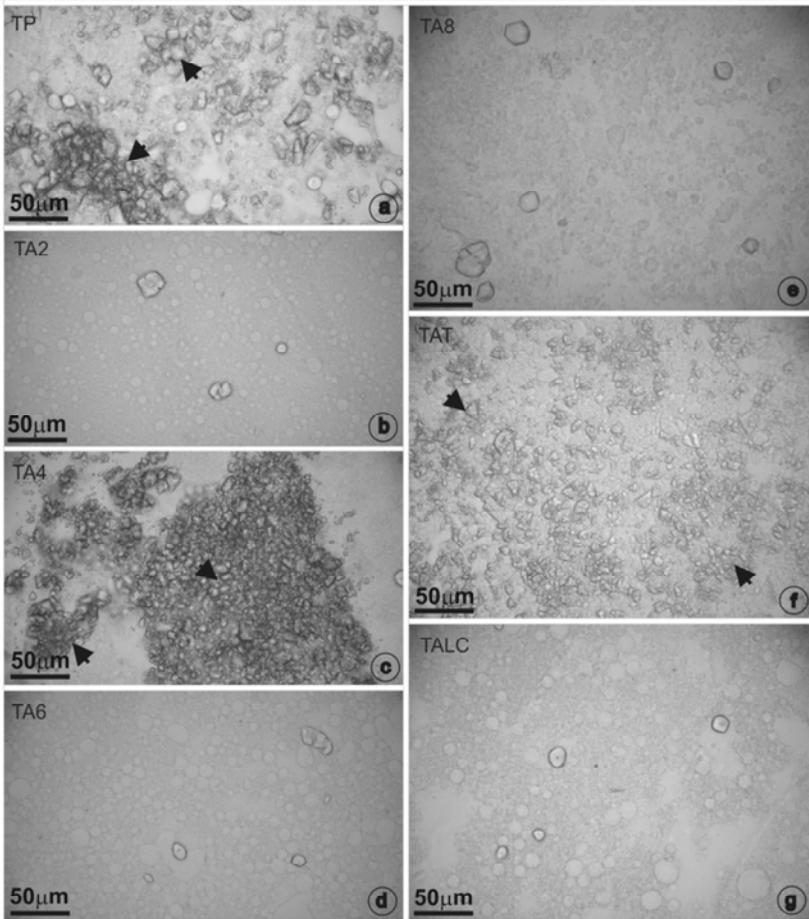
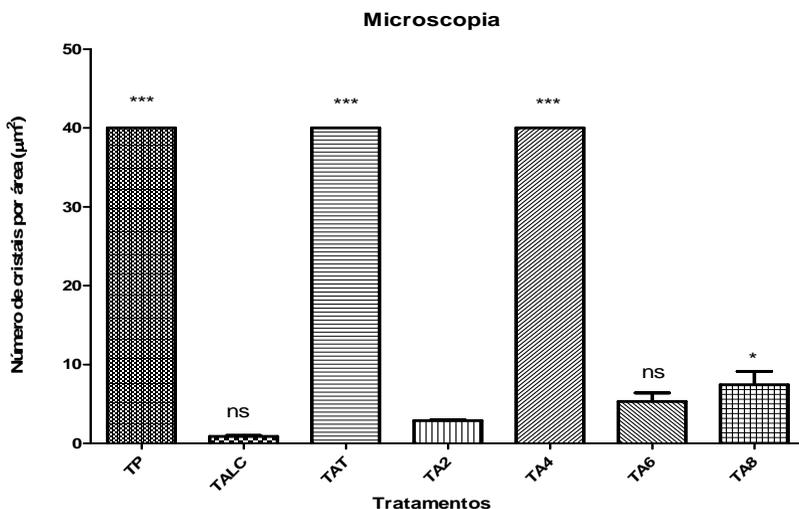


Figura 17a-g Fotomicrografias de esfregaço de sorvete de morango *diet*, sem coloração, nos diferentes tratamentos (TP, TA2, TA4, TA6, TA8, TAT e TALC) escolhidas pelas análises de eletroforese. a Tratamento TP. b Tratamento TA2. c Tratamento TA4. d Tratamento TA6. e Tratamento TA8. f Tratamento TAT. g Tratamento TALC. As setas indicam os cristais de lactose.

Figura 18 – Gráfico da análise das análises estatísticas das quantidades de cristais (cristais/mm²) para os tratamentos TA4, TA6, AA8, TALC, TAT e TP referentes a concentrações iguais da enzima lactase, diferentes concentrações da enzima transglutaminase e sem adição das enzimas na temperatura de 40 °C.



4.4 CONCLUSÃO

A polimerização das proteínas do sorvete no tratamento TA2 foi efetiva nas concentrações de 2 U/g proteína da enzima transglutaminase combinadas com concentrações de 0,4 g/L da enzima lactase sob a temperatura de 40 °C e promoveu a formação de bandas no tratamento TA2 de 45 kDa (29,70 %) e 60 kDa (31,72 %), conforme avaliado por eletroforese (SDS-PAGE).

A formação de bandas contendo polímeros de maior massa molecular evidencia que houve ligações cruzadas entre as proteínas do leite pela ação da enzima transglutaminase que promoveu a aglomeração

das proteínas observadas nas bandas de eletroforese, que não foram observadas nos sorvetes preparados sem a adição das enzimas.

A melhor hidrólise da lactase foi obtida com concentrações menores de enzima lactase e transglutaminase na temperatura de 40 °C.

A combinação das duas enzimas (transglutaminase e lactase) favoreceu a polimerização das proteínas, porquanto a hidrólise provocada pela enzima lactase, aumentou o teor de sólidos totais do meio, favorecendo a formação de uma rede proteica mais firme, uniforme e estável, que resultou em propriedades que favoreceram as características de palatabilidade, cremosidade e textura fina.

Todos os tratamentos preparados na temperatura de 40 °C (T2, T6, e T8) e tratamento TA2 (com formulação igual ao tratamento T2), apresentaram pequenas quantidades de cristais, associadas a uma grande presença de bolhas de ar, glóbulos de gorduras e provavelmente algumas micelas de caseína, que são condições ideais para aglomerar pequenos cristais, que formam uma textura mais firme, macia e coesa.

Portanto, o conjunto dos efeitos dessas enzimas combinadas nas formulações provou ser uma tecnologia viável, eficiente e de fácil execução durante a produção do sorvete.

Adicionalmente, o uso da metodologia da superfície de resposta foi eficiente na seleção da formulação com melhores características de desejabilidade, o que confirma sua aplicabilidade no desenvolvimento de formulações de sorvetes.

No entanto, os resultados da análise sensorial demonstraram que o sorvete apontado como o de maior desejabilidade não obteve a aceitação esperada quando submetido à avaliação sensorial humana, com relação aos atributos cor, doçura, sabor, textura e maciez. Isto deve

ser a falta de ajustado modelo que levou á uma seleção de desejabilidade não ideal.

A utilização de concentrado proteico de soro, um subproduto da indústria láctea, provou ser adequado para desenvolver as formulações, tornando-as mais nutritivas e de mais baixo custo, agregando valor (econômico, nutricional e funcional) ao sorvete.

O uso do edulcorante sucralose/acessulfame-k associado com a ausência da lactose, propiciada pela ação da enzima lactase, demonstrou sua potencialidade para desenvolver um sorvete voltado para consumidores com restrições calóricas ou nutricionais.

A produção dessa formulação evidenciou melhora nas qualidades desejáveis em um sorvete, tornando-o mais nutritivo, de baixo valor calórico, saudável e funcional, além de poder melhorar aspectos relacionados à saúde e à satisfação do consumidor.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. A.; CHEN, Z.; LANDMAN, P.; COLMER, T. D. Simultaneous determination by capillary gas chromatography of organic acids, sugars, and sugar alcohols in plant tissue extracts as their trimethylsilyl derivatives, **Analytical Biochemistry**, v.11, n. 266, p.77-84, 1999.
- ADAPA, S.; DINGELDEIN, H.; SCHMIDT, K. A.; HERALD, T. J. Rheological properties of ice cream mixes and frozen ice creams containing fat and fat replacers. **Journal Dairy Science**, v. 83, n. 10, p. 2224-2229, 2000.
- AKHTAR, M.; BLAKEMORE, I.; CLAYTON, G.; KNAPPER, S. The use of spinning disc reactor for processing ice cream base – effect of ageing in making model ice cream. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, n. 6, p. 1139-1145, 2009.
- ALVAREZ, V. B.; WOLTERS, C. L.; VODOVOTZ, Y.; JI, T. Physical properties of ice cream containing milk protein concentrates. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, n. 3, p. 862-871, 2005.
- ALOMIRAH, H. F.; ALLI, I. Separation and characterization of β -lactoglobulin and α -lactalbumin from whey and whey protein preparations. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 411-419, 2004.
- ANDRADE, A. C. **Estudo da fermentação simultânea á hidrólise, de soro de queijo, utilizando lactase e *Saccharomyces cerevisiae***. 2005, 97f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, 2005.
- BARTOLOZZI, F.; BERTAZZA, G.; BASSI, D.; CRISTOFERI, G. Simultaneous determination of soluble sugars and organic acids as their trimethylsilyl derivatives in apricot fruits by gás-liquid chromatography, **Journal of Chromatography Analytical**, n. 758, v.10, p. 99-102, 1997.
- BERGER, K.G. Ice cream. In: LARSSON, K. e FRIBERG, S. **Food emulsions**. New York, Marcel Dekker Inc., p. 413-489, 1997.

BONISCH, M. P; LAUBER, S; KULOZIK, U. Improvement of enzymatic cross-linking of casein micelles with transglutaminase by glutathione addition. **International Dairy Journal**, 17, 3-11, 2007.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analyse. Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 22. Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. **Diário Oficial da União, República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 abr. 2003a.

BRASIL Ministério da Agricultura Agência de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 266, de 22 de setembro de 2005. Aprova o regulamento de gelatos comestíveis e preparados para gelados comestíveis. Diário Oficial [da] **República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 de set. 2005.

CAMPOS T. C. A. S.; D'ALMEIDA W. K.; ARAGON-ALEGRO, L. C.; ROIG, S. M.; SUGUIMOTO H. H. Utilização da β -Galactosidase na hidrólise da lactose do leite em baixa, **Revista Ciências Biológicas da Saúde**, v.11, n. 4, p. 51-54, 2009.

CARMINATTI, C. A. **Ensaio de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando beta-galactosidase *Kluyveromyces lactis***. 79p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC. 2001.

CARNEIRO, C. S.; CAL-VIDAL, J. Estruturação de cristais de gelo em soluções aquosas contendo solutos diversos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.2, p.423-432, 2000.

CASTRO, A. J. P.; FRANCO, L. J. Caracterização do consumo de adoçantes alternativos e produtos *dietéticos* por indivíduos diabéticos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, São Paulo, v. 46, n. 3, p. 280-287, 2002.

COSTA, F. F. **Efeitos de aditivos na cristalização de sorvetes**, 2006. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2006.

CHANG, Y.; HARTEL, R.W. Development of air cells in a batch ice cream freezer. **Journal of Food Engineering**, v.55, p.71-78, 2002.

CHÁVEZ-SERVÍN, J. L.; CASTELLOTE, A. I.; LÓPEZ-SABATE, M. C. Analysis of mono- and disaccharides in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography with refractive index detection. **Journal of Chromatography Analyse**, 1043, 211-215, 2004.

CHRISTENSEN, et al. Localization of potencial transglutaminase cross-linking sites bovine caseins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p.1943-1947, 1996.

CLARKE, C. **The science of ice cream**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 187p, 2005.

CRUZ, A. G.; ANTUNES, A. E. C.; SOUZ, A. I. O. P.; FARIA, J. A. F.; SAAD, S. M. F. Ice cream as a probiotic food carrier. **Food Research International**, v. 42, n. 9, p. 1233-1239, 2009.

DAMODARAN, S., PARKIN, K. L., FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**, 4^a. Ed., 2010, Porto Alegre, ARTMED, 900p.

DRUZIAN, J. I.; DOKI, C.; SCAMPARINI, A. R. P. Determinação simultânea de açúcares e polióis por cromatografia líquida de alta eficiência (Clac-Ir) em sorvetes de baixas calorias ("*diet*"/ "*light*"), **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 2, p. 79-284, 2005.

ECHLIN, P. **Low-Temperature Microscopy and Analysis**. New York : Plenum, 1992. 539p.

EISSA, A. S.; BISRAM, S.; KHAN, S. A. Polymerization and gelation of whey protein isolates at low pH using transglutaminase enzyme. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 52, p. 4456-4464, 2004.

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

FAERGEMAND, M.; OTTE, J.; QVIST, K. B. Emulsifying properties of milk proteins crosslinked with microbial transglutaminase. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 715-723, 1998.

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

FERNÁNDEZ, P. P.; OTERO, L.; MARTINO, M. M.; MOLINA-GARCÍA, A. D.; SANZ, P.D. High-pressure shift freezing: recrystallization during storage. **European Food Research Technology**, v. -227, n. 5, p. 1367-1377.

FLORES, A. A.; GOFF, H. D. Ice crystal size distributions in dynamically frozen model solutions and ice cream as affected by stabilizers. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 82, n. 7, p. 1399-1407, 1999.

GARZA, S.; GINER, J.; MARTÍN, O.; COSTA, E.; IBARZ, A. Color, Sugars and the HMF evolution during thermal –treatment of apple juice, **Food Science. Technology. International**, v. 2, n. 2, 101-110. 1996.

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

GOFF, H. D. Colloidal aspects of ice cream. **Journal Dairy Science**, v.7, p. 363- 373, 1997.

GOFF, H. D.; VERESPEJ, E.; SMITH, A. K. A. study of fat and air structures in ice cream. **International Dairy Journal**, v. 9, 817-829, 1999.

GOFF, H. D. Formation and stabilization of structure in ice-cream and related products. **Current Opinion in Collid and Interfac Science**, v.7, n. 5-6, p. 432-437, 2002.

GOFF, H. D. Ice cream. In: _____. **Advanced dairy chemistry**. 3.ed. [Sill.: s.n] 2003. Cap. 24, v. 1, p.1063-1085.

GOFF, H. D. **Structure of ice cream**: Dairy Science and Technology website. Disponível em: <[http:// www.foodsci.uoguelph.ca/dairyedu/icstructure.html](http://www.foodsci.uoguelph.ca/dairyedu/icstructure.html)>. Acesso em: 12 out. 2005.

GOFF, H. D. **Ice cream**. FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Advanced Dairy Chemistry**, v. 2, 3, ed. New York: Springer Science/Business Média, 2006. P. 441-450.

GOFF, H.; DAVIDSON, V. J.; CAPPI, E. Viscosity of ice cream mix at pasteurization temperatures. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n.8, p. 2207-2213, 2007

GOFF, H. D. 65 years of ice cream science. **International Dairy Journal**, v.18, 754-758, 2008.

GOFF, H. D. **Dairy Science and Technology Education**, University of Guelph, Canadá. Disponível em: <http://www.foodsci.uoguelph.ca/dairyedu/icstructure.htm> . Acesso em: 26 de outubro de 2012.

GRANGER, C.; LEGER, A.; BAREY, P.; LANGENDORFF, V.; CANSELL, M. Influence of formulation on the structural networks in ice cream. **International Dairy Journal**, Barking, v. 15, n. 3, p. 255-262, 2005.

HAN, X-D.; DAMODARAN, S. Thermodynamic compatibility of substrate proteins affects their crosslinking by transglutaminase. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 44, p. 1211-1217, 1996.

HARTEL, R. W. Ice crystallization during the manufacture of ice cream. In: **Trends in Food Science & Technology**, v.7, p.315-320, 1996.

HILLER, B.; LORENZEN, P. C. Effect of phosphatase/transglutaminase treatment on molar mass distribution and

techno-functional properties of sodium caseinate. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 1, p.87-92, 2009.

HUPPERTZ, T.; KRUIF, C. G. Rennet-induced coagulation of enzymatically cross-linked casein micelles. **International Dairy Journal**, v.17, n.5, p. 442-447, 2007.

INOUE, et al. Modeling of the effect of freezer conditions on the hardness of ice cream using response surface methodology. **Journal of Dairy Science**, Champaign, V. 92, n. 12, p. 5834-5842, Dec. 2009.

IVERSON, J. L.; BUENO, M. P. Sugars and sugar products evaluation of high-pressure liquid chromatography and gas-liquid chromatography for quantitative determination of sugars in foods. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, v. 1, n. 64, p. 139-143, 1981.

JAROS, D.; JACOB, M.; OTTO, C.; ROHM, H. Excessive cross-linking 583 of caseins by microbial transglutaminase and its impact on physical 584 properties of acidified milk gels. **International Dairy Journal**, v. 20, 321-327. 2010.

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

KRUIF, C. G.; TUINIER, R.; HOLT, C.; TIMMINS, P. A.; ROLLEMA, H. S. Physicochemical study of β - and κ -casein dispersions and the effect of cross-linking by transglutaminase. **Langmuir**, v. 18, p. 4885-4891, 2002.

KUS, S.; ALTAN, A.; KAYA, A. Rheological behavior and time-dependent characterization of ice cream mix with different salep content. **Journal of Texture Studies**, v. 36, p. 273-288, 2005.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAL, S. N. D.; O'CONNOR, C. J.; EYRES, L. Application of emulsifiers/stabilizers in dairy products of high rheology. **Advance in Colloid and Interface Science**, v. 123-126, p. 433-437, 2006.

LEANDRO, E. S.; PAULA, R. A.; CARVALHO, A. F.; BRANDÃO, S. C.; MORAES, C. A. Sobrevivência de *Lactobacillus delbrueckii* UVF H2b20 em sorvete. **Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, n. 1, p. 300-303, 2006.

LI, H. X.; DING, M. Y.; YU, J. Y. Simultaneous determination of p-hydroxybenzaldehyde, p-hydroxybenzyl alcohol, 4-(beta-D-glucopyranosyloxy)-benzyl alcohol, and sugars in *Gastrodia elata* blume measured as their acetylated derivatives by GC-MS, **Journal Chromatography Science**, v. 6, n. 39, p. 251-4, 2001.

LONGO, G. **Influência da adição de lactase na produção de iogurtes**, 2006. 89f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

LORENZEN, P. C.; SCHILIMME, E.; ROOS, N. Crosslinking of sodium caseinate by a microbial transglutaminase, **Nahrung**, v. 42, p. 151-154, 1998.

MACEDO, J. A.; SATO, H. H. Propriedades e aplicações da transglutaminase microbiana em alimentos. **Revista Alimentos & Nutrição**, v. 16, n.4, p.413-419, 2005.

MACEDO, J. A. **Produção, purificação, caracterização e aplicação de transglutaminase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837**. 2009, 171f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, SP, 2009.

MATSUMURA, Y.; LEE, D-S.; MORI, T. Molecular weight distributions of α -lactalbumin polymers formed by mammalian and microbial transglutaminases. **Food Hydrocolloids**, v. 14, p. 49-59, 2000.

MESICH, J. Decisions, decisions, decisions. **Candy Industry**, New York, v. 171, n. 2, p. 32-33, 2006.

METWALLY, A. M. M. E. Effect of enzymatic cross-linking of milk proteins on properties of ice cream with different composition. **International Journal of Food Science and Technology**, 42, 939-947, 2007.

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

MUSE, M. R.; HARTEL, R. W. Ice cream structural elements that affect melting rate and hardness. **Journal Dairy Science**, v. 87, n. 1, p. 1-10, 2004.

NAZARUDDIN, R.; SYALIZA, A. S.; ROSNANI, A. I. W. The effect of vegetable fat on the physicochemical characteristics of dates ice cream. **International Journal of Dairy Technology**, v. 61, n. 3, p. 265-269, 2008.

NIEUWENHUIZEN, W. F.; DEKKER, H. L.; DE KONING, L. J.; GRONEVELD, TOOS.; DE KOSTER, C. G.; DE JONG, G. A. H. Modification of glutamine and lysine residues in holo and apo α -lactalbumin with microbial transglutaminase. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, n. 24, p. 7132-7139, 2003.

NOJIRI, S.; SAITO, K., TAGUCHI, N.; OISHI, M.; MAKI, T. Liquid chromatographic determination of sugar alcohols in beverages and foods after nitrobenzoylation. **Journal of Association of Official Analytical Chemistry**, v. 1, n. 82, p. 134-40, 1999.

OLIVEIRA, C. C. M. **Produção de β -galactosidase por levedura recombinante** - Desenvolvimento de um sistema de produção estável. 2005, 100f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade do Minho, Braga, 2005.

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

PATEL, D. **Gel Electrophoresis - Essencial Data**. Editora Jonh Wiley e Sons, p. 1-15, 1994.

PATEL, M. R.; BAER, R. J; ACHARYA, M. R. Increasing the Protein Content of IceCream. **Journal of Dairy Science**, v.89, p. 1400-1406, 2006.

PETZOLD, G; AGUILERA, J. M. Ice morphology: Fundamentals and technological applications in foods. **Food Biophysics**, v. 4, n. 4, 378-396, 2009.

PINTERITS, A.; ARNTFIELD, S. D. Improvement of canola protein gelation properties through enzymatic modification with transglutaminase. **LWT - Food Science and Technology**, v, 41, n.1, 128-38, 2008.

REGAND, A; Goff, H. D. Structure and ice recrystallization in frozen stabilized ice cream model systems, **Food Hydrocolloids**, v. 17, n.1, p. 95-02, 2006.

SHARMA, R.; LORENZEN, P; G.; QVIST, K, B. Influence of transglutaminase treatment of skim milk on the formation of ϵ -(γ -glutamyl)Lysine) and the susceptibility of individual proteins towards crosslinking, **International Dairy Journal**, v. 11, n. 10, p. 785-783, 2001.

SAKAMOTO, H.; KUMASAWA, Y.; MOTOKI, M. Strength of protein gels prepared with microbial transglutaminase as related to reaction conditions. **Journal of Food Science**, v. 59, n. 4, 866-871, 1998.

SANTIAGO, P. A.; MARQUEZ, L. D. S.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 567-572, 2004.

SILVA, D. O.; CARDOSO, V. L. Hidrólise da lactose do soro de queijo utilizando a enzima β galactosidase.

Disponível em:

[http://www.propp.ufu.br/revistaeletronica/edicao2004/exatas/hidrolies_da_lactose.p DF](http://www.propp.ufu.br/revistaeletronica/edicao2004/exatas/hidrolies_da_lactose.pDF)>. Acesso em: 26 fev. 2007.

SINGH, H.; CREAMER, L. K. Heat stability of milk. **Advances Dairy Chemistry I - Proteins**, ed. Elsevier Applied Science Publishers, London UK, p. 621-656, 1992. *In*:

STANLEY, D. W.; GOFF, H. D. SMITH, A. K. Texture-structure relationships in foamed dairy emulsions. **Food Research International**, v29, n. 1, p. 1-13, 1996

RODRIGUEZ-NOGALES, J. M. Enhancement of transglutaminase-induced protein cross-linking by preheat treatment of cows' milk: a statistical approach. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 1, 26-32, 2006.

SOFJAN, R. P.; HARTEL, R. W. Effects of *overrun* on structural and physical characteristics of ice cream. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 3. P. 255-262, 2004.

SOULOULIS, C.; CHANDRINOS, I.; TZIA, C. Study of the functionality of selected hydrocolloids and their blends with κ -carrageenan on storage quality of vanilla ice cream. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 10, p. 1816-1827, 2008.

SHI, Q.; JACKOWSKI, G. **One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis**. In: Hames, B.D. Gel Electroforesis of Proteins. Oxford University Press, p. 1-52, 1998.

TANG, C. H.; M. A, C. Y. Modulation of the thermal stability of β -lactoglobulina by transglutaminase treatment. **European Food Research Technology**, v. 225, n. 5-6, p.649-652, 2007.

TOLKACH, A.; KULOZIK. Fractionation of whey proteins and caseinomacropetide by means of enzymatic cross inking and membrane separation techniques. **Journal Food Engineering**, v. 67, n. 1-2, p. 13-20, 2005.

VEJA, C.; GOFF, H. D. Phase separation in soft-serve ice cream mixes: rheology and microstructure. **International Dairy Journal**, v. 15, n.3, p.249-254, 2005.

VINHAL, E. F. **Hidrólise da lactose no leite por β -galactosidase de *Kuyveromyces fragilis***. 2001. 100 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, 2001.

WANG, J. S.; ZHAO, M.M.; YANG, X. Q.; JIANG, Y. M.; CHUN, C. Gelation behavior of wheat gluten by heat treatment followed by

transglutaminase cross-linking reaction. **Food Hydrocolloids**, v. 2, n. 2. P. 174-179, 2007.

WATHESED, J. J.; KRAMER, P. L. Analysis of sugar in milk and ice cream by High pressure liquid chromatography., **Journal of Food Science**, v. 2, n. 44, p. 626-627, 1979.

YOKOYAMA, K.; NIO, N.; KIKUCHI, Y. Properties and applications of microbial Transglutaminase. **Applications in Microbiological biotechnology**, v. 64, n. 4, p. 447-454, 2004.

ZHANG, Z.; GOFF. H. D. On fat destabilization and composition of the air interface in ice cream containing saturated and unsaturated monglyceride. **International Dairy Science**, v. 15, n. 5, p. 495-500, 2003.

5. CONCLUSÃO FINAL DA TESE

O conjunto dos efeitos dessas enzimas combinadas nas formulações provou ser uma tecnologia viável, eficiente e de fácil execução durante a produção do sorvete. A formulação ideal se apresenta com alto *overrun*, menor textura, baixa taxa de derretimento, sem formação de cristais, boa coloração, formação de ligações cruzadas, sem contaminações microbiológicas e com 80 % de índice de aceitação. Os parâmetros para uma formulação ideal de sorvete é apresentado na figura 1.

Figura 1 - Parâmetros para formulação ideal de sorvete



6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

6.1 PERSPECTIVAS

Após a conclusão deste trabalho sugere-se a realização de estudos futuros buscando:

- elaborar formulações de sorvetes contendo prebióticos e probióticos;
- otimizar a produção de sorvete em escala industrial;
- empregar polpa de frutas como ingrediente na elaboração da massa;
- realizar testes em vivo para avaliar a funcionalidade do sorvete, empregando ensaios com modelo animal de obesidade e diabetes;
- elaborar formulações de sorvete fortificado com vitaminas e minerais;
- Deslocamento dos pontos para região máximo e mínimo das variáveis de interesse;
- Avaliar as propriedades reológicas dos sorvetes, em temperaturas distintas e caracterizar o seu comportamento através de ajuste aos modelos reológicos de Bingham, Casson, Herschel-Bulkley, Ostwald de Waele e Lei da Potência;
- Avaliar a estabilidade do produto final durante o armazenamento.

6.2 AGRADECIMENTOS

Pelo apoio financeiro, agradecemos às indústrias Frimesa; Alibra - Sooro; Kerry do Brasil; Candon Aditivos para Alimentos Ltda e Gemacon.

Pelo apoio para a realização deste trabalho, agradecemos à Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Medianeira - PR (UTFPR) e à Universidade Federal de Santa Catarina - SC (UFSC).

APÊNDICES

APÊNDICE A - Ficha para avaliação

Ficha para avaliação escala do ideal utilizada para comparar as cinco formulações de sorvete de morango *diet*.

FICHA PARA AVALIAÇÃO SENSORIAL DE SORVETE

Nome: _____ idade _____

Sexo _____

Você está recebendo cinco amostras codificadas. Avalie cada uma, da esquerda para direita, colocando-as em ordem de preferência. Entre a degustação das amostras, lave sua boca com a água fornecida.

Código:
 primeira segunda terceira quarta quinta
 (mais preferida) (menos preferida)

Indique a seguir o quão ideal está cada amostra em relação à doçura, de acordo com sua preferência utilizando a escala abaixo:

- (1) muito menos doce do que o ideal
- (2) menos doce do ideal
- (3) ideal
- (4) mais doce que o ideal
- (5) muito mais doce que o ideal

Código	Avaliação
238	
621	
847	
186	
374	

Comentários _____

APÊNDICE B - Ficha para avaliação

Ficha para avaliação escala hedônica utilizada para comparar as duas formulações de sorvete de morango *diet* II (F-LP e F-CPSs).

FICHA PARA AVALIAÇÃO HEDÔNICA de Sorvete

Nome: _____ idade _____ Sexo _____

VOCÊ ESTÁ RECEBENDO AMOSTRAS DE SORVETES, AVALIE OS DOIS TIPOS, DA ESQUERDA PARA A DIREITA, DE ACORDO COM A SUA PREFERÊNCIA E COM BASE NOS ATRIBUTOS SOLICITADOS NA TABELA E NA ESCALA HEDÔNICA ABAIXO: ENTRE A DEGUSTAÇÃO DAS AMOSTRAS, LAVE SUA BOCA COM A ÁGUA FORNECIDA.

- 1 – DESGOSTEI MUITÍSSIMO
- 2 – DESGOSTEI MUITO
- 3 – DESGOSTEI REGULARMENTE
- 4 – DESGOSTEI LIGEIRAMENTE
- 5 – INDIFERENTE
- 6 - GOSTEI LIGEIRAMENTE
- 7 - GOSTEI REGULARMENTE
- 8 - GOSTEI MUITO
- 9 - GOSTEI MUITÍSSIMO

CÓDIGO DOS SORVETES	CÓDIGO DA AVALIAÇÃO DE ACORDO COM A ESCALA HEDÔNICA APRESENTADA E OS ATRIBUTOS DESCRITOS					
	SABOR	APARÊNCIA	TEXTURA	COR	AROMA	AVALIAÇÃO GLOBAL
418						
245						

SUA AMOSTRA PREFERIDA FOI:

418	
245	

OBS.

OBRIGADO PELA SUA COLABORAÇÃO.

APÊNDICE C - Análise estatística

Efeitos dos Fatores e os coeficientes do modelo de regressão para a variável resposta *overrun* (%), em termos das variáveis escalonadas.

Factor	Effect Estimates; Var.:Overrun (%); R-sq=,93558; Adj:,9224 3 factors, 1 Blocks, 54 Runs; MS Residual=24,46623 DV: Overrun (%)									
	Effect	Std.Err.	t(44)	p	-95, % Cnf.Limt	+95, % Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95, % Cnf.Limt	+95, % Cnf.Limt
Mean/interc.	60,45832	1,425787	42,40347	0,000000	57,58483	63,33180	60,45832	1,425787	57,58483	63,33180
(1)Transglutaminase (U/g)(L)	2,64044	1,545531	1,70844	0,094602	-0,47437	5,75525	1,32022	0,772765	-0,23719	2,87763
Transglutaminase (U/g)(Q)	3,49435	1,605913	2,17593	0,034974	0,25784	6,73085	1,74717	0,802956	0,12892	3,36543
(2)Lactase (g/L)(L)	-3,39485	1,545531	-2,19658	0,033365	-6,50967	-0,28004	-1,69743	0,772765	-3,25483	-0,14002
Lactase (g/L)(Q)	-0,27689	1,605913	-0,17242	0,863901	-3,51339	2,95962	-0,13844	0,802956	-1,75670	1,47981
(3)Temperatura (°C)(L)	38,44200	1,545531	24,87301	0,000000	35,32719	41,55682	19,22100	0,772765	17,66360	20,77841
Temperatura (°C)(Q)	3,14080	1,605913	1,95577	0,056860	-0,09571	6,37730	1,57040	0,802956	-0,04785	3,18865
1L by 2L	-1,91667	2,019333	-0,94916	0,347725	-5,98636	2,15303	-0,95833	1,009666	-2,99318	1,07652
1L by 3L	-3,75000	2,019333	-1,85705	0,070006	-7,81970	0,31970	-1,87500	1,009666	-3,90985	0,15985

APÊNDICE D - Análise estatística

Coefficientes do modelo de regressão para a variável resposta *overrun* (%), em termos das variáveis originais.

ANOVA; Var.:Overrun (%); R-sq=,93558; Adj:,9224 3 factors, 1 Blocks, 54 Runs; MS Residual=24,46623 DV: Overrun (%)					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)Transglutaminase (U/g)(L)	71,41	1	71,41	2,9188	0,094602
Transglutaminase (U/g)(Q)	115,84	1	115,84	4,7347	0,034974
(2)Lactase (g/L)(L)	118,05	1	118,05	4,8249	0,033365
Lactase (g/L)(Q)	0,73	1	0,73	0,0297	0,863901
(3)Temperatura(°C)(L)	15136,45	1	15136,45	618,6669	0,000000
Temperatura(°C)(Q)	93,58	1	93,58	3,8250	0,056860
1L by 2L	22,04	1	22,04	0,9009	0,347725
1L by 3L	84,37	1	84,37	3,4486	0,070006
2L by 3L	7,04	1	7,04	0,2878	0,594329
Error	1076,51	44	24,47		
Total SS	16710,09	53			

APÊNDICE E - Análise estatística

ANOVA para a variável resposta *overrun* (%).

ANOVA; Var.:Overrun (%); R-sqr=,93558; Adj.,9224 3 factors, 1 Blocks, 54 Runs; MS Residual=24,46623 DV: Overrun (%)					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)Transglutaminase (U/g)(L)	71,41	1	71,41	2,9188	0,094602
Transglutaminase (U/g)(Q)	115,84	1	115,84	4,7347	0,034974
(2)Lactase (g/L)(L)	118,05	1	118,05	4,8249	0,033365
Lactase (g/L)(Q)	0,73	1	0,73	0,0297	0,863901
(3)Temperatura(°C)(L)	15136,45	1	15136,45	618,6669	0,000000
Temperatura(°C)(Q)	93,58	1	93,58	3,8250	0,056860
1L by 2L	22,04	1	22,04	0,9009	0,347725
1L by 3L	84,37	1	84,37	3,4486	0,070006
2L by 3L	7,04	1	7,04	0,2878	0,594329
Error	1076,51	44	24,47		
Total SS	16710,09	53			

APÊNDICE F - Análise estatística

Efeitos dos Fatores e os coeficientes do modelo de regressão para a variável resposta textura (N) em termos das variáveis escalonadas.

Effect Estimates; Var.:Textura (N); R-sqr=.4979; Adj:;.39519 3 factors, 1 Blocks, 54 Runs; MS Residual=958,6587 DV: Textura (N)										
Factor	Effect	Std.Err.	t(44)	p	-95, Cnf.Limt	+95, Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95, Cnf.Limt	+95, Cnf.Limt
Mean/Interc.	22,8020	8,92489	2,55487	0,014158	4,8150	40,78891	22,8020	8,924895	4,8150	40,78891
(1)Transglutaminase (U/g)(L)	-25,9690	9,67444	-2,68429	0,010207	-45,4666	-6,47143	-12,9845	4,837222	-22,7333	-3,23572
Transglutaminase (U/g)(Q)	-9,0158	10,05242	-0,89688	0,374664	-29,2751	11,24349	-4,5079	5,026208	-14,6376	5,62175
(2)Lactase (g/L)(L)	11,1762	9,67444	1,15523	0,254231	-8,3213	30,67378	5,5891	4,837222	-4,1607	15,33689
Lactase (g/L)(Q)	-7,7348	10,05242	-0,76944	0,445740	-27,9941	12,52453	-3,8674	5,026208	-13,9970	6,26227
(3)Temperatura (°C)(L)	6,9081	9,67444	0,71405	0,478965	-12,5895	26,40564	3,4540	4,837222	-6,2947	13,20282
Temperatura (°C)(Q)	30,6384	10,05242	3,04786	0,003890	10,3791	50,89769	15,3192	5,026208	5,1895	25,44884
1L by 2L	-27,9822	12,64027	-2,21373	0,032077	-53,4570	-2,50737	-13,9911	6,320136	-26,7285	-1,25369
1L by 3L	-14,3348	12,64027	-1,13406	0,262910	-39,8096	11,13996	-7,1674	6,320136	-19,9048	5,56998
2L by 3L	49,3370	12,64027	3,90316	0,000322	23,8622	74,81178	24,6685	6,320136	11,9311	37,40590

APÊNDICE G - Análise estatística

Coefficientes do modelo de regressão para a variável resposta textura (N), em termos das variáveis originais.

Factor	Regr. Coefficients; Var.:Textura (N); R-sq=,4979; Adj:,39519 3 factors, 1 Blocks, 54 Runs; MS Residual=958,6587 DV: Textura (N)					
	Regressn Coeff.	Std.Err.	t(44)	p	-95.% Cnf.Limt	+95.% Cnf.Limt
Mean/Interc.	201,7445	107,8193	1,87114	0,067985	-15,551	419,0401
(1)Transglutaminase (U/g)(L)	-34,2613	16,9307	2,02362	0,049109	0,140	68,3829
Transglutaminase (U/g)(Q)	-1,1270	1,2566	-0,89688	0,374664	-3,659	1,4054
(2)Lactase (g/L)(L)	-86,1544	190,5342	-0,45217	0,653366	-470,151	297,8421
Lactase (g/L)(Q)	-96,6847	125,6552	-0,76944	0,445740	-349,826	156,5567
(3)Temperatura(°C)(L)	-14,8132	3,8107	-3,88727	0,000338	-22,493	-7,1332
Temperatura(°C)(Q)	0,1532	0,0503	3,04786	0,003890	0,052	0,2545
1L by 2L	-34,9777	15,8003	-2,21373	0,032077	-66,821	-3,1342
1L by 3L	-0,3584	0,3160	-1,13406	0,262910	-0,995	0,2785
2L by 3L	12,3343	3,1601	3,90316	0,000322	5,966	18,7029

APÊNDICE H - Análise estatística

ANOVA para a variável resposta textura (N).

ANOVA: Var.:Textura (N); R-sqr=,4979; Adj:,,39519 3 factors, 1 Blocks, 54 Runs; MS Residual=958,6587 DV: Textura (N)					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)Transglutaminase (U/g)(L)	6907,52	1	6907,52	7,20540	0,010207
Transglutaminase (U/g)(Q)	771,14	1	771,14	0,80440	0,374664
(2)Lactase (g/L)(L)	1279,39	1	1279,39	1,33456	0,254231
Lactase (g/L)(Q)	567,57	1	567,57	0,59205	0,445740
(3)Temperatura (°C)(L)	488,79	1	488,79	0,50987	0,478965
Temperatura (°C)(Q)	8905,42	1	8905,42	9,28946	0,003890
1L by 2L	4698,01	1	4698,01	4,90061	0,032077
1L by 3L	1232,92	1	1232,92	1,28609	0,262910
2L by 3L	14604,84	1	14604,84	15,23466	0,000322
Error	42180,98	44	958,66		
Total SS	84008,70	53			

APÊNDICE I - Análise estatística

Efeitos dos Fatores e os coeficientes do modelo de regressão para a variável resposta taxa de derretimento (g/min) em termos das variáveis escalonadas.

Effect Estimates: Var.:Taxa de derretimento (g/min); R-sqr=,35397; Adj;.22183 3 factors, 1 Blocks, 54 Runs; MS Residual=,0 DV: Taxa de derretimento (g/min)										
Factor	Effect	Std.Err.	t(44)	p	-95, Cnf.Limt	+95, Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95, Cnf.Limt	+95, Cnf.Limt
Mean/Interc.	1,576338	0,055551	28,37650	0,000000	1,464383	1,688294	1,576338	0,055551	1,464383	1,688294
(1)Transglutaminase (U/g)(L)	-0,001588	0,060216	-0,02637	0,979082	-0,122946	0,119770	-0,000794	0,030108	-0,061472	0,059885
Transglutaminase (U/g)(Q)	-0,010034	0,062569	-0,16037	0,873322	-0,136133	0,116065	-0,005017	0,031284	-0,068067	0,058032
(2)Lactase (g/L)(L)	0,071041	0,060216	1,17977	0,244432	-0,050317	0,192399	0,035521	0,030108	-0,025158	0,096200
Lactase (g/L)(Q)	0,057496	0,062569	0,91892	0,363146	-0,068603	0,183595	0,028748	0,031284	-0,034302	0,091798
(3)Temperatura(°C)(L)	0,174870	0,060216	2,90404	0,005741	0,053513	0,296228	0,087435	0,030108	0,026756	0,148114
Temperatura(°C)(Q)	-0,026311	0,062569	-0,42051	0,676159	-0,152410	0,099788	-0,013155	0,031284	-0,076205	0,049894
1L by 2L	-0,155476	0,078676	-1,97615	0,054429	-0,314037	0,003086	-0,077738	0,039338	-0,157015	0,001543
1L by 3L	-0,078672	0,078676	-0,99995	0,322803	-0,237234	0,079889	-0,039336	0,039338	-0,118617	0,039945
2L by 3L	0,223566	0,078676	2,84159	0,006778	0,382127	0,065004	0,141783	0,039338	0,191064	0,032502

APÊNDICE J - Análise estatística

Coeficientes do modelo de regressão para a variável resposta taxa de derretimento (g/min), em termos das variáveis originais.

Regr. Coeficientes, Var., Taxa de derretimento (g/min); R-sqr=.35397; Adj.; 22183 3 factors, 1 Blocks, 54 Runs; MS Residual=.03						
DV: Taxa de derretimento (g/min)						
Factor	Regressn Coeff.	Std.Err.	t(44)	p	-95.% Cnf.Limt	+95.% Cnf.Limt
Mean/Interc.	-0,379166	0,671095	-0,56500	0,574946	-1,73167	0,973337
(1)Transglutaminase (U/g)(L)	0,185248	0,105381	1,75789	0,085722	-0,02713	0,397630
Transglutaminase (U/g)(Q)	-0,001254	0,007821	-0,16037	0,873322	-0,01702	0,014508
(2)Lactase (g/L)(L)	1,769285	1,185934	1,49189	0,142863	-0,62081	4,159377
Lactase (g/L)(Q)	0,718699	0,782110	0,91892	0,363146	-0,85754	2,294938
(3)Temperatura (°C)(L)	0,058039	0,023719	2,44697	0,018470	0,01024	0,105841
Temperatura (°C)(Q)	-0,000132	0,000313	-0,42051	0,676159	-0,00076	0,000499
1L by 2L	-0,194345	0,098345	-1,97615	0,054429	-0,39255	0,003857

APÊNDICE K - Análise estatística

ANOVA para a variável resposta taxa de derretimento (g/min).

ANOVA; Var.:Taxa de derretimento (g/min); R-sqr=.35397; Adj;.22183 3 factors, 1 Blocks, 54 Runs; MS Residi DV: Taxa de derretimento (g/min)					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)Transglutaminase (U/g)(L)	0,000026	1	0,000026	0,000695	0,979082
Transglutaminase (U/g)(Q)	0,000955	1	0,000955	0,025719	0,873322
(2)Lactase (g/L)(L)	0,051693	1	0,051693	1,391854	0,244432
Lactase (g/L)(Q)	0,031362	1	0,031362	0,844420	0,363146
(3)Temperatura (°C)(L)	0,313216	1	0,313216	8,433453	0,005741
Temperatura (°C)(Q)	0,006567	1	0,006567	0,176830	0,676159
1L by 2L	0,145036	1	0,145036	3,905153	0,054429
1L by 3L	0,037136	1	0,037136	0,999898	0,322803
2L by 3L	0,299889	1	0,299889	8,074618	0,006778
Error	1,634149	44	0,037140		
Total SS	2,529538	53			

APÊNDICE L - Análise estatística

Planejamento composto central e as respostas para o *overrun* (%), textura (N) e taxa de derretimento (g/min) e quantidade de cristais obtidos pelo planejamento experimental.

2 ¹¹ (3) central composite, n _c =9 n _s =6 n ₀ =2 Runs=16 (Planejamento Composto Central 2014 - 2 original factors - MODIF 12 04 2014)									
+ 3 replications, 2 center points									
Standard Run	Replicat	Transglutaminase (U/g)	Lactase (g/L)	Temperatura (°C)	Overrun (%)	Textura (N)	Taxa de derretimento (g/min)	Lactose (g/L)	Quantidade de cristais (cristais/X mm ²)
1	1	2.0	0.4	20	40	60.59	1.198	0.14	40
2	1	2.0	0.4	40	85	2.53	1.796	0.16	12
3	1	2.0	0.8	20	44	4.66	1.653	0.15	19
4	1	2.0	0.8	40	86	148.04	2.054	0.04	40
5	1	6.0	0.4	20	49	3.39	1.475	0.05	0
6	1	6.0	0.4	40	88	36.26	1.776	0.22	2
7	1	6.0	0.8	20	50	3.13	1.722	0.12	2
8	1	6.0	0.8	40	82	11.97	1.674	0.04	25
9	1	0.6	0.6	30	58	2.80	1.690	0.11	15
10	1	7.4	0.6	30	66	4.91	1.494	0.05	2
11	1	4.0	0.3	30	63	6.02	1.666	0.11	7
12	1	4.0	0.9	30	50	5.54	1.665	0.11	2
13	1	4.0	0.6	13	30	85.83	1.355	0.06	40
14	1	4.0	0.6	47	91	42.13	1.644	0.06	2
15 (C)	1	4.0	0.6	30	50	25.07	1.495	0.11	38
16 (C)	1	4.0	0.6	30	64	5.34	1.305	0.08	0
17 (C)	1	4.0	0.6	30	68	58.26	1.997	0.12	3
18 (C)	1	4.0	0.6	30	61	4.91	1.354	0.07	2
19	2	2.0	0.4	20	45	68.83	1.137	0.14	40
20	2	2.0	0.4	40	87	2.66	1.487	0.16	19
21	2	2.0	0.8	20	44	3.65	1.750	0.14	14
22	2	2.0	0.8	40	89	163.32	1.558	0.04	40
23	2	6.0	0.4	20	50	3.51	1.549	0.05	2
24	2	6.0	0.4	40	86	23.84	1.661	0.23	4
25	2	6.0	0.8	20	47	3.07	1.712	0.11	3
26	2	6.0	0.8	40	81	11.52	1.066	0.04	21
27	2	0.6	0.6	30	57	2.32	1.698	0.10	24
28	2	7.4	0.6	30	66	4.23	1.561	0.05	2
29	2	4.0	0.3	30	62	4.58	1.771	0.11	6
30	2	4.0	0.9	30	50	5.58	1.616	0.12	6
31	2	4.0	0.6	13	31	84.23	1.323	0.07	37
32	2	4.0	0.6	47	93	30.05	1.959	0.06	1
33 (C)	2	4.0	0.6	30	51	27.43	1.504	0.11	40
34 (C)	2	4.0	0.6	30	64	5.70	1.347	0.08	2
35 (C)	2	4.0	0.6	30	67	52.80	1.966	0.09	8
36 (C)	2	4.0	0.6	30	61	4.50	1.441	0.10	2
37	3	2.0	0.4	20	47	63.23	1.337		40
38	3	2.0	0.4	40	87	2.59	1.450		12
39	3	2.0	0.8	20	45	3.77	1.705		19
40	3	2.0	0.8	40	90	159.96	1.482		40
41	3	6.0	0.4	20	46	2.81	1.300		0
42	3	6.0	0.4	40	87	26.83	1.744		2
43	3	6.0	0.8	20	49	3.12	1.659		2
44	3	6.0	0.8	40	81	10.98	1.610		25
45	3	0.6	0.6	30	57	2.13	1.508		40
46	3	7.4	0.6	30	68	4.89	1.614		2
47	3	4.0	0.3	30	63	5.83	1.718		7
48	3	4.0	0.9	30	52	4.61	1.702		2
49	3	4.0	0.6	13	30	78.76	1.318		40
50	3	4.0	0.6	47	94	36.77	1.828		7
51 (C)	3	4.0	0.6	30	51	29.06	1.693		38
52 (C)	3	4.0	0.6	30	65	5.49	1.249		1
53 (C)	3	4.0	0.6	30	66	57.74	1.902		3
54 (C)	3	4.0	0.6	30	61	4.01	1.631		2

APÊNDICE M - Análise estatística

Planejamento composto central e as respostas, hidrólise da glicose e lactose pela enzima lactase.

Trata- mentos	Concentração Média de Glicose (%)	Desv. Pad	Concentração Média de Lactose (%)	Desv. Pad
1	0,034	8,18E-04	0,304	4,08E-03
1p			0,141	3,34E-03
2	0,056	1,37E-03	0,276	4,57E-03
2p	0,055		0,159	2,31E-03
3	0,026	6,36E-06	0,146	5,82E-03
3p				
4	0,041	1,76E-04	0,257	4,60E-03
4p	0,033		0,038	3,19E-04
5	0,030	5,01E-04	0,094	1,68E-03
5p			0,046	2,60E-04
6	0,035	7,31E-04	0,228	5,79E-03
6p			0,145	1,47E-01
7	0,030	2,63E-04	0,112	4,88E-03
7p				
8	0,036	1,90E-04	0,292	6,90E-03
8p			0,041	2,20E-04
9	0,025	2,54E-05	0,107	9,16E-03
9p				
10	0,031	4,16E-04	0,313	8,78E-03
10p			0,048	1,15E-05
11	0,029	3,50E-04	0,108	3,86E-03
11p				
12	0,027	1,20E-04	0,115	2,34E-03
12p			0,120	1,15E-01
13			0,065	4,10E-03
13p				
14	0,031	4,61E-04	0,100	4,61E-03
14p			0,057	1,13E-03
15	0,030	1,21E-04	0,584	4,83E-02
15p				
16	0,035	5,01E-04	0,028	2,53E-04
16p				
17	0,029	1,96E-04	0,245	1,11E-02
17p			0,109	4,05E-03
18	0,028	1,69E-05	0,123	3,61E-03
18p			0,081	1,51E-03

APÊNDICE N - Análise estatística

Efeitos dos Fatores e os coeficientes do modelo de regressão para a variável resposta concentração da lactose (g/L) em termos das variáveis escalonadas.

Effect Estimates; Var.: [Lac]; R-sqr=,76634; Adj.: 71.026 (2**(3) central composite, nc=8 ns=6 n0=2 Runs=16 (Spreadsheet9) in VITEcard 3 factors, 1 Blocks, 32 Runs; MS Residual=,000763 DV: [Lac]										
Factor	Effect	Std.Err.	t(25)	p	-95 % Cnf.Limt	+95 % Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95 % Cnf.Limt	+95 % Cnf.Limt
Mean/Interc.	0.094006	0.009372	10.03046	0.000000	0.074704	0.113308	0.094006	0.009372	-0.074704	0.113308
(1)[Lactase](L)	-0.022909	0.010570	-2.16724	0.039945	-0.044679	-0.001139	-0.011454	0.005285	-0.022339	-0.000569
(2)[Transglutaminase](L)	-0.033046	0.010570	-3.12630	0.004449	-0.054816	-0.011276	-0.016523	0.005285	-0.027408	-0.005638
[Transglutaminase](Q)	0.025070	0.011641	2.15349	0.041118	0.001094	0.049045	0.012535	0.005821	0.000547	0.024523
Temperatura(Q)	-0.010676	0.011641	-0.91706	0.367874	-0.034652	0.013300	-0.005338	0.005821	-0.017326	0.006650
1L by 3L	0.049958	0.013811	3.61731	0.001314	0.021514	0.078403	0.024979	0.006905	0.010757	0.039201
2L by 3L	-0.094831	0.013811	-6.86635	0.000000	-0.123275	-0.066387	-0.047415	0.006905	-0.061637	-0.033193

APÊNDICE O - Análise estatística

ANOVA para a variável resposta concentração de lactose (g/L).

ANOVA: Var.: [Lac]; R-sqr=,76634; Adj.:,71026 (2**(3) central composite, nc=8 ns=6 n0=2 Runs=16 (Spreadsheets9) in VITEcarr 3 factors, 1 Blocks, 32 Runs; MS Residual=,000763 DV: [Lac]					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)[Lactase](L)	0,003584	1	0,003584	4,69695	0,039945
(2)[Transglutaminase](L)	0,007457	1	0,007457	9,77373	0,004449
[Transglutaminase](Q)	0,003538	1	0,003538	4,63752	0,041118
Temperatura(Q)	0,000642	1	0,000642	0,84100	0,367874
1L by 3L	0,009983	1	0,009983	13,08495	0,001314
2L by 3L	0,036971	1	0,036971	47,14682	0,000000
Error	0,01907425	0,000763			
Total SS	0,08163031				

APÊNDICE P - Análise estatística

Coefficientes do modelo de regressão para a variável resposta quantidade de cristais (cristais/mm²), em termos das variáveis originais.

Regr. Coefficients. Var. Quantidade de cristais (cristais/K mm ²); R-sqr=,53651; Adj, 44171 (Planeamento Composto Central 2014 - MOOF 13 04 2014) 3 factors, 1 Blocks, 54 Runs, MS Residual=133,9055 DV: Quantidade de cristais (cristais/K mm ²)						
Factor	Regress Coeff.	Std Err.	t(44)	p	-95 % Cnt.Limt	+95 % Cnt.Limt
Mean/Interc.	176,7591	40,29616	4,38650	0,000071	95,547	257,9707
(1)Transglutaminase (U/g)(L)	-16,5853	6,32765	-2,62109	0,011969	-29,338	-3,8328
Transglutaminase (U/g)(Q)	0,4445	0,48962	0,94654	0,349044	-0,502	1,3910
(2)Lactase (g/L)(L)	-89,9744	71,20987	-1,40394	0,167356	-243,488	43,5397
Lactase (g/L)(Q)	-36,6597	46,96211	-0,78062	0,439204	-131,306	57,9863
(3)Temperatura (°C)(L)	-0,0777	1,42420	-0,20745	0,000103	-0,948	-3,2074
Temperatura (°C)(Q)	0,0429	0,01878	2,28472	0,027207	0,005	0,0808
1L by 2L	6,0365	5,90519	1,02223	0,312260	-5,865	17,9376
1L by 3L	0,1651	0,11810	1,39831	0,169028	-0,073	0,4032
2L by 3L	4,2485	1,18104	3,59730	0,000910	1,868	6,6288

APÊNDICE Q - Análise estatística

ANOVA para a variável resposta quantidade de cristais (cristais/mm²).

ANOVA: Var.:Quantidade de cristais (cristais/X mm ²); R-sq=,53651; Adj:,44171 3 factors, 1 Blocks, 54 Runs; MS Res: Quantidade de cristais (cristais/X mm ²)					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)Transglutaminase (U/g)(L)	3249,60	1	3249,603	24,26788	0,000012
Transglutaminase (U/g)(Q)	119,97	1	119,970	0,89593	0,349044
(2)Lactase (g/L)(L)	95,56	1	95,560	0,71364	0,402809
Lactase (g/L)(Q)	81,60	1	81,598	0,60937	0,439204
(3)Temperatura (°C)(L)	351,48	1	351,483	2,62486	0,112348
Temperatura (°C)(Q)	698,98	1	698,982	5,21987	0,027207

APÊNDICE R - Análises físico-químicas

Análises físico-químicas das 18 formulações de sorvete de morango diet.

Análises Físico Químicas								
Umidade (%)	Cinzas (%)	pH	Acidez titulável (%)	Açúcares redutores (Glicose %)	Açúcares redutores (Sacarose %)	Proteína (%)	Gordura (%)	Sólidos totais (%)
66,33 ± 1,15 abc	1,730 ± 0,09 c	6,26 ± 0,05 abc	0,17 ± 0,01 c	2,26 ± 0,07 fg	2,56 ± 0,12 ef	5,86 ± 0,40 c	8,66 ± 1,15 a	33,66 ± 1,52 abc
68,00 ± 1,00 abc	1,46 ± 0,02 c	6,29 ± 0,01 ab	0,19 ± 0,00 abc	2,71 ± 0,05 bcde	3,08 ± 0,25 cde	6,29 ± 0,30 bc	8,00 ± 0,00 a	32,00 ± 1,00 abc
69,33 ± 1,52 abc	2,00 ± 0,00 bc	6,27 ± 0,00 abc	0,17 ± 0,01 bc	2,39 ± 0,30 defg	2,49 ± 0,14 f	6,53 ± 0,66 abc	9,33 ± 1,15 a	30,66 ± 1,52 abc
65,00 ± 1,00 c	2,93 ± 0,25 a	6,29 ± 0,00 ab	0,20 ± 0,02 abc	2,29 ± 0,13 efg	2,71 ± 0,18 def	6,66 ± 0,25 abc	8,66 ± 1,15 a	35,00 ± 1,00 a
71,00 ± 1,00 abc	1,510 ± 0,16 c	6,34 ± 0,01 a	0,19 ± 0,00 abc	2,18 ± 0,14 g	2,35 ± 0,21 f	6,01 ± 0,63 c	10,00 ± 2,00 a	29,00 ± 1,00 abc
65,66 ± 0,57 bc	2,70 ± 0,20 ab	6,25 ± 0,01 abc	0,21 ± 0,00 ab	2,16 ± 0,04 g	2,40 ± 0,12 f	6,74 ± 0,13 abc	9,00 ± 1,00 a	34,33 ± 0,57 ab
74,00 ± 2,64 ab	2,00 ± 0,00 bc	6,25 ± 0,01 abc	0,20 ± 0,00 abc	2,68 ± 0,14 bcdef	3,68 ± 0,19 ab	6,40 ± 0,20 bc	10,00 ± 1,00 a	26,00 ± 2,64 bc
67,00 ± 2,00 abc	2,73 ± 0,40 ab	6,26 ± 0,02 abc	0,18 ± 0,01 abc	2,223 ± 0,10 g	2,51 ± 0,15 f	5,93 ± 0,47 c	10,00 ± 1,00 a	33,00 ± 2,00 abc
69,00 ± 1,00 abc	2,66 ± 0,57 ab	6,17 ± 0,01 bc	0,20 ± 0,01 abc	3,26 ± 0,13 a	4,18 ± 0,12 a	7,66 ± 0,20 ab	8,33 ± 0,57 a	31,00 ± 1,00 abc
68,00 ± 1,00 abc	1,46 ± 0,02 c	6,34 ± 0,00 a	0,21 ± 0,01 ab	2,95 ± 0,17 abc	3,58 ± 0,13 bc	6,93 ± 0,55 abc	11,00 ± 1,00 a	32,00 ± 1,00 abc
67,33 ± 0,57 abc	3,00 ± 0,00 a	6,12 ± 0,01 c	0,21 ± 0,01 abc	2,33 ± 0,18 defg	2,71 ± 0,19 def	7,03 ± 0,15 abc	9,33 ± 1,15 a	32,66 ± 0,57 abc
68,66 ± 0,57 abc	3,33 ± 0,57 a	6,28 ± 0,01 abc	0,19 ± 0,02 abc	2,19 ± 0,08 g	2,45 ± 0,17 f	6,63 ± 0,20 abc	10,00 ± 2,00 a	31,33 ± 0,57 abc
65,00 ± 1,00 c	3,03 ± 0,30 a	6,28 ± 0,02 abc	0,21 ± 0,02 abc	2,90 ± 0,05 abc	3,34 ± 0,21 bc	6,53 ± 0,26 abc	10,33 ± 2,08 a	35,00 ± 1,00 a
67,33 ± 0,57 abc	2,96 ± 0,28 a	6,26 ± 0,01 abc	0,20 ± 0,01 abc	2,84 ± 0,07 abc	3,36 ± 0,19 bc	6,53 ± 0,15 abc	8,33 ± 0,57 a	32,66 ± 0,57 abc
68,33 ± 1,52 abc	2,56 ± 0,25 ab	6,32 ± 0,09 ab	0,19 ± 0,01 abc	2,83 ± 0,05 bc	3,47 ± 0,24 bc	3,40 ± 0,10 d	9,00 ± 1,00 a	31,66 ± 1,52 abc
74,66 ± 0,98 a	2,86 ± 0,20 a	6,33 ± 0,03 a	0,19 ± 0,00 abc	3,04 ± 0,22 ab	3,44 ± 0,22 bc	7,90 ± 1,18 a	8,66 ± 1,15 a	25,33 ± 1,69 c
64,33 ± 1,52 c	3,00 ± 0,20 a	6,27 ± 0,02 abc	0,22 ± 0,00 a	2,76 ± 0,08 bcd	3,13 ± 0,17 bcd	6,26 ± 0,15 bc	9,66 ± 1,52 a	35,66 ± 1,52 a
69,33 ± 2,08 abc	1,53 ± 0,07 c	6,17 ± 0,17 bc	0,20 ± 0,01 abc	2,54 ± 0,16 cdefg	2,64 ± 0,18 def	7,18 ± 0,95 abc	8,00 ± 0,00 a	30,66 ± 2,08 abc

ANEXOS

ANEXO A - Comprovante de submissão de artigo

Comprovante de submissão do artigo “Processing and microbiological characterization *diet* of strawberry ice-Cream with addition of edulcorant, whey protein concentrate (wpc) and howle milk powder” à International Journal of Nutrition and Food Sciences.

International Journal of Nutrition and Food Sciences

2014, 3(2): 97-103

Published online March 10, 2014 (<http://www.sciencepublishinggroup.com/ijnfsc>)

doi: 10.11648/j.ijnfsc.20140302.22



Processing and microbiological characterization of diet strawberry ice cream with addition of whey protein concentrate, whole milk powder and sweeteners

Celeide Pereira^{1,2*}, André Andrejewski², Ademir Mattana², Carla Adriana Pizarro Schmidt², Pedro Luiz Manique Barreto¹, Ernani Sebastião Sant'Anna¹

¹Federal University of Santa Catarina State – SC, Brazil

²Federal Technological University of Paraná, Marilândia Campus – PR, Brazil

Email address:

celaidep@ufsc.br (C. Pereira), andrejewski@hotmail.com (A. Andrejewski), mattanaafpr@yahoo.com.br (A. Mattana), carladriana@ufpr.edu.br (C. A. P. Schmidt), barreto@ufsc.br (P. L. M. Barreto), ernani@ufsc.br (E. S. S. Anna)

To cite this article:

Celeide Pereira, André Andrejewski, Ademir Mattana, Carla Adriana Pizarro Schmidt, Pedro Luiz Manique Barreto, Ernani Sebastião Sant'Anna. Processing and Microbiological Characterization of Diet Strawberry Ice Cream with Addition of Whey Protein Concentrate, Whole Milk Powder and Sweeteners. *International Journal of Nutrition and Food Sciences* Vol. 3, No. 2, 2014, pp. 97-103. doi: 10.11648/j.ijnfsc.20140302.22

Abstract: Ice cream is not considered to be a serious source of bacterial infection since it is a frozen food product, the greatest risk of contamination occurring during the processing stage. The aim of this study was to determine and evaluate the microbiological characteristics of diet strawberry ice cream formulations with the addition of whey protein concentrate (WPC), whole milk powder (MP) and sweeteners. The formulations were prepared in two stages: in the first stage ice cream samples were prepared with WPC and either stevia (F1), sucralose/acesulfame-K (F2), saccharin/cyclamate (F3) or fructose (F4) and with MP but without sweetener (F5); and in the second stage ice cream with the addition of MP (F1-MP) or WPC (F2-WPC) with sucralose/acesulfame-K was prepared. The pasteurized milk, cream and ice cream were submitted to analysis to determine the counts for viable aerobic mesophylla, coliforms at 35 °C and 45°C, psychrotrophic bacteria, coagulase-positive *Staphylococcus aureus* and molds and yeasts. A study on the presence of *Salmonella* spp. was also carried out. All of the analysis was carried out in triplicate. The pasteurized milk, cream and ice cream had good microbiological quality, indicating strict control during all processing stages, leading to a high quality product.

Keywords: Edible Ice, Food Safety, Processing Control

1. Introduction

Ensuring the safety and quality of food products is essential to public health, making it necessary that these issues continue a reference for the food industry, particularly for dairy products. A great variety of microorganisms colonize and grow in common food products. Many products provide an environment suitable for the growth of microorganisms, reducing the product quality and the availability of these products to the consumer. The deterioration of food products is defined as any alteration in the appearance, odor or taste of a food product which makes it unacceptable to the consumer. Foods which have deteriorated do not necessarily pose a risk to the consumer; however, in some cases, pathogenic organisms may be responsible for the deterioration [1].

Food safety currently represents a challenge and needs to be considered throughout the food chain [2]. The microbiological examination of a food product can be carried out, among other reasons, to verify its microbiological quality or to ascertain that it satisfies certain microbiological criteria. Indicator microorganisms have been researched in order to verify the hygiene-sanitary quality of food products and the results of microbiological analysis indicate the quality of the raw materials employed, the cleanliness of the food preparation conditions and the efficiency of the preservation method [3].

Several microorganisms can cause problems when present in food products, both financially and in terms of health. These include the group of microorganisms called coliforms (total or thermotolerant), *Staphylococcus aureus*, filamentous fungi and yeasts and *Salmonella* spp. A characteristic of

ANEXO B - Comprovante de submissão de artigo

Comprovante de submissão do artigo “Physico-Chemical Properties of edibles ices – A product of low caloric value, nutritional and functional” à Revista Sobebras.

Revista SODEBRAS – Volume 9 – Nº 98 – FEVEREIRO/ 2014



PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF EDIBLE ICES - A PRODUCT OF LOW CALORIFIC VALUE, NUTRITIONAL AND FUNCTIONAL

CELEIDE PEREIRA^{1,2}; ANDRÉ ANDREJEWSKI²; DAIANE CORTI²; CARLA
ADRIANA PIZARRO SCHMIDT²; PEDRO LUIZ MANIQUE BARRETO¹; ERNANI S.
SANT'ANNA¹

1 – FEDERAL UNIVERSITY OF SANTA CATARINA STATE – SC, BRAZIL.

2 – FEDERAL TECHNOLOGICAL UNIVERSITY OF PARANÁ MEDIANEIRA

CÂMPUS - PR, BRAZIL

celeidep@yahoo.com.br

ABSTRACT - Ice cream contains proteins, sugars, animal protein, vitamins, calcium and phosphorous. Sweeteners provide this food product with a sweet taste and whey protein concentrates (WPC) are rich in proteins. The aim of this study was to prepare and evaluate the physicochemical differences of *diet* strawberry ice creams with the addition of WPC, whole milk powder (MP) and sweeteners. The formulations were prepared: first stage ice cream samples were prepared with WPC and either stevia (F1), sucralose/acesulfame-K (F2) saccharin/cyclamate (F3) or fructose (F4) and with MP but without sweeteners (F5), and second stage ice cream with the addition of MP (F1-MP) or WPC (F2-WPC) with sucralose/acesulfame K were prepared. All of the analyses were carried out in triplicate. The ice cream samples prepared in the first stage showed significant differences (Tukey Test, 5%) for ash (1.17 % to 1.38 %), fat (6.8 % to 8.0 %) and protein (0.83 % to 1.41 %) contents, and in the second stage F2-WPC had a lower fat value and had a statistically significant difference (Tukey Test, 5%) in relation to acidity, which was higher compared with the F1-MP ice cream sample. The production of *diet* ice cream was presented with good physicochemical properties.

Keywords: *Functional Food. Diet. Ice Cream. Quality Control. Sweeteners.*

I. INTRODUCTION

The origin of ice cream is still undefined, although reports date back to 250 BC when the Chinese mixed fruit pulp and honey with snow in order to prepare a delicacy appreciated by the emperors (MIKILITA, 2002). A significant event in the history of ice cream occurred in 1292 when the Italian merchant Marco Polo, on one of his famous journeys, brought to Italy a recipe which revealed the secret for the preparation of ice cream from the east (ABIS, 2007; MARSHALL *et al.*, 2003). From this moment onward ice cream spread throughout Europe (CLARKE, 2004). In the United States ice cream arrived via recipes brought by the English colonizers and gained greater importance when the first machine for producing ice cream appeared in 1843 in New Jersey, invented by Nancy Johnson (ABRAHÃO, 2005). The first ice cream production plant opened in 1851, in the city of Baltimore, and ice cream subsequently gained even greater popularity, consolidating the US as the main producer in the world (IDFA, 2010). In Brazil, the first reports date back to 1834 with the importation of ice from Boston for use in the production of ice creams based on tropical fruits. However, only in 1941, in Rio de Janeiro, was the first ice cream production plant in Brazil inaugurated, called 'US HARKSON do Brazil, which was later renamed Kibon.

Ice cream is a complex colloidal system composed of an emulsion comprised of fat droplets, proteins, air bubbles and ice crystals dispersed in an aqueous phase represented by a concentrated sucrose solution. In addition, other ingredients may be present such as emulsifiers and stabilizers (CLARKE, 2004; GILLES *et al.*, 2006). The Brazilian Resolution RDC n. 266 of 22/09/05 (BRASIL, 2005) defines edible ices as "frozen products obtained from an emulsion of fats and proteins; or from a mixture of water and sugar(s) to which (an) other ingredient(s) can be added so long as this does not change the nature of the product." This food product is one of the milk derivatives most appreciated by the population in general (ALVAREZ *et al.*, 2005).

The growing demand for food products which are ever more nutritive, accessible and associated with a low production cost makes whey an important source of essential nutrients, which can be easily obtained and employed in the preparation of a large number of food products (MAROULIS; SARAVACOS, 2008).

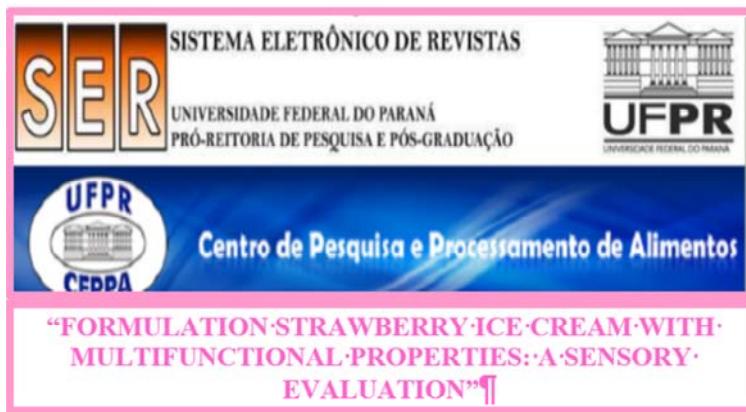
Whey protein concentrate (WPC) is a product obtained from the processing of milk whey and is commercialized in the form of a powder (LUCENA *et al.*, 2007). The protein content of WPCs can vary between 35-80 %. When WPCs contain around 53 % of protein there will be on average 35 % of lactose, 5 % of fat and 7.0 % of ash content.

However, on increasing the protein concentration to 80 % the content of lactose decreases to around 7 %, and the fat and ash contents to between 4 % and 7.0 %, respectively (ANTUNES, 2003). WPC confers functional and nutritive properties of interest to yogurt, cream, butter, ice cream, cream cheese and other products, which are of the 'light' version and differ in terms of cost (VOORBERGEN; ZWANENBERG 2002; ANTUNES *et. al.*, 2004).

The use of the term "*diet*" is permitted for foods destined for *diets* aimed at controlling the intake of sucrose and those especially formulated to meet the needs of people with sucrose metabolism disturbances, and which thus cannot have sugar added (BRASIL, 1998b).

ANEXO C - Submissão de artigo

Submissão do artigo "Formulation Strawberry Ice Cream With Multifunctional Properties: A Sensory Evaluation" ao Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos. SER - CEPPA - UFPR.



FORMULATION STRAWBERRY ICE CREAM WITH MULTIFUNCTIONAL PROPERTIES: A SENSORY EVALUATION

CELEIDE PEREIRA*

DAIANE CORTI**

CARLA ADRIANA PIZARRO SCHMIDT***

PEDRO LUIZ MANIQUE BARRETO****

ERNANI SEBASTIÃO SANT'ANNA*****

ABSTRACT The aim of this study was to evaluate formulations of strawberry ice cream and select the most suitable in terms of the sensory characteristics of appearance, color, taste, creaminess and global acceptance which meet the expectations of the consumer. Pasteurized milk, WPCs, whole milk powder, neutral stabilizer, emulsifier, strawberry aroma, strawberry flavoring and four sweeteners were used to produce the ice cream. The results indicated that the edulcorant sucralose/acesulfame K was closest to the ideal and that the use of WPCs was preferable in relation to milk powder.

Key words: Food technology, Edible loes, Diet foods, Sensory Analysis.

* Doctoral student in food science - Federal University of Santa Catarina State - SC, Lecturer at UTFPR - Medianeira Campus, Federal University of Santa Catarina, Av. Admar Gonzaga, 1346, Bairro Itacorubi, Cep: 85.034.001, Florianópolis - SC, Brazil. (e-mail: celeidep@yahoo.com.br)

** Food technician - Federal Technological University of Paraná State - Medianeira Campus, Master's student in food technology - Federal Technological University of Paraná State - Medianeira Campus, Brazil. (e-mail: daicorti@gmail.com)

*** Doctor of agronomy - State University of Londrina - PR, Lecturer at UTFPR - Medianeira Campus, Federal Technological University of Paraná - Medianeira Campus - PR, Brazil. (e-mail: carlaschmidt@utfpr.edu.br)

**** Doctor of chemistry - Federal University of Santa Catarina State - UFSC, Lecturer at UFSC - SC, Federal University of Santa Catarina - SC, Brazil. (e-mail: barreto@cca.ufsc.br)

***** Post-doctorate in industrial microbiology and fermentation - Louisiana State University System - USA, Lecturer at UFSC - SC, Federal University of Santa Catarina - SC, Brazil. (e-mail: ernanis@cca.ufsc.br)

* Corresponding author at: Federal University of Santa Catarina - SC, Rodovia Amaro Antônio Vieira, 2740, Apt. 403, Bloco C, Conjunto Residencial Caminho da Lagoa, Bairro Itacorubi, Florianópolis - SC, Cep: 85.034.101, phone: +(55) 48-32047363 ou 34047339. (e-mail: celeidep@yahoo.com.br)

ANEXO D - Submissão de artigo

Submissão do artigo “Improvement of Ice Cream Functional Properties by Addition of Lactase and Transglutaminase” ao Journal Food Science and Nutrition.

IMPROVEMENT OF ICE CREAM FUNCTIONAL PROPERTIES BY ADDITION OF LACTASE AND TRANSGLUTAMINASE

Celeste Pereira*, Nirelle Siffredi Farias*, Fabiana Curique*, Leonel Vinícius Constantino*, Cristiane Canam*, João Francisco Gomes Correia*, Valdelucia Maria Alhos da Souza Grinsztajn*, Pedro Luiz Marinho Barreto*, Suzana Lucy Nixdorf*, Rosângela Curi Pedrosa*, Ernani Sebastião Sant’Anna*

* Department of Science and Food Technology - Agricultural Sciences Center - Federal University of São Carlos São Carlos - SC, Av. João Nogueira, 1313, São Carlos, 13506-900, Florianópolis - SC, Brazil

* Department of Biochemistry, Center of Sciences Biological, Federal University of São Carlos - SC, Campus Universitário, s/n, São Carlos, CEP - 13506-900, Florianópolis - SC, Brazil

*Center for Instrumental Sciences, Department of Chemistry - Campus Universitário, São Carlos University of São Carlos - SC, Av. João Nogueira, 1313, São Carlos, 13506-900, Florianópolis - SC, Brazil

*Department of Food Technology - Federal Technological University of Paraná São - Marilena Campus, Av. Brasil, 1332, Parque Independência, 81280-000, Marilena - PR, Brazil

*Department of Food Technology - Federal Technological University of Paraná São - Marilena Campus, Av. Brasil, 1332, Parque Independência, 81280-000, Marilena - PR, Brazil

RESUMO A adição de enzimas aos alimentos é uma alternativa inovadora e funcional para melhoria da qualidade destes. O presente trabalho objetivou avaliar o efeito da adição de lactase e transglutaminase em sorvete de morango *Diet*. Para tanto, foram produzidos sorvetes com leite pasteurizado e delactosado. Os tratamentos foram codificados como -1, 0 e +1 correspondendo a quantidades de enzima lactase (-1=0,9; 0=1,3; 1=1,7 g/L), a quantidades da enzima transglutaminase (-1=2; 0=6; +1=4 U g⁻¹ de proteína) considerando o tempo de incubação em diferentes temperaturas (20, 30 e 40 °C) por 90 minutos para todos tratamentos. Após a inativação da enzima por aquecimento, elaborou-se o sorvete. As amostras para análise de textura foram mantidas a -28 °C até serem cortadas em cubos de 2 x 2 x 2 cm e comprimidas a uma velocidade de 5mm/s. Para a avaliação da expressão das proteínas procedeu-se primeiro a retirada de lipídeos dos sorvetes, quantificado o teor de proteína das amostra e 50µg/mL foram aplicadas em gel de acrilamida (12 %) e finalmente submetidas a eletroforese. Para averiguar a hidrólise da lactose pela enzima lactase efetuou-se primeiramente a extração etanólica (P.A.) dos açúcares presentes nas amostras, confirmando-se a quantificação dos açúcares por Cromatografia Líquida de Alta eficiência com detector de índice de refração. Os resultados da eletroforese evidenciaram a formação de polímeros entre 12 kDa a 30 kDa para todos os tratamentos, revelando a presença de proteínas características do leite, como α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, caseínas, etc. Além da formação de aglutinados proteicos de maior peso molecular, indicando formação de ligações cruzadas de resíduos de glutamina e lisina pela ação da enzima transglutaminase. No leite pasteurizado os tratamentos +1 e 0 apresentaram melhor textura, e para o leite delactosado foram os tratamentos 0 e -1. A partir dos resultados obtidos podemos concluir que a adição das enzimas lactase e transglutaminase em sorvetes, pode proporcionar um produto com melhor cremosidade, viscosidade e textura macia.

Palavras - Chave: Sorvetes, cross-linking, eletroforese, textura, enzimas, HPLC

*Corresponding author. Tel.: +55 51 3377333.

Oral address: celeste@ufscar.br (C. Pereira).

ANEXO E - Resumo

Resumo “Physico-Chemical Characteristics of Different Formulation of Diet Strawberry Ice Cream With Addition of Whey Protein Concentrate (WPC), Whole Milk Powder and Sweetener.” apresentado no 16 th World Congress of Food Science and Technology: Addressing Global Food Security and Welness Through Food Science and Technology - XVII Latin American Seminaar of Food Science and Technology - ALACCTA: Nano - Agri Food 2012 realizado no período de 5 a 9 de Agosto de 2012 no centro de Convenção do Rafain Palace Hotel em Foz do Iguaçu - PR - Brasil.



PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTICS OF DIFFERENT FORMULATIONS OF DIET STRAWBERRY ICE CREAM WITH ADDITION OF WHEY PROTEIN CONCENTRATE (WPC), WHOLE MILK POWDER AND SWEETENER

PEREIRA¹, C.; CORTI², D.; SCHMIDT³, C. A. P.; BARRETO⁴, P. L. M.; SANT'ANNA⁵, E. S.

¹ Professor at Federal Technological University of Paraná - Medianeira Campus - Brazil, E-mail: coledc@utfpr.edu.br
² MSc student in Food Technology - Federal Technological University of Paraná - Medianeira Campus - Brazil, E-mail: rlacorti@gmail.com
³ Professor at Federal Technological University of Paraná - Medianeira Campus - Brazil, E-mail: carlavschmidt@utfpr.edu.br
⁴ Professor at Department of Food Science and Technology - Federal University of Santa Catarina - Brazil, E-mail: barreto@cca.ufsc.br
⁵ Professor at Department of Food Science and Technology - Federal University of Santa Catarina - Brazil, E-mail: emanoel@cca.ufsc.br

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ - CÂMPUS MEDIANEIRA.
 Avenida Brasil, 4232 - Parque Independência - Caixa Postal 391, CEP: 85884-000. Medianeira, Paraná, Brasil.

ANEXO F - Resumo

Resumo “Desenvolvimento e Avaliação do Efeito da Adição da Enzima Lactase em Sorvete de Morango *Diet* com Adição de Concentrado Protéico de Soro (Cpss) e Edulcorante” apresentado no COLACRO XIV - 14º Congresso Latino Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas realizado no período de 1 a 5 de outubro de 2012 no Centro de Convenção Centro Sul - Florianópolis - Santa Catarina - Brasil.

 <p>COLACRO XIV</p>	<p>DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ADIÇÃO DA ENZIMA DA LACTASE EM SORVETE DE MORANGO <i>DIET</i> COM ADIÇÃO DE CONCENTRADO PROTÉICO DE SORO E EDULCORANTE</p>	
 <p>Universidade Estadual de Londrina</p>	<p>PEREIRA¹, C; CONSTANTINO², L. V; SCHMIDT³, C. A. P; ZIBETTI⁴, A. W; NIXDORF⁵, S. L; SANTANA⁶, E. S.</p>	
 <p>UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ</p>	<p>¹ Professora da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus de Medianeira, e-mail: celeide@utfpr.edu.br ² Mestrando em Química - Universidade Estadual de Londrina - Paraná, e-mail: nel_qui_uel@hotmail.com ³ Professora da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus de Medianeira, e-mail: carlesschmidt@utfpr.edu.br ⁴ Doutorando em Controle de Processos - Universidade Federal de Santa Catarina - SC, e-mail: andrez@eng.ufsc.br ⁵ Doutora em Química - Universidade Estadual de Londrina - PR, professora associada da UEL, e-mail: snixdorf@uel.br ⁶ Professor do Departamento de Tecnologia de Alimentos - Universidade Federal de Santa Catarina - SC, e-mail: ernanis@cca.ufsc.br</p>	
<p>UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ – CÂMPUS DE MEDIANEIRA Avenida Brasil, 4232 – Parque Independência – Caixa Postal 391, CEP: 85.884-000 Medianeira , Paraná, Brasil www.md.utfpr.edu.br</p>		

ANEXO G - Resumo

Resumo “Improvement of Functional Properties of Ice Cream by Addition of Lactase and Transglutaminase” apresentado no SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos: Ciência de Alimentos: Impacto na Nutrição e Saúde realizado no período de 3 a 6 de novembro de 2013 no Centro de Convenções da Unicamp - Campinas - São Paulo - SP – Brasil.

9845 **IMPROVEMENT OF FUNCTIONAL PROPERTIES OF ICE CREAM BY ADDITION OF LACTASE AND TRANSGLUTAMINASE**

Celeide Pereira¹, Mirelle Sifroni Farias², Fabiana Ourique², João Francisco Gomes Correia², Pedro Luiz Manique Barreto², Rozângela Curi Pedrosa², Ermani Sebastião Sant’Anna³

¹celeide@utfpr.edu.br

¹FEDERAL TECHNOLOGICAL UNIVERSITY OF PARANÁ- Campus Medianeira - PR - Brasil

²LABIOEX, DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY, CCB - FEDERAL UNIVERSITY OF SANTA CATARINA STATE
Florianópolis - SC - Brazil

³AGRICULTURAL SCIENCES CENTER - FEDERAL UNIVERSITY OF SANTA CATARINA STATE
Florianópolis - SC - Brazil



ANEXO H - Resumo

Resumo “Formulação e Avaliação Sensorial de Sorvete de Morango *Diet* com Adição de Edulcorante, Concentrado Protéico de Soro (Cpss) e Leite em Pó Integral: Um Alimento Funcional”, a ser apresentado no XXIV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos que será realizado no período de 25 a 29 de setembro de 2014 no Centro de Convenções em Aracaju - Sergipe - Brasil.



FORMULAÇÃO E AVALIAÇÃO SENSORIAL DE SORVETE DE MORANGO *DIET* COM A ADIÇÃO DE EDULCORANTE, CONCENTRADO PROTÉICO DE SORO E LEITE EM PÓ INTEGRAL: UM ALIMENTO FUNCIONAL

CELEIDE PEREIRA^{1,2}, DAIANE CORTI¹, MONICA STOBENIA¹, CARLA ADRIANA PIZARRO SCHMIDT¹, PEDRO LUIZ MANIQUE BARRETO³, ERNANI SEBASTIÃO SANT'ANNA³

¹UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ – Campus Medianeira – PR – Brasil

²Centro de Ciências Agrárias - UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – Florianópolis - SC - Brasil

³celeide@utfpr.edu.br

Logos: UTPR, PGCAL UFPR, and Universidade Federal de Santa Catarina.

ANEXO I - Resumo

Resumo “Application of Response Surface Methodology in Assessing the Activity of the Enzyme Lactase and Transglutaminase in the Strawberry Ice Cream *Diet* and Effect Ice Crystal Size Distribution by Microscopic Observation Method” apresentado oralmente no 17th IUFoST - World Congress of Food Science and Technology, período de 17 a 21 de Agosto de 2014 no Palais des Congrès de Montreal Canadá.

Acknowledgement - IUFoST 2014 2789839



- Thank you for submitting your abstract for the 17th IUFoST World Congress of Food Science and Technology.
- Your abstract will now be reviewed by the scientific committee and peer reviewers and you will be informed of their decision.
- Notifications of acceptance will be sent by April 15, 2014.
- **It is important that you keep a note of your login and password details to enable you to make any changes to your abstract. The deadline to edit your abstract is March 3, 2014.**

Please Note Your Login And Password Details Below

User Name: 2789839

Password: TDOYM

Submitter Details

First Name:	Celeide
Family Name:	Pereira
Title:	Prof.
Institution/Organisation:	Federal University of Santa Catarina
Address Line 1:	Rovovia Admar Gonzaga, 1346
Address Line 2:	Rodovia Amaro Antonio Vieira, 2740, 402 BL C
City:	Florianópolis
Province/State:	Santa Catarina
Country:	Brazil
Telephone:	+55 (48) 84077339 ou 32047363
Email:	celeide@utfpr.edu.br
Please reconfirm your email:	celeide@utfpr.edu.br
Please give an alternative email:	celeidep@yahoo.com.br
Please select a statement:	No, the author/s have nothing to disclose
If yes, please disclose all conflict/s of interest here:	

If you would like your full length paper to be considered for publishing in one of the Food Research International following journals please select one:

Would you like to apply for the award: Yes, I will be applying

Please select your trainee status: Faculty Member

Publication Category

Research Report

ANEXO J - Parecer de aprovação

Parecer de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da UFSC.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PROPRIEDADES FUNCIONAIS DE SORVETE DE MORANGO DIET COM ADIÇÃO DA ENZIMA LACTASE E TRANSGLUTAMINASE OTIMIZADA ATRAVÉS DA METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Pesquisador: Emani Sebastião Sant'Anna

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 22049413.C.0000.0121

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Patrocinador Principal: CCA - Centro de Ciências Agrárias
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 550.637

Data da Relatoria: 10/03/2014

Apresentação do Projeto:

Projeto de tese de doutorado em Ciência dos Alimentos, da UFSC, da aluna Celso Perceira, sob orientação do Prof. Dr. Emani Sant'Anna e co-orientação do Prof. Dr. Pedro Barreto, que pretende desenvolver e analisar sorvetes com as combinações das concentrações da enzima lactase e enzima transglutaminase e a temperatura de incubação da enzima, com as respectivas respostas esperadas para: Índice de hidrólise e Índice de consistência. 180 participantes fizeram uma análise sensorial do produto a ser desenvolvido.

Objetivo da Pesquisa:

Otimização físico-química e microbiana da enzima lactase e transglutaminase e comportamento reológico de sorvete diet utilizando a metodologia de superfície de resposta.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos previstos de forma adequada.

Benefícios: obtenção de um produto funcional, de alta qualidade, cremosidade, palatabilidade, sem formação de cristais, com alto rendimento.

Endereço: Campus Universidade Federal João David Pereira Lima
Bairro: Trindade CEP: 88.043-920
UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS
Telefone: (48)372-0296 Fax: (48)3721-9206 E-mail: cep@reitoria.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Contrato de Pesquisa: 566/07

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto tem relevância científica e apresenta-se bem estruturado. Na versão anterior do projeto, o formulário da plataforma Brasil apresentava diversas erros no preenchimento dos campos, como por exemplo, desenhos, desfochos e metodologia. O cronograma também precisava ser detalhado neste formulário. O documento "plano de trabalho" apresentado informava que a coleta de dados já tinha sido realizada, o que motivou um encaminhamento de não aprovação.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisadora apresentou um recurso justificando que a parte do estudo em que a tecnologia do produto em desenvolvimento não necessitando de TCLE. No entanto todos os demais pontos listados pelo relator não tinham sido atendidos. Os ajustes necessários e a documentação demandada foi incluída.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Atendidas as pendências, somos de parecer pela aprovação do presente estudo.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

FLORIANÓPOLIS, 10 de Março de 2014

Assinado por:
Washington Portela de Souza
(Coordenador)

Endereço: Campus Universitário Reitor João Carlos Ferreira Lima
Bairro: TRINDADE CEP: 66.040-900
UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS
Telefone: (48)3721-0200 Fax: (48)3721-9898 E-mail: cep@ufsc.br