

Universidade Federal de Juiz de Fora
Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados

Marina Corrêa Brito

**EFEITOS DA UTILIZAÇÃO DE ENZIMA FOSFOLIPASE NA FABRICAÇÃO DE
QUEIJO MINAS FRESCAL**

Juiz de Fora

2019

Marina Corrêa Brito

**EFEITOS DA UTILIZAÇÃO DE ENZIMA FOSFOLIPASE NA FABRICAÇÃO DE
QUEIJO MINAS FRESCAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Moreira Furtado

Coorientador: Prof. Dr. Junio César Jacinto de Paula

Juiz de Fora

2019

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Brito, Marina Correa.

Efeitos da utilização de enzima fosfolipase na fabricação de queijo Minas Frescal / Marina Correa Brito. -- 2019.

76 f. : il.

Orientador: Marco Antônio Moreira Furtado

Coorientador: Junio César Jacinto de Paula

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, 2019.

1. Fosfolipase. 2. Queijo. 3. Qualidade. 4. Rendimento. 5. Glóbulo de gordura. I. Furtado, Marco Antônio Moreira, orient. II. Paula, Junio César Jacinto de, coorient. III. Título.

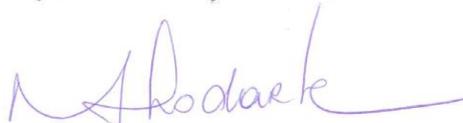
Marina Corrêa Brito

EFEITOS DA UTILIZAÇÃO DE ENZIMA FOSFOLIPASE NA FABRICAÇÃO DE
QUEIJO MINAS FRESCAL

Orientador: Professor Dr. Marco Antônio Moreira Furtado

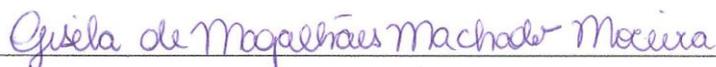
Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós Graduação em Ciência e
Tecnologia do Leite e Derivados da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF),
como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciência e
Tecnologia do Leite e Derivados.

Aprovada em 8 de julho de 2019



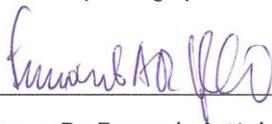
Professora Dra. Mirian Pereira Rodarte

Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF



Professora Dra. Gisela de Magalhães Machado Moreira

Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – EPAMIG



Professor Dr. Fernando Antônio Resplande Magalhães

Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – EPAMIG

Aos meus pais: Manoel e Maria Lúdia.

Aos meus avós: Domingos e Maria; Ignez e Delvo

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser luz na minha trajetória, por guiar e me fazer seguir firme no propósito da busca por conhecimento, no mais amplo sentido.

Aos meus queridos pais Manoel e Maria Lúcia, minha irmã Alice, meu cunhado Gláucio, minha sobrinha Julia e demais familiares pela paciência, amor e carinho.

Aos meus amigos e colegas de mestrado: vocês fizeram esta jornada mais prazerosa e divertida.

À Universidade Federal de Juiz de Fora, pela oportunidade de ingressar como aluna no programa de Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia em Leite e Derivados.

À Cooperativa dos Cafeicultores da Zona de Três Pontas (COCATREL) pelo apoio e oportunidade para que eu pudesse aprimorar minha formação profissional.

A todos os colaboradores do Departamento de Laticínios da COCATREL, por trabalharem com tamanha dedicação e empenho. Agradeço por tudo que me ensinaram, pelo apoio e parceria diária.

Ao meu orientador, Professor Marco Antônio Furtado pelo incentivo, pelos ensinamentos e compreensão. Uma satisfação tê-lo como orientador.

À EPAMIG, em especial ao Professor Junio, pela parceria na coorientação, pelo apoio técnico e ensinamentos. Obrigada pelo apoio Professor.

Aos colaboradores do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, especialmente a Alcy pela ajuda nas análises laboratoriais.

Ao Professor Márcio da Embrapa Gado de Leite pelo suporte e paciência nas análises estatísticas.

Aos professores participantes da banca pela valiosa contribuição, pelas críticas e sugestões.

RESUMO

O Queijo Minas Frescal é um dos os queijos mais populares e consumidos no Brasil e possui rendimento que varia entre 15 a 20 kg de queijo por 100 kg de leite. O rendimento do queijo é um determinante da rentabilidade de fábricas de laticínios; portanto, métodos diferentes têm sido empregados a fim de alcançar melhores resultados. Foram realizados dois tratamentos distintos: controle, sem adição de fosfolipase comercial (controle), e com a enzima; sendo ambos os tratamentos aplicados em um mesmo lote de leite. Foram realizadas medidas de rendimento atual (kg queijo / 100 kg de leite), rendimento atual ajustado pela umidade comum, análises físico-químicas, microbiológicas e testes sensoriais para comparação entre os dois tratamentos. A utilização de fosfolipase na fabricação de queijo aumentou o rendimento atual ajustado em 3,38% e diminuiu significativamente a perda de gordura no soro ($P < 0,05$). Em contraste, não foram observadas alterações nas propriedades físico-químicas entre os queijos controle e aqueles produzidos com fosfolipase comercial. A adição de fosfolipase teve influência significativa ($P < 0,05$) sobre a contagem de microrganismos mesófilos e coliformes totais. A aceitação e preferência não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos. O experimento reforça, portanto, a importância de estudos que possam avaliar o impacto das fosfolipases como coadjuvante de tecnologia na fabricação de queijos tipicamente brasileiros, uma vez que os resultados obtidos corroboram com os dados da literatura referentes ao rendimento e recuperação de gordura na produção de queijos com uso de fosfolipase. Do ponto de vista microbiológico o experimento aponta para uma influência das fosfolipases em certos grupos de microrganismos, o que pode ser interessante do ponto de vista industrial, em especial para o queijo Minas Frescal. Sendo assim, a utilização de fosfolipase na produção de queijos demonstra ser uma possível alternativa tecnológica para melhorar rendimento e qualidade, sem alterações sensoriais consideráveis no produto final.

Palavras-chave: Fosfolipase. Glóbulo de Gordura. Queijo. Rendimento. Qualidade

ABSTRACT

Minas Frescal Cheese is one of the most popular and consumed cheeses in Brazil and has a yield ranging from 15 to 20 kg of cheese per 100 kg of milk. Cheese yield is a determinant of the profitability of dairy factories; therefore, different methods have been employed in order to achieve better results. Two distinct treatments were performed: control, without the addition of commercial phospholipase (control), and with the enzyme; both treatments being applied to the same batch of milk. Measurements of current yield (kg cheese / 100 kg milk), current yield adjusted for common humidity, physicochemical, microbiological and sensory tests were performed to compare the two treatments. The use of phospholipase in cheese production increased the current adjusted yield by 3.38% and significantly decreased whey fat loss ($P < 0.05$). In contrast, no changes in physicochemical properties were observed between control cheeses and those produced with commercial phospholipase. The addition of phospholipase had a significant influence ($P < 0.05$) on the count of mesophilic and total coliform microorganisms. Acceptance and preference showed no significant differences between treatments. Therefore, the experiment reinforces the importance of studies that can evaluate the impact of phospholipases as a technology adjunct in the production of typical Brazilian cheeses, since the results corroborate the literature data regarding the yield and recovery of fat in the production of phospholipase cheese. From the microbiological point of view the experiment points to an influence of phospholipases on certain groups of microorganisms, which may be interesting from an industrial point of view, especially for Minas Frescal cheese. Thus, the use of phospholipase in cheese production proves to be a possible technological alternative to improve yield and quality, without considerable sensory changes in the final product.

Key-words: Phospholipase. Cheese. Fat globule. Yield. Quality.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fosfolípidios no leite de diferentes espécies: % molar de cada tipo relativo ao total de fosfolípidios presentes.....	21
Tabela 2: Variedade de produtos e aplicações de lipases na indústria.....	25
Tabela 3: Composição físico-química do leite destinado às fabricações dos queijos Minas Frescal *.....	44
Tabela 4: Composição físico-química do soro proveniente da produção de queijo Minas Frescal com e sem utilização de enzima fosfolipase.....	45
Tabela 5: Análises físico-químicas dos queijos Minas Frescal produzidos *.....	47
Tabela 6: pH dos queijos Minas Frescal dentro de cada tratamento e ao longo do tempo de estocagem*.....	50
Tabela 7: Valores* obtidos de Rendimento atual - Ra (Kg queijo/100 kg de leite) e Rendimento atual ajustado - Raj (kg queijo /100 kg de leite) em ambos tratamentos.....	53
Tabela 8: Análise de mesófilos aeróbios ao longo do tempo do queijo Minas Frescal produzido com e sem enzima fosfolipase*.....	55
Tabela 9: Análise de Coliformes totais nas amostras de queijo Minas Frescal produzido com e sem enzima fosfolipase, ao longo do tempo.*.....	57
Tabela 10: Análise de Coliformes* termotolerantes no queijo Minas Frescal produzido com e sem enzima fosfolipase, ao longo do tempo.....	59
Tabela 11: Análise* de fungos filamentosos e leveduras do queijo Minas Frescal produzido com e sem enzima fosfolipase, ao longo do tempo.....	60
Tabela 12: Análises microbiológicas do queijo Minas Frescal produzido com e sem enzima fosfolipase, no 12º dia de estocagem*.....	61
Tabela 13: Resultados de aceitação do queijo Minas Frescal produzido com e sem adição de fosfolipase.....	63
Tabela 14: Resultados do teste McNemar para avaliação pareada de resultados, comparando os tratamentos realizados para produção do queijo Minas Frescal.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Imagem adaptada de Esteves (2017) que mostra a estrutura geral da molécula de fosfolipídio. Onde R1 e R2 representam cadeias de carbono.....	21
Figura 2: Esquema representativo dos principais componentes da membrana do glóbulo de gordura do leite.....	23
Figura 3: Tipos de fosfolipases e sítios de ação destas enzimas.....	26
Figura 4: Temperatura ótima de atividade e temperatura de desnaturação da enzima fosfolipase A1 produzida por cepa de fungos <i>Aspergillus oryzae</i>	29
Figura 5: Esquema de processamento do leite adotado no experimento.....	35
Figura 6: Fluxograma de produção do queijo Minas Frescal.....	36
Figura 7: Modelo de formulário resposta para teste sensorial.....	43
Figura 8: Gráfico de evolução do pH do queijo Minas Frescal ao longo do tempo de estocagem. Sendo: TE tratamento com enzima, e TC o tratamento controle.	52
Figura 9: Comparativo dos rendimentos obtidos em ambos os tratamentos.....	53

LISTA DE APBREVIATURAS E SÍMBOLOS

% - percentual;

% m/m – percentual de massa em relação à massa;

% m/v – percentual de massa em relação ao volume;

°C – graus Celsius (unidade de temperatura);

°D – graus Dornic (medida de acidez)

ANOVA – análise de variância;

AFNOR - Association Française de Normalisation

AOAC - Association of Official Agricultural Chemists

EPAMIG – Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais;

COCATREL – Cooperativa dos Cafeicultores de Três Pontas

CCS – contagem de células somáticas

g - gramas (unidade de medida de massa);

GES - Gordura no extrato seco total;

HTST – *High Temperature Short Time* – Pasteurização rápida

ILCT – Instituto de Laticínios Cândido Tostes;

IMCU - International Milk Clotting Units

kg – quilograma (unidade de medida de massa);

L – litro (unidade de medida de volume);

L/kg^A – Litros por quilograma com unidade ajustada

LEU-P – *Lecitase units* - unidade de medida da força da enzima fosfolipase

ml - mililitro (unidade de medida de volume);

min – minutos

mm – milímetros;

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MGGL – Membrana do glóbulo de gordura do leite

n - Número de repetições;

P – valor p estatístico;

pH – potencial hidrogeniônico;

QMP – Queijo Minas Padrão;

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada (Agência Nacional de Vigilância Sanitária)

Raj – Rendimento atual ajustado à umidade desejada;

Ra – Rendimento atual em kg de queijo produzido por 100 kg de leite;

RTIQ – Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos;

SIF – Serviço de Inspeção Federal

TC – tratamento controle

TE – tratamento com enzima

UFJF- Universidade Federal de Juiz de Fora;

UFC – unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVO.....	13
2.1. Objetivos específicos	13
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	14
3.1. Queijo Minas Frescal.....	14
3.2. Qualidade do queijo Minas Frescal	14
3.3. Rendimento de queijos.....	16
3.4. Lipídeos do leite	19
3.4.1. Fosfolipídeos do leite.....	20
3.4.2. Membrana do glóbulo de gordura do leite	22
3.5. Lipases.....	23
3.5.1. Fosfolipases.....	26
3.6. Utilização de fosfolipases na indústria de alimentos	27
3.6.1. Fosfolipases tipo A1	27
3.6.2. Fosfolipases tipo A2, B, C e D.....	29
3.7. Aplicação da enzima fosfolipase	30
3.8. Legislação: uso de coadjuvantes de tecnologia no Brasil	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1. Localização	32
4.2. Delineamento experimental e análises estatísticas.....	32
4.3. Enzima fosfolipase: aplicação em função do parâmetro composicional.....	33
4.4. Tecnologia de fabricação do queijo Minas Frescal	34
4.5. Análises físico-químicas do leite e soro	36
4.6. Análises físico-químicas do queijo Minas Frescal	37
4.7. Análises de rendimento.....	38
4.7.1. Cálculo e aferição do volume de leite.....	38
4.7.2. Cálculos de rendimento e cifras de transição	38
4.8. Análises microbiológicas do queijo Minas Frescal	40
4.9. Análises sensoriais.....	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1. Composição físico-química do leite.....	44

5.2.	Composição físico-química do soro	44
5.3.	Composição físico-química do Queijo Minas Frescal.....	47
5.4.	pH	50
5.5.	Efeitos da fosfolipase no rendimento de queijo Minas Frescal:.....	52
5.6.	Avaliação microbiológica.....	55
5.6.1.	Contagem de microrganismos mesófilos.....	55
5.6.2.	Contagem de Coliformes totais.....	57
5.6.3.	Contagem de Coliformes termotolerantes	58
5.6.4.	Contagem de Fungos filamentosos e Leveduras.....	60
5.6.5.	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella sp.</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	61
5.7.	Avaliação sensorial	62
5.7.1.	Teste de aceitação	62
6.	CONCLUSÃO	65
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

1. INTRODUÇÃO

Consumido por um público diversificado, o queijo Minas Frescal é um dos produtos mais populares no mercado brasileiro de lácteos, o que demonstra sua importância não só econômica, mas também cultural.

Além da tradição e demanda do mercado, o queijo Minas Frescal é produzido em larga escala devido ao retorno de investimento mais rápido, processamento simples, ausência de período de maturação e um bom rendimento na fabricação.

Com objetivo de alcançar melhores rendimentos na fabricação de queijos, a indústria de laticínios tem utilizado diferentes técnicas para atingir tais resultados. São diversas as abordagens, e dentre elas destacam-se a modernização de equipamentos, a adição de concentrados proteicos e alterações na tecnologia de fabricação, como, por exemplo, a pré-concentração de leite por microfiltração. Todas as técnicas visando à melhoria de rendimento na indústria queijeira.

Além dos desafios tecnológicos envolvendo rendimento, o queijo Minas Frescal caracteriza-se como um produto altamente perecível, devido à alta atividade de água e abundância de nutrientes, que, aliados à baixa acidez do produto, o tornam mais susceptível à contaminação por microrganismos, fazendo com que o desafio de melhoria no rendimento seja ainda maior para este tipo de queijo.

Neste sentido a biotecnologia também tem avançado, buscando soluções para trazer mais eficiência para indústria alimentícia. Algumas enzimas, entre elas lipases e fosfolipases, têm sido reportadas na literatura como alternativas para indústria de alimentos na melhoria na produtividade e funcionalidade de seus produtos.

As fosfolipases aplicadas na fabricação de alimentos vêm sendo apontadas como vantajosas não somente pelo aumento de rendimento e impactos positivos na qualidade dos produtos, mas também como uma proposta sustentável do ponto de vista ambiental, despertando interesse da indústria pela biocatálise por meio de enzimas deste tipo.

Na produção de laticínios, quando adicionadas ao processo convencional, o uso de fosfolipases resulta na modificação da estrutura de parte dos lipídios do leite, criando condições para maior retenção de sólidos e água na coalhada. Tais modificações trazem ganhos em rendimento e também em aspectos sensoriais dos produtos devido ao seu poder emulsificante.

As fosfolipases para aplicação em lácteos foram introduzidas comercialmente no Brasil há poucos anos. Sendo ainda pouco conhecida pelas indústrias de laticínios nacionais. Essas enzimas têm sido utilizadas com resultados satisfatórios nos últimos anos na produção de óleos, na panificação e mais recentemente na indústria de queijos.

As publicações sobre este tema têm demonstrado que queijos produzidos com a utilização de fosfolipases apresentam bom desempenho no que se refere ao rendimento, com maior retenção de gordura na coalhada, isto é, menor perda de sólidos no soro, quando comparadas ao processo convencional.

Contudo, a literatura científica ainda apresenta um reduzido número de publicações relativas à aplicação de fosfolipases na produção de queijos, sendo grande parte das publicações relativas ao emprego desta enzima na produção de Mussarela, em outros países.

Considerando o restrito número de estudos publicados com este tema, especialmente para queijo Minas Frescal, e levando-se em conta a importância socioeconômica deste produto no cenário brasileiro de produção de lácteos, é importante que sejam realizados estudos para a avaliação da enzima como ingrediente na fabricação destes produtos. Soma-se a isso, visando uma avaliação mais abrangente dos impactos desta enzima, a necessidade de experimentos para compreensão dos aspectos sensoriais e microbiológicos dos queijos produzidos com a adição de fosfolipases.

2. OBJETIVO

Este trabalho objetiva estudar a aplicação da enzima comercial fosfolipase na fabricação do queijo Minas Frescal, com vistas ao aumento do rendimento e perda de gordura e proteína no soro, bem como sua influência nas propriedades do queijo.

2.1. Objetivos específicos

- Avaliar a influência da enzima fosfolipase no rendimento de fabricação do queijo Minas Frescal;
- Avaliar a perda de gordura e proteína no soro;
- Avaliar a influência da enzima fosfolipase nas propriedades físico-químicas do leite, soro e queijos produzidos;
- Avaliar os efeitos da enzima fosfolipase sobre as características microbiológicas do queijo Minas Frescal.
- Avaliar os efeitos da enzima fosfolipase sobre as características sensoriais do produto.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Queijo Minas Frescal

A fabricação de queijo Minas Frescal foi iniciada no século XVIII, nas regiões de Minas Gerais onde as pequenas criações de gado de leiteiro eram predominantes. A técnica foi introduzida no país por imigrantes portugueses, dinamarqueses e holandeses na região sul de Minas Gerais e Serra da Mantiqueira. Apesar de atualmente estar presente em quase todo território nacional, o queijo Minas Frescal ainda é muito valorizado por fazer parte da cultura do estado de Minas Gerais (BRASIL, 2016).

Entende-se por queijo Minas Frescal, o queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas. É um queijo normalmente produzido em formato cilíndrico, pesando de 0,3kg a 3,0 kg (MERCOSUL, 1996).

O queijo Minas Frescal possui características físico-químicas e sensoriais próprias, sendo caracterizado como queijo semi-gordo, de alta umidade, a ser consumido fresco. Devido ao seu alto teor de umidade, e pH próximo da neutralidade, é um queijo com validade reduzida, sendo altamente perecível e susceptível a contaminações por microrganismos (MERCOSUL, 1996).

3.2. Qualidade do queijo Minas Frescal

Segundo Silva et al. (2017) a qualidade, muito mais do que a inocuidade dos alimentos, trata-se do conjunto de atributos de um alimento que o tornam preferido pelo consumidor, o que integra naturalmente a exigência da sua inocuidade. Com isso, os cuidados no preparo de alimentos, desde a obtenção da matéria-prima até a obtenção do produto final, objetiva conservar e promover sabor, conteúdo nutricional, com garantia de inocuidade.

Os principais problemas ligados à qualidade do queijo Minas Frescal estão relacionados à má qualidade da matéria-prima, falhas de higiene no processamento e às falhas na cadeia de frio durante seu transporte e comercialização (VISOTO et al, 2011), (SILVA et al, 2017).

A baixa qualidade do leite está relacionada, entre outros fatores, à alta contagem de bactérias. Além deste indicador somam-se outros como a contagem de células somáticas e fatores composicionais (teor de proteínas e gorduras principalmente). A contaminação do leite por micro-organismos é capaz de prejudicar toda a cadeia de produção, e se inicia com falhas em boas práticas agropecuárias (APOLINÁRIO, SANTOS, LAVORATO, 2014).

A qualidade do leite cru utilizado como matéria prima na produção de queijos está diretamente relacionada com as condições higiênico-sanitárias de obtenção. Além do grau de contaminação microbiológica inicial, a qualidade dependerá também do tempo e temperatura em que o leite permanece desde a ordenha até seu processamento na indústria. São considerados microrganismos indicadores de condições higiênico-sanitárias o grupo de coliformes e enterobactérias. Mas além desses, outros grupos como mesófilos e psicrótróficos também são indicativo da qualidade do leite. No Brasil, devido ao processo de granelização do leite e refrigeração do produto nas fazendas após o processo de ordenha, os microrganismos psicrótróficos têm merecido especial atenção pelos prejuízos que podem causar ao leite e qualidade dos derivados. Esses microrganismos se desenvolvem à baixas temperaturas (entre 0°C e 7°C), que corresponde à faixa de temperatura de estocagem do leite cru nas propriedades e no transporte à granel em caminhões isotérmicos (CARDOSO, 2006).

Contaminações por microrganismos também podem ocorrer após o tratamento térmico do leite nas indústrias de processamento, devido a falhas de higiene na produção. Dentre os microrganismos pesquisados com frequência em queijos estão o grupo dos coliformes, de bolores e leveduras, *Staphylococcus* e grupo de microrganismos mesófilos. Normalmente analisados por fazer parte dos requisitos para comercialização, mas também por serem indicadores da eficiência de higiene durante a produção e para melhor controle das etapas de processamento (APOLINÁRIO; SANTOS; LAVORATO, 2014).

Além destes grupos, outros microrganismos como *Salmonella sp.* e *Listeria monocytogenes* também são pesquisados em queijos. São bactérias patogênicas e indicadoras de falhas no processamento e na cadeia de frio de distribuição e comercialização de queijos. Estas bactérias são também monitoradas pelos órgãos de fiscalização como o Serviço de Inspeção Federal (SIF) através do Programa Nacional de Controle de Patógenos do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), tendo papel importante na regulamentação e fiscalização da qualidade dos queijos deste tipo (BRASIL, 2018).

Os queijos inspecionados por órgãos de fiscalização brasileiros devem cumprir requisitos mínimos de qualidade higiênico-sanitária. O queijo Minas Frescal inspecionado pelo SIF, deve apresentar contagens de: Coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Staphylococcus coagulase positiva* e Fungos e leveduras abaixo dos limites estabelecidos. Deve, além disso apresentar ausência, em 25 gramas de produto, de *Salmonella sp.*, e *Listeria monocytogenes* (BRASIL, 2003); (BRASIL, 2006).

3.3. Rendimento de queijos

Durante a fabricação de queijos parte dos componentes do leite é retida na coalhada, principalmente gordura e proteínas (caseína); e outra parte é perdida no soro (água, lactose, soro proteínas e minerais). Portanto, o rendimento pode ser definido como a recuperação de gordura e proteína do leite para o queijo (coalhada), ou ainda como a quantidade em litros de leite para obtenção de um quilograma de queijo (VILELA, 2017).

O rendimento econômico, normalmente expresso em litros de leite por quilo de queijo produzido é um indicador importante, principalmente na determinação de custo de produção. O rendimento de fabricação é considerado como o principal indicador de eficiência e de viabilidade econômica de um processo de fabricação, sendo utilizado como ferramenta para avaliar a necessidade de mudança tecnológica de um procedimento de fabricação (BUZATO, 2011), (FOX, McSWEENEY, 1998).

Já o rendimento técnico, expresso em litros ou quilos de leite gasto por quilo de queijo produzido, é mais amplo e leva em consideração: a composição inicial do leite, composição do soro e a transferência dos constituintes do leite para o queijo (COELHO et al, 2014).

Alguns fatores influenciam diretamente o rendimento na fabricação de queijos, entre eles destacam-se:

- **Composição do leite:** a concentração de proteínas e gordura no leite tem papel fundamental na definição de rendimento. Em relação às proteínas a parcela mais relevante é a caseína, que é a fração coagulável da proteína do leite, devido a presença da K-caseína. Durante a coagulação forma-se o paracaseinato de cálcio, responsável por reter os demais componentes na coalhada (água, lactose e sais). A concentração de gordura também influi no rendimento, sendo um maior teor de gordura responsável por maior retenção de soro durante a fabricação no tanque (PAULA, CARVALHO, FURTADO, 2009).
- **Composição do queijo:** naturalmente quanto maior o teor de água (umidade) maior será o rendimento. Entretanto, é importante observar o percentual de umidade na massa, pois isso influenciará de maneira definitiva o tempo de validade de um queijo (sendo mais reduzido para os queijos com maior umidade, isto é, com maior atividade de água). O controle de umidade é também importante para os queijos que passam por processo de maturação, já que podem ocasionar características indesejáveis no produto final dependendo do teor de umidade final na massa (FURTADO, 2005), (BUZATO, 2011).
- **Corte da coalhada e mexedura da massa:** durante esse processo, ocorre corte do gel formado (coalhada) e a sinérese. A velocidade de corte e o tamanho dos grãos, a intensidade e a temperatura durante a mexedura da massa influenciam no rendimento do queijo. Se realizados de maneira inadequada, pode haver perda excessiva de finos para o soro e conseqüentemente perdas no rendimento final (FURTADO, 2005).

- Resfriamento do leite: Durante o processo de resfriamento do leite, dependendo da temperatura e tempo de exposição ao frio, ocorre a dissociação das caseínas, especificamente a β -caseína, solubilização do fosfato de cálcio coloidal e diminuição no tamanho das micelas. Todos estes efeitos contribuem negativamente para o rendimento na fabricação de queijos (COSTA et al, 2014).
- Contagem de células somáticas (CCS): o aumento da CCS tem sido associado a alterações físico-químicas do leite. Observa-se diminuição da concentração de caseína e aumento na atividade proteolítica e lipolítica do leite com alta CCS. Na produção de queijo, o leite com alta CCS pode levar a formação de gel (coalhada) mais frágil, o que possibilita a perda de caseína, gordura e sólidos totais (finos) para o soro, reduzindo, assim, o rendimento (CASTRO, 2014)
- Tipo de coagulante utilizado: a coagulação enzimática do leite para fabricação de queijos envolve modificação da micela de caseína pela quebra da ligação peptídica entre os aminoácidos fenilalanina e metionina na posição 105 e 106 da K-caseína (ligação Phe 105 – Met 106). Esta hidrólise é provocada pelas enzimas (proteases) do coalho ou de coagulantes, seguida pela agregação, favorecida pelo cálcio, dessas micelas alteradas, para formação do gel ou coalhada. Algumas dessas proteases são mais proteolíticas do que outras, como por exemplo as proteases de origem fúngica dos chamados “coagulantes microbianos”. Essas enzimas têm menor especificidade e são mais proteolíticas, portanto além de hidrolisarem a ligação peptídica 105-106 da K-caseína, seus resíduos continuam degradando peptídeos ao longo da produção e maturação de queijos. Além de perdas em rendimento, devido a não especificidade do coagulante, a sua característica proteolítica pode produzir peptídeos que conferem sabor amargo, causando danos à qualidade final do produto (FOX, McSWEENEY, 1998).

- Tipo de tratamento térmico: o aquecimento prolongado do leite a temperaturas acima de 75°C por 15 a 20 segundos, pode levar a maior desnaturação de soro-proteínas, que se ligam à a K-caseína, dificultando a ação do coagulante. A agregação de soro-proteínas desnaturadas à caseína, pode levar à retenção de maior teor de água na coalhada, aumentando o rendimento. Porém, nestes casos, o maior teor de água retido no coágulo pode levar à defeitos como perda de fatiabilidade e sabor amargo mais precocemente (FOX, McSWEENEY, 1998).

3.4. Lipídeos do leite

O leite é um fluido biológico, secretado pelas fêmeas de mamíferos. Sua composição é bastante variável, dependendo principalmente da espécie, raça, alimentação e estágio de lactação do animal. A concentração de lipídeos no leite pode oscilar bastante de acordo com a espécie, tendo o leite de vaca, em média, 3,5% de gordura. Os demais componentes são água (87%), lactose (4,5%), proteínas (3,2%), minerais (0,8%) e vitaminas (0,1%) (FOX, McSWEENEY, 1998); (ELLOLY, 2011).

Embora o leite aparente ser um líquido homogêneo, apresenta-se como uma mistura bastante complexa. Do ponto de vista físico-químico o leite apresenta-se em três fases: uma parte em solução aquosa, outra organizada num sistema coloidal e uma terceira parte como emulsão (COSTA, FLORES, GIGANTE, 2009).

A maior parte da massa do leite apresenta-se como uma solução aquosa de lactose, vitaminas e sais inorgânicos e orgânicos. Na solução aquosa estão também dispersas proteínas de menor tamanho. As proteínas mais complexas se apresentam como coloides (como exemplo as caseínas). Os lipídeos estão dispersos como uma emulsão de glóbulos de gordura com diâmetro variando entre 0,1 a 20 μm (FOX, McSWEENEY, 1998) (COSTA, FLORES, GIGANTE, 2009).

A gordura está presente na forma de glóbulos, constituídos por um núcleo, composto principalmente de triglicerídeos protegidos por uma membrana lipoprotéica. A maioria dos ácidos graxos encontrados no leite, tanto os saturados como os insaturados, contém em suas cadeias de 2 a 20 átomos de carbono. Outros lipídios presentes no leite são: fosfolipídios, colesterol, ácidos graxos livres, mono e diglicerídios (MANSSON,2008), (FOX, McSWEENEY, 1998).

A gordura presente no leite é sintetizada como pequenos glóbulos no retículo endoplasmático das células secretoras localizadas nas glândulas mamárias. Nesse processo, algumas micro gotas de gordura se fundem no citoplasma e aumentam de tamanho até serem liberadas para o lúmen alveolar (COSTA, FLORES, GIGANTE, 2009).

A liberação dos glóbulos de gordura do leite se dá através da membrana apical da célula, sendo, portanto, os glóbulos cobertos por uma membrana externa derivada da própria membrana da célula mamária. Essa membrana possui uma função importante: impedir a coalescência dos glóbulos e também proteger os glóbulos de gordura da ação de enzimas lipolíticas nativas do leite sobre os lipídios contidos no interior do glóbulo (ELLOLY, 2011).

3.4.1. Fosfolipídeos do leite

Os fosfolipídeos representam menos de 1% dos lipídios totais do leite. Embora quantitativamente tenham baixa contribuição no teor total de lipídios no leite, os fosfolipídios exercem papel particularmente importante na estabilização da gordura do leite evitando a coalescência. Os fosfolipídios são encontrados principalmente na membrana do glóbulo de gordura do leite, com estrutura semelhante à da membrana apical das células secretoras de leite nos mamíferos.

Fosfolipídios são moléculas com duas ligações éster ligadas a ácido carboxílico e duas ligações éster ligadas a grupos fosfato (Figura 1).

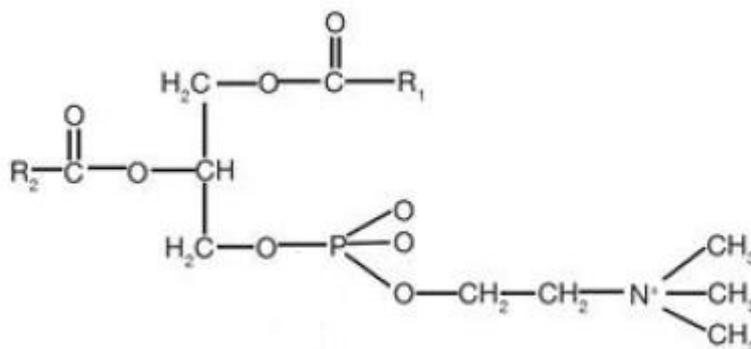


Figura 1: Imagem adaptada de Esteves (2017) que mostra a estrutura geral da molécula de fosfolípido. Onde R1 e R2 representam cadeias de carbono.

A estrutura se divide basicamente em quatro porções: uma molécula de glicerol, constituída de três carbonos. A esta molécula de glicerol se ligam os outros três componentes: um ácido graxo apolar ligado ao glicerol por uma ligação éster, outro ácido graxo ligado ao glicerol via ligação éster, e um grupo fosfato ligado ao glicerol por ligação éster (FICKERS, DESTAIN, THONART, 2008).

Os principais fosfolípidos são a fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e esfingomiéline (Tabela 1) (FOX e MCSWEENEY, 1998).

Tabela 1: Fosfolípidos no leite de diferentes espécies: % molar de cada tipo relativo ao total de fosfolípidos presentes.

Espécie	Fosfolípido					
	Fosfatidil-Colina	Fosfatidil-etanolamina	Fosfatidil-serina	Fosfatidil-inositol	Esfingo-mielina	Lisofosfolípidos
Vaca	34,5	31,8	3,1	4,7	25,2	0,8
Ovelha	29,2	36,0	3,1	3,4	28,3	-
Humano	27,9	25,9	5,8	4,2	31,1	5,1
Cabra	25,7	33,2	6,9	5,6	27,9	0,5

Adaptado de: FOX, MCSWEENEY, 1998.

Os fosfolipídeos tem papel importante na tecnologia de laticínios devido à sua característica anfifílica. Possuem ação emulsificantes e capacidade de estabilizar emulsões (TURCOT, TURGEON, ST-GELAIS, 2001).

Na tecnologia de fabricação de sorvete, que é um produto caracterizado por se apresentar como espuma e também emulsão, tem-se uma mistura de cristais de gelo e água líquida, que acontece, em parte, devido à presença de fosfolipídeos. A presença dos fosfolipídios no sorvete está relacionada também ao aumento de volume no produto (CASADO et al, 2012).

Na produção de leite em pó utilizando-se a tecnologia *spray-dryer*, a camada de fosfolipídios recobre as partículas de pó, aumentando sua estabilidade ao aquecimento (FOX, McSWENEY, 1998).

Na produção de manteiga, os fosfolipídeos estão relacionados à separação de fase durante a etapa de bateção (CASADO et al, 2012).

No creme de leite, os fosfolipídios exercem papel importante na cristalização da gordura do leite, tendo impacto nos aspectos tecnológicos e sensoriais (CASADO et al, 2012), (KARAHAN, AKIN, 2017).

3.4.2. Membrana do glóbulo de gordura do leite

A membrana do glóbulo de gordura do leite (MGGL) consiste em uma complexa camada formada em sua grande parte por lipídeos e proteínas (membrana lipoproteica). No esquema, representado na Figura 2, a MGGL está representada da camada mais interna para a mais externa (VANDERGHEM et al, 2009).

Primeiramente tem-se uma monocamada composta por lipídios polares e proteínas envolvendo a gota de gordura, em seguida uma cobertura proteica e, finalmente, uma bicamada fosfolipídica (com lipídios polares e proteínas). A composição e estrutura é constituída por cerca de 25% de proteínas, principalmente glicoproteínas, e 70% de lipídios, destes em torno de 55-70% são lipídios neutros e 40% lipídios polares (COSTA, FLORES, GIGANTE, 2009).

Variações encontradas na literatura quanto à composição e à estrutura da MGGL refletem os diversos fatores que influenciam essas características, os quais incluem: espécie de animal, raça, estágio de lactação, alimentação, e a

frequência de ordenha. Outras alterações estão relacionadas à qualidade microbiológica do leite; ao tipo de resfriamento, se houve ou não congelamento, danos mecânicos causados principalmente por bombeamento, tratamento com alta pressão, tratamento térmico e homogeneização (VANDERGHEM et al, 2009).

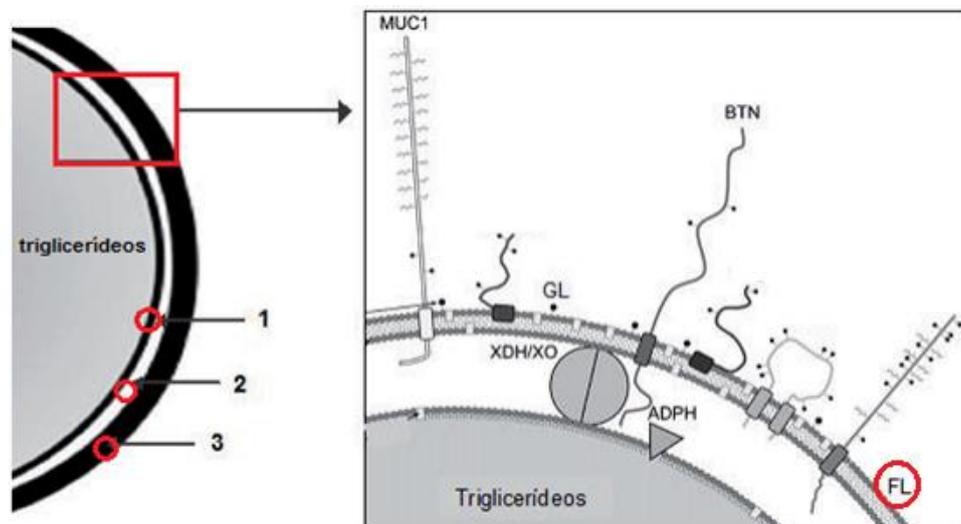


Figura 2: Esquema representativo dos principais componentes da membrana do glóbulo de gordura do leite.

Adaptado de: ELLOLY, 2011

Números: 1: monocamada interna; 2: camada intermediária; 3: bicamada externa.
Siglas: ADPH: adipofilina, MUC1: mucina; BTN: butirofilina; XDO/XO – xantina desidrogenase/xantina oxidase; GL-glicolipídios; FL – fosfolípídeos.

3.5. Lipases

Lipases (triacilglicerol acil-hidrolases; EC: 3.1.1.3) são enzimas difundidas extensamente na natureza e estão presentes nos animais, vegetais e microrganismos (ARAVINDAN, ANBUMATHI, VIRUTHAGIRI, 2006).

As lipases formam uma família heterogênea de enzimas que têm como função biológica catalisar a hidrólise de triglicerídeos de ácidos graxos de ca-

deia longa em glicerol e seus ácidos graxos correspondentes. (DE MARIA, 2007). Essas enzimas foram descobertas no início do século XX como substâncias produzidas por bactérias como *Serratia marcescens*, e *Pseudomonas fluorescens*. Mas apenas na década de 1950 é que houve novas descobertas através de estudos com lipase pancreática de origem suína (FICKERS, DESTAIN, THONART, 2008).

A reação catalítica requer uma molécula de água e por isso as lipases possuem a característica de atuar na interface entre uma solução aquosa e uma não aquosa, o que lhes confere características importantes do ponto de vista tecnológico. A denominação das lipases é dependente da natureza dos substratos hidrolisados preferencialmente, por exemplo, as fosfolipases atuam sobre a hidrólise de fosfolipídeos (KIRK, BORCHERT, FUGLSANG, 2002), (FICKERS, DESTAIN, THONART, 2008).

As lipases têm funções muito diversificadas, e além de sua capacidade de hidrolisar gorduras, essas enzimas podem catalisar outros tipos de reações, como as de esterificação e alcoólise (CARVALHO et al, 2005), (DE MARIA, 2007).

Segundo Fickers, Destain e Thonart (2008) as lipases de origem vegetal são encontradas principalmente nas sementes onde os triglicerídeos são armazenados em maior quantidade. Já nos animais vertebrados as lipases estão relacionadas principalmente ao controle da digestão, absorção e metabolismo de gorduras (FICKERS, DESTAIN, THONART, 2008).

As lipases também estão amplamente distribuídas em microrganismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Os primeiros estudos com lipases foram conduzidos com enzimas de origem animal, contudo o interesse pelas lipases microbianas tem aumentado devido ao grande número de aplicações que essas enzimas oferecem em áreas como medicina, indústria alimentícia, farmacêutica, na síntese de biopolímeros, síntese orgânica e na área ambiental (CARVALHO et al, 2005), (ROVEDA, HEMKEMEIER, COLLA, 2010).

Em geral, as lipases de origem bacteriana têm um pH ótimo próximo da neutralidade (7,0) ou ligeiramente alcalino (8 a 8,5), enquanto que as lipases de origem fúngica possuem um pH ótimo próximo da neutralidade (7,0) ou ligeira-

mente ácido, entre 5,6 e 6,0 por exemplo. No entanto algumas lipases são capazes de catalisar reações de hidrólise em condições mais extremas como, por exemplo, nos mamíferos, em que a lipase gástrica, secretada pela mucosa gástrica, hidrolisa os lipídeos da dieta no estômago em valores de pH próximos de 1,0. A temperatura ótima para atividade das lipases está entre 30 e 40 °C. Em geral, as lipases de origem vegetal e animal são mais sensíveis à temperatura do que as lipases microbianas (PASTORE, COSTA, KOBLITZ, 2003).

Além de pH e temperaturas ótimas de reação, as demais características físico-químicas variam de acordo com a estrutura química da enzima, que por sua vez alteram outras características como a cinética de reação, seletividade e especificidade. As lipases microbianas podem variar bastante quanto a sua conformação e ação sobre os lipídeos, dependendo do microrganismo que as produz (MESSIAS et al, 2011), (PASTORE, COSTA, KOBLITZ, 2003).

A vantagem das lipases microbianas é que os processos de obtenção são relativamente simples se comparado ao processo produtivo de lipases de origem animal. Esse recurso biotecnológico tem permitido o desenvolvimento de muitas aplicações para lipases microbianas, o que resultou em produtos atualmente comercializados e com aplicações bastante variadas e bem-sucedidas (DE MARIA, 2007).

Tabela 2: Variedade de produtos e aplicações de lipases na indústria

Produto	Aplicação
Lecitase ultra™, Novozimes A/S	Degomagem de óleos vegetais comestíveis
Lecitase® 10L, Novozimes A/S	Melhoria de propriedades da gema de ovo
Rohalase®, Zytex	Degomagem de óleos vegetais
YieldMAX™, Chr.Hansesn-Novozimes A/S	Aumento de rendimento de produtos lácteos
Lipopan F™, Novozimes A/S	Panificação (emulsificante/estabilizante)
Gindamyl™, Danisco A/S	Panificação (emulsificante/estabilizante)

Adaptado de: KIRK, BORCHERT, FUGLSANG, 2002, CASADO et al, 2012

3.5.1. Fosfolipases

Fosfolipases são um grupo específico de lipases que tem como função modificar fosfolipídios. É uma classe de enzimas bastante complexa e que está presente em quase todos os seres vivos (DE MARIA et al, 2007), (KARAHAN, AKIN, 2017).

As fosfolipases são classificadas em dois grandes grupos de acordo com o sítio de reação na molécula de fosfolipídio: acil-hidrolases e fosfodiesterases. Isto porque a molécula de lipídio possui duas ligações éster de ácido carboxílico e duas ligações éster ligadas à fosfatos, e são essas posições que determinam seu sítio de ação e nomenclatura. (Figura 3)

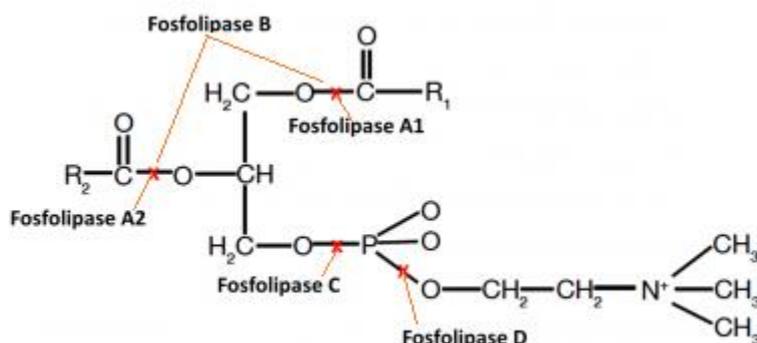


Figura 3: Tipos de fosfolipases e sítios de ação destas enzimas.

Adaptado de ESTEVES, 2017.

As acil-hidrolases incluem as fosfolipases A1, A2, B e liso-fosfolipases A_{1/2}. As acil-hidrolases substituem a cadeia do ácido carboxílico por meio de reações de hidrólise, esterificação e transesterificação.

As fosfodiesterases são representadas pelas fosfolipases C e D (CASA-DO et al, 2012).

A fosfolipase tipo A1 (EC 3.1.1.32) é encontrada em diversos organismos vivos. Esta enzima hidrolisa a ligação acil-éster liberando liso-fosfolipídios e ácidos graxos livres. Esta característica é de interesse na indústria, pois os

liso-fosfolipídios liberados através da hidrólise tem perfil emulsificante, com aplicações industriais que incluem a panificação, indústria de óleos, entre outras (HÖIER, LILBAEK, BROE, 2006). (KARAHAN, AKIN, 2017).

3.6. Utilização de fosfolipases na indústria de alimentos

3.6.1. Fosfolipases tipo A1

Fosfolipases são uma classe variada de enzimas com vasto campo de aplicações industriais, em especial na indústria de alimentos. Alguns tipos de fosfolipases, entre elas as do tipo A1 têm sido aplicadas na indústria de óleo vegetais na etapa de degomagem, que consiste na retirada de fosfolipídeos do óleo. Além da eficiência, o processo de degomagem tem menor impacto ambiental, já que o uso da enzima fosfolipase permite uso de menor quantidade de produtos químicos nesta etapa.

As enzimas fosfolipase tipo A1 de origem microbiana são produzidas através de diferentes tipos fungos as sintetizam, tais como as espécies *Aspergillus oryzae* e *Fusarium oxysporum*. As enzimas de origem microbiana passam por processos de beneficiamento e purificação para serem então utilizadas em larga escala por indústrias de alimentos (CASADO et al, 2012). (KARAHAN, AKIN, 2017).

Dentre as fosfolipases do tipo A1 destacam-se aquelas utilizadas para melhoria de textura e ganho de rendimento na indústria de laticínios. Isto porque dentre os componentes do leite estão os fosfolipídeos, e mesmo em pequenas quantidades na membrana do glóbulo de gordura do leite, tem um papel importante na estabilização da gordura presente no leite (DE MARIA et al, 2007). (KARAHAN, AKIN, 2017).

Aplicações de lipases na indústria de laticínios são mais conhecidas, como por exemplo, a utilização de lipases para melhoria do sabor e aroma de queijos maturados, além de acelerar o processo de cura de alguns queijos. (SOUSA, McSWEENEY, 1999). As pesquisas para aplicação de fosfolipases

na indústria de laticínios vêm se desenvolvendo desde a última década, mas as aplicações de fosfolipases comerciais na indústria de laticínios é mais recente e tem apresentado resultados positivos (HÖIER, LILBAEK, BROE, 2006).

Na indústria de queijos, a utilização de fosfolipases está relacionada à estratégia de aumento de rendimento, ou seja, melhorar as cifras de transição, minimizando as perdas de sólidos no soro e também atuando no ajuste de umidade da coalhada (DE MARIA et al, 2007), (KARAHAN, AKIN, 2017).

A ideia de utilizar fosfolipases do tipo A1 na melhoria do rendimento de fabricação de queijos não era considerada até pouco tempo, e vem sendo testada nos últimos anos como uma nova estratégia tecnológica na área de leite e derivados. Contudo os efeitos destas enzimas na membrana do glóbulo de gordura do leite ainda não são completamente compreendidos (DE MARIA et al., 2007), (TRANCOSO-REYES et al, 2014).

A melhoria do rendimento com a utilização de fosfolipases está associada à hidrólise parcial de fosfolipídeos presentes no leite. Esta reação aumenta a retenção de gordura e umidade na coalhada. Normalmente de 85 a 95% da gordura e 75% da proteína do leite estão retidos na coalhada. Quando se adiciona a enzima, e esta hidrolisa parte dos fosfolipídeos, melhora-se a estabilização da emulsão (partição óleo/água) (CASADO et al, 2012), (LILBAEK et al, 2006), (TRANCOSO-REYES et al, 2014).

Höier, Lilbaek e Broe (2006) relataram em seu experimento que a interação entre fosfolipídeos hidrolisados e proteínas aumentou a retenção de gordura no coágulo, proporcionando aumentos de rendimento que variam entre 0,7% a 3,8 %.

A enzima fosfolipase A1 apresenta-se estável a temperatura de até 45°C. A partir desta temperatura inicia-se o processo de desnaturação, em que as enzimas perdem sua conformação, perdendo, portanto, sua atividade enzimática de forma irreversível. Mais de 90% das fosfolipases A1 são inativadas à temperatura de pasteurização do leite (72 a 75°C por 15 a 20 segundos). (Figura 4).

Em relação ao pH a enzima fosfolipase é estável em uma ampla faixa de pH. Os ácidos fortes inativam a enzima de maneira irreversível.

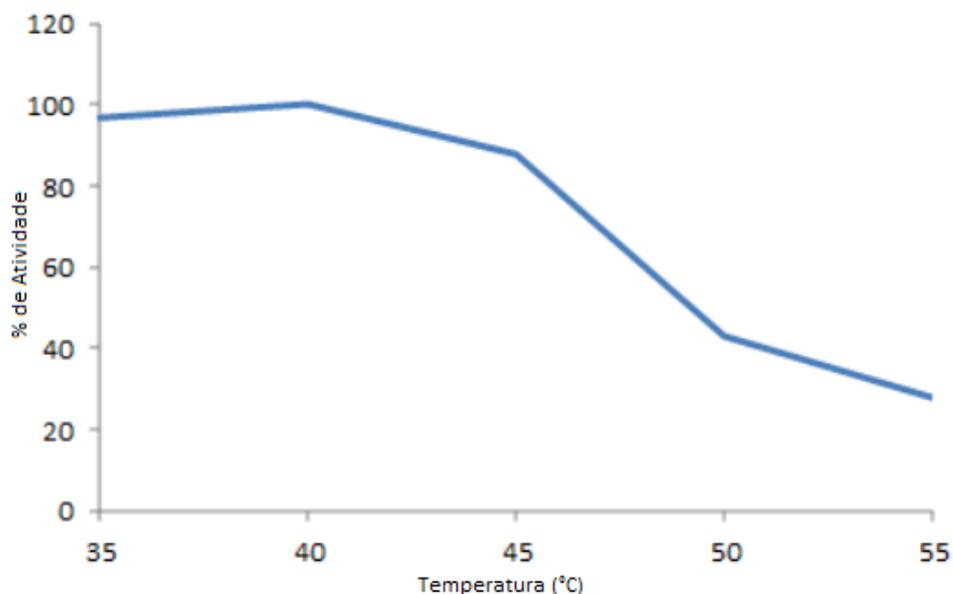


Figura 4: Temperatura ótima de atividade e temperatura de desnaturação da enzima fosfolipase A1 produzida por cepa de fungos *Aspergillus oryzae*.

Adaptado de: Chr. Hansen. Informação de Produto.

3.6.2. Fosfolipases tipo A2, B, C e D

As fosfolipases tipo A2 já têm sido usadas há mais tempo, sendo importante ingrediente emulsificante de gema de ovos para produção de maionese, molhos e indústria de panificação. Na produção de pães e bolos o uso de fosfolipases tipo A2 é mais recente e tem função emulsificante. A enzima modifica fosfolipídeos presentes na farinha produzindo lipídeos hidrolisados ou “lisofosfolipídios”. Estes compostos oriundos da hidrólise dos fosfolipídeos contribuem na umidade da massa, aumentam o tempo de validade do produto, reduzindo também as quantidades de emulsificantes adicionados (CASADO et al, 2012).

As fosfolipases tipo B têm sido testadas em aplicações para biocatálise. Já as fosfolipases tipo C vem sendo utilizadas na fase de degomagem de óleos vegetais com sucesso, diminuindo a adição de outras substâncias químicas e tornando o processo mais eficiente. As fosfolipases tipo D têm sido testadas

em aplicações para as indústrias farmacêutica e cosmética (CASADO et al, 2012).

3.7. Aplicação da enzima fosfolipase

Fosfolipídeos estão presentes em todas as membranas biológicas, incluindo as membranas celulares dos microrganismos. A hidrólise dos fosfolipídios pelas fosfolipases gera produtos tensoativos. A liberação desses produtos a partir da membrana celular pode alterar a estrutura supramolecular, causando alterações no seu funcionamento ou mesmo causar danos ao processo de multiplicação celular (TRANCOSO-REYES, 2014), (KARAHAN, AKIN, 2017).

A composição das membranas de microrganismos inclui lipídeos e fosfolipídeos susceptíveis, portanto, à ação de enzimas capazes de hidrolisá-los. A morfologia das células bacterianas apresenta além de membrana celular fosfolipídica, estrutura da parede celular. A forma como a parede celular está organizada classifica-as em bactérias Gram positivas ou negativas (CHR. HANSEN, 2017).

Membranas de fungos filamentosos e leveduras possuem também estrutura fosfolipídica semelhante, contudo a parede celular que as reveste tem composição química distinta, sendo caracterizado pela presença quitina (FUKUDA et al, 2009).

A ação das fosfolipases sobre células neste sentido tem sido pesquisada também no âmbito de alimentos. Foi relatado em Ha-La Biotec (CHR. H, 2017) diferenças entre a contagem de coliformes em queijos produzidos com esta enzima, em comparação ao tratamento controle sem aplicação. Embora em outro experimento conduzido por Trancoso-Reyes, et al (2014) que utilizaram enzima fosfolipase A1 na produção de queijo Chihuahua, tenha-se concluído que a adição desta enzima na produção de queijos não alterou de forma significativa os micro-organismo produtores de exopolissacarídeo que foram adicionados na fabricação na forma de cultura láctea.

3.8. Legislação: uso de coadjuvantes de tecnologia no Brasil

No Brasil as preparações enzimáticas são regulamentadas pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) através da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n° 53 e a RDC n° 54 de 07 de outubro de 2014. As fosfolipas tipo A1 e A2 estão previstas na lista de enzimas de origem microbiana que podem ser utilizadas na produção de alimentos em geral no Brasil (BRASIL, 2014).

O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) prevê o uso de ingredientes e coadjuvantes de tecnologia no preparo de queijo Minas Frescal por meio da Portaria n°352 de 04 de setembro de 1997 - “Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) do queijo Minas Frescal” (BRASIL, 1997).

A Portaria n°352 de 1997 faz referência à Portaria n°146 de 1996 (“Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Queijos”) quando trata do uso de coadjuvantes de tecnologia ou elaboração no queijo Minas Frescal. Esta Portaria, n°146 de 1996, prevê o uso coadjuvantes de tecnologia para os “queijos de muito alta umidade tratados termicamente”. Já para as demais classificações de queijo, a Portaria n° 146/1996 não especifica se os coadjuvantes poderão ou não ser utilizados, bem como tipos e dosagens permitidas para cada classe de queijos (BRASIL, 1996).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Localização

A produção do queijo Minas Frescal foi realizada na Usina de Beneficiamento de Leite da Cooperativa dos Cafeicultores da Zona de Três Pontas Ltda.(COCATREL), situada em Três Pontas, Minas Gerais.

As análises microbiológicas e físico-químicas foram realizadas no laboratório da Usina de Beneficiamento da COCATREL.

As análises de teor de proteína no leite, soro e queijos foram realizadas no Laboratório de Pesquisa do Instituto de Laticínios Cândido Tostes (ILCT) em Juiz de Fora, Minas Gerais.

As análises para pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella sp.* nas amostras utilizadas para teste sensorial foram realizadas pelo Laboratório de ensaios Iberpharm, localizado em Machado – Minas Gerais e acreditado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA).

4.2. Delineamento experimental e análises estatísticas

As avaliações do efeito da enzima fosfolipase sobre o rendimento, teor de gordura e proteína no soro, aspectos físico-químicos do queijo, leite e soro foram realizadas em esquema de blocos casualizados. Cada produção representou um bloco, visando reduzir ou eliminar a influência do tempo ao longo dos experimentos.

Sendo assim, o estudo foi dividido em três blocos experimentais onde cada partida de leite foi dividida em volumes iguais e submetida aos dois tratamentos: tratamento controle sem adição de enzima fosfolipase e tratamento com adição de enzima fosfolipase. As medições foram efetuadas a cada etapa dentro de cada processamento para ambos os tratamentos.

Para as análises microbiológicas (mesófilos, coliformes totais e termotolerantes, fungos filamentosos e leveduras) e de pH o experimento foi conduzido em blocos casualizados em parcelas subdivididas ao longo do tempo (3 dias,

12 dias e 23 dias), a fim de avaliar não somente as diferenças entre os tratamentos mas também sua evolução ao longo do tempo de estocagem.

A análise de variância (ANOVA) foi utilizada em ambos os delineamentos estatísticos para avaliar o efeito dos tratamentos sobre o rendimento, composição físico-química dos queijos, leite e soro e aspectos microbiológicos do produto. Foi utilizado o Teste t de Student para comparação das médias entre os dois tratamentos considerando-se nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

A avaliação da aceitação pela aplicação da escala hedônica foi organizada em delineamento em blocos casualizados. Foi utilizada a análise de variância (ANOVA) para avaliação e comparação de médias dos testes sensoriais. Utilizou-se o Teste t de Student para comparação das médias de aceitação, considerando-se nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

Para a avaliação da preferência foi realizada utilizando-se o teste não paramétrico de McNemar, para dados pareados, considerando-se nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa estatístico SISVAR 5.6 (FERREIRA, 2011). As análises do teste de preferência foram realizadas na ferramenta on-line OpenEpi (DEAN, SULILIVAN, SOE, 2019).

4.3. Enzima fosfolipase: aplicação em função do parâmetro composicional.

Devido à sua ação específica em fosfolípidios, a enzima fosfolipase é adicionada ao tanque de fabricação em função do teor de gordura do leite a ser utilizado na produção. Sendo que a força da enzima fosfolipase utilizada é expressa em *Lecitase units* (LEU-P). Sendo a recomendação técnica a dose de 5 LEU-P para cada unidade de gordura do volume a ser utilizado na produção.

Com base na ficha técnica fornecida pelo fabricante da enzima (Yield Max®-Christian Hansen), que recomenda 5 LEU-P para cada grama de gordura presente no leite, foi então calculada a quantidade de enzima conforme a equação:

$$V \times G = U \quad (1)$$

Onde:

V: volume de leite em litros

G: teor de gordura do leite em % (m/v)

U: gramas de gordura no montante de leite utilizado

A força da enzima fosfolipase utilizada (YieldMAX®) foi de 2300 LEU-P/ mL.

Assim temos:

$$(U \times 5) / 2300 = E \quad (2)$$

Onde:

U: gramas de gordura no leite (equação 1)

E: quantidade em mL a ser utilizada no tanque de fabricação.

4.4. Tecnologia de fabricação do queijo Minas Frescal

As fabricações foram realizadas em blocos de três repetições para cada tratamento – tratamento controle (sem fosfolipase) e tratamento com adição de enzima fosfolipase. As produções ocorreram ao longo de 5 semanas consecutivas, com intervalo de 20 dias entre a execução das repetições. Portanto, foram aplicados dois tratamentos tecnológicos distintos em cada dia de fabricação, utilizando-se de um mesmo lote de leite como matéria-prima, para diminuir a fonte de variação. Para cada tratamento, foram utilizados tanques com capa-

cidade de 1500 litros de leite. No total, foram executadas seis fabricações, sendo três repetições para cada tratamento.

A padronização do teor de gordura no leite utilizado na produção foi realizada em centrífuga padronizadora instalada na linha de beneficiamento de leite, em etapa prévia à pasteurização, conforme esquema da Figura 5. Centrífuga utilizada marca Westfalia Separator – MTA50.

Foi adotada a pasteurização em trocador de calor a placas (HTST – *hight temperature short time*) com binômio tempo/temperatura de 75°C por 15 segundos. Trocador de calor a placas marca Dantherm, modelo XTS, ajustado para vazão de 4500 litros/hora.

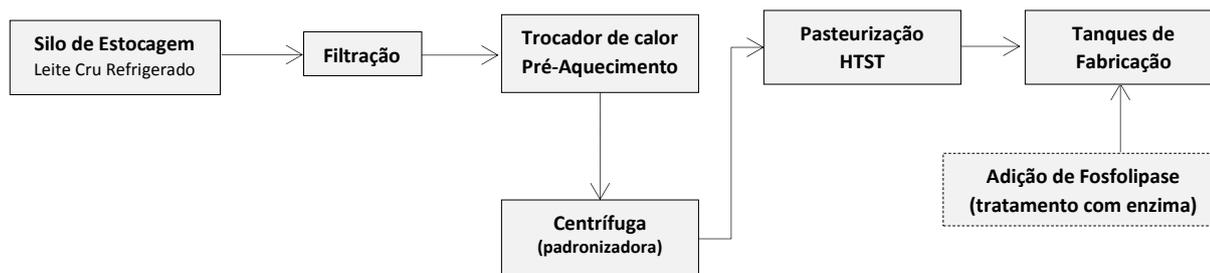


Figura 5: Esquema de processamento do leite adotado no experimento.

Própria autoria, 2019.

A tecnologia de fabricação aplicada para cada tratamento seguiu as etapas conforme descrito no fluxograma da Figura 6.

As etapas 2 e 5 representadas por linhas pontilhadas na Figura 5 foram realizadas somente para o tratamento com adição de enzima fosfolipase. Sendo assim, na produção dos queijos controle, sem adição de fosfolipase, as etapas foram as mesmas, em mesma sequência, com exceção das etapas número 2 e número 5.

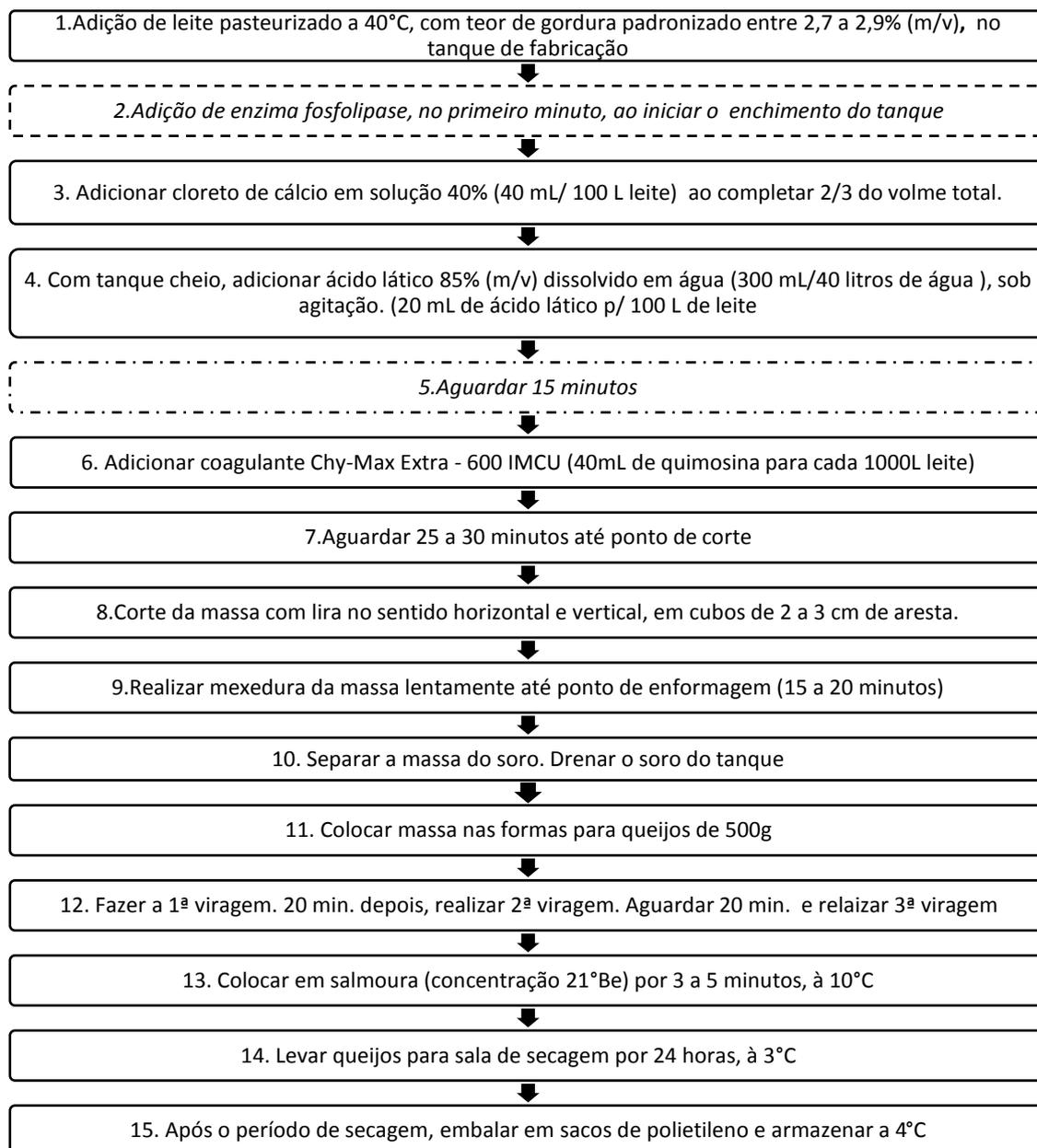


Figura 6: Fluxograma de produção do queijo Minas Frescal.

Adaptado de PAULA (2010).

4.5. Análises físico-químicas do leite e soro

As análises de teor percentual de gordura (% m/v), extrato seco total (% m/v), acidez (°D) e densidade à 15°C (g/mL) das amostras de leite e soro foram

realizadas na data da fabricação dos queijos. Os ensaios foram realizados em triplicata. As análises foram feitas de acordo com os métodos preconizados na Instrução Normativa nº 68/2006 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. (BRASIL, 2006)

As amostras para análises de teor de proteína total (%m/v) no leite e soro foram coletadas durante a produção e armazenadas em refrigerador à 3°C para serem transportadas e foram analisadas no terceiro dia após a data de fabricação no laboratório de físico-química da EPAMIG Instituto de Laticínios Cândido Tostes em Juiz de Fora - MG. As análises de proteína total (%m/v) no leite e no soro foram realizadas de acordo com método descrito por Pereira et al (2001). Sendo o fator de conversão utilizado para o cálculo de proteína total igual a 6,38.

As amostras de leite foram coletadas após 10 minutos do início do enchimento dos tanques. As amostras de soro foram coletadas após 10 minutos de mexedura da massa no tanque de fabricação.

4.6. Análises físico-químicas do queijo Minas Frescal

As análises de teor percentual de gordura, teor percentual de umidade, teor percentual de proteína e pH do queijo Minas Frescal foram realizadas no 3º dia de estocagem do produto, em triplicata.

As análises de teor de gordura do queijo Minas Frescal foram realizadas segundo a Instrução Normativa 68 de 2006. (BRASIL, 2006).

As análises de pH foram determinadas por meio de eletrodo de pH e dispositivo eletrônico marca Digimed modelo DM-2.

As análises de umidade foram realizadas em analisador de umidade por infravermelho marca Gehaka modelo IV3100. Foram utilizados 2,0 gramas de amostra triturada, colocada no analisador de umidade com ajuste de tempo e temperatura para 5 minutos e 180°C.

As análises de proteína total (% m/v) do queijo Minas Frescal foram realizadas de acordo com Pereira et al (2001). Primeiramente foi realizada análise de determinação do percentual de nitrogênio total (% m/m) pelo método Kjeld-

dahl. Para determinação do teor percentual de proteína total (m/m) foi multiplicado pelo fator de conversão 6,38.

4.7. Análises de rendimento

Para as análises de rendimento foram utilizados os teores de proteína, gordura e densidade obtidos através das análises físico-químicas de soro e leite, e também utilizados os volumes (ou massa, multiplicando-se pela densidade) de leite utilizado em cada uma das produções do queijo Minas Frescal.

4.7.1. Cálculo e aferição do volume de leite

Para realizar a fabricação dos queijos foi utilizado tanque retangular, em aço inox AISI 304 com capacidade de 1500 litros. O volume de leite contido no tanque foi obtido a cada produção utilizando medidor de vazão (marca Globo Inox – modelo VM) e aferido no tanque por meio de régua em aço inox com graduação em centímetros após estabilização do leite.

4.7.2. Cálculos de rendimento e cifras de transição

O percentual de cifras de transição de gordura no soro de leite é calculado pelo método técnico de acordo com a Equação 3. (PAULA et al, 2019), (FURTADO, 2005).

$$\text{Perda de gordura (\%)} = (Kgl - P) Gs \times 100 / (Kgl / DI) Gl \times Ds \quad (3)$$

Onde:

Kgl: quilogramas de leite;

P: produção de queijo em quilogramas;

Gs: teor percentual de gordura no soro;

Gl: teor percentual de gordura no leite;

DI: densidade do leite em kg/l, à 15°C;

Ds: densidade do soro em kg/l, à 15°C.

O percentual de cifras de transição de proteína no soro é calculado pelo método empírico de acordo com a Equação 4.

$$\text{Perda proteína (\%)} = \text{Ps} \times 100 / \text{PI} \quad (4)$$

Onde:

Ps: teor percentual de proteína no soro;

PI: teor percentual de proteína no leite.

O percentual de cifras de transição de proteína no soro foi calculado pelo método técnico de acordo com a Equação 5. (PAULA et al, 2019), (FURTADO, 2005).

$$\text{Perda proteína (\%)} = (\text{Kgl} - \text{P}) \times \text{Ps} \times 100 / (\text{kg/l} / \text{DI}) \text{PI} \times \text{Ds} \quad (5)$$

Onde:

Kgl: quilogramas de leite;

P: produção de queijo;

Ps: teor percentual de proteína no soro;

DI: densidade do leite em kg/l, à 15°C;

PI: teor percentual de proteína no leite;

Ds: densidade do soro em kg/l, à 15°C.

O Rendimento em litros de leite por quilograma de queijo ajustado (L/kg^A), é calculado conforme equação 6 abaixo:

$$\text{L/kg}^A = \text{V} (100 - \text{UP}) / \text{P} \times \text{ST} \quad (6)$$

Onde:

V: volume de leite em litros

P = porcentagem de umidade comum fixada (desejada) em 63% para o queijo Minas Frescal

ST = porcentagem de sólidos totais no queijo.

O valor obtido como “rendimento em litros por quilograma ajustado” ou L/kg^A na equação 6 pode ser expresso também em “quilogramas de queijo produzidos por 100 quilogramas de leite” ou “kg queijo / 100 kg leite” que é definido como rendimento atual.

O rendimento atual (Ra) é a quantidade de queijo, em quilogramas, produzida com 100 kg de leite. E o rendimento atual ajustado (Raj) é o rendimento em litros por quilo ajustado (L/kg^A) expresso na forma de “kg queijo/ 100 kg leite”.

4.8. Análises microbiológicas do queijo Minas Frescal

Para avaliação microbiológica foram coletadas amostras da produção controle e da produção realizada com adição da enzima fosfolipase. Foram realizadas análises em triplicata de cada amostra, em três tempos distintos: 2º, 12º e 23º dias de estocagem.

As análises microbiológicas foram feitas com o objetivo de avaliar possíveis influências da utilização de fosfolipase nos queijos frente aos queijos da produção controle. Além disso, as análises visaram garantir a inocuidade dos queijos destinados às avaliações de perfil sensorial.

Foram realizadas análises de mesófilos aeróbios, coliformes totais e coliformes termotolerantes, fungos filamentosos e leveduras.

Para as amostras submetidas ao teste sensorial, além das análises já mencionadas, foram realizados também análises para presença de Salmonela, Listeria e contagem de *Staphylococcus aureus*.

- Contagem de coliformes totais e coliformes termotolerantes: o preparo de amostras e a diluição das amostras foram realizados segundo a Instrução Normativa 62 de 2003. Foram utilizadas alíquotas de 1ml, das respectivas

diluições, e inoculadas em placas prontas do kit rápido 3M™ Petrifilm™ (Placas para Contagem de Coliformes – CC). Placas para análise de coliformes totais foram incubadas por 24h a $32^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, conforme método AOAC 986.33. Placas para análise de coliformes termotolerantes foram incubadas à $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, conforme método AFNOR-3M 01/2 – 09/89C. (3M COMPANY). (BRASIL, 2003). Para preparo e diluição das amostras foi utilizada solução salina peptonada 0,1%.

- Contagem microrganismos mesófilos aeróbios: o preparo de amostras, a diluição e a inoculação foram realizadas segundo a Instrução Normativa 62 de 2003. Para os ensaios foram utilizadas alíquotas de 1,0 ml das respectivas diluições realizando a semeadura da amostra em placas de Petri. Foi utilizado meio de cultura ágar padrão para contagem (PCA – *plate count agar*), conforme IN 62/2003. Para preparo e diluição das amostras foi utilizada solução salina peptonada 0,1%. As placas foram incubadas invertidas à $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. (BRASIL, 2003).
- Contagem de fungos filamentosos e leveduras: foi utilizada metodologia descrita na Instrução Normativa 62/2003. Para os ensaios foram utilizadas alíquotas de 0,1 ml das respectivas diluições realizando a semeadura da amostra em superfície das placas de Petri contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA) acidificado com ácido tartárico a 10% para ajuste de pH em 3,5. O preparo de amostras foi realizado utilizando solução salina peptonada 0,1%. As placas foram incubadas à 25°C por 5 dias. (BRASIL, 2003).
- O preparo de amostra e diluição para as análises de *Staphylococcus aureus* foram realizadas segundo metodologia descrita na Instrução Normativa 62/2003. Para a inoculação das amostras foi utilizado o kit de placas prontas Compact Dry XSA (“Placas para contagem de *Staphylococcus aureus*”). Foram utilizadas alíquotas de 1,0 ml das respectivas diluições para semeadura diretamente nas placas prontas e incubadas à $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, conforme instruções do fabricante Compact-Dry-R-Biopharm. (R-biopharm, 2019).

- As análises de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp. foram realizadas segundo Instrução Normativa 62/2003 e foram executadas pelo Laboratório Iberpharm, em Machado – MG, mediante contratação do serviço pela COCATREL.

4.9. Análises sensoriais

Para a avaliação sensorial dos queijos, foram utilizados os testes de aceitação e preferência. A aceitação foi avaliada por meio da aplicação da escala hedônica de nove pontos (MINIM, 2006), conforme Figura 7. Foi utilizado também teste de McNemar para comparação pareada.

Os testes de aceitação e comparação pareada foram realizados utilizando-se queijo controle e queijos com enzima, produzidos na mesma data. A avaliação sensorial ocorreu após 12 dias de estocagem destes queijos. As amostras de queijo Minas Frescal foram apresentadas em cubos de aproximadamente 3 cm³, codificados com 3 dígitos aleatórios.

Participaram dos testes 40 provadores, selecionados aleatoriamente, representando possíveis consumidores do produto testado. Os provadores realizaram a degustação dos queijos na sede administrativa da COCATREL, entre eles colaboradores e cooperados que acessam o local diariamente. Os provadores foram conduzidos à bancada do refeitório, individualmente, para prova dos queijos. Cada participante provou aleatoriamente uma amostra de cada um dos tratamentos (controle e com tratamento enzimático), sendo oferecido um copo de água entre uma amostra e outra. Após cada amostra assinalaram as respostas no formulário da Figura 7.

Além das análises de coliformes totais, termotolerantes, mesófilos e fungos filamentosos e leveduras, o lote de queijos controle e queijos com enzima oferecidos aos voluntários foram testados para presença de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp, e contagem de *Staphylococcus aureus* a fim de garantir a inocuidade dos produtos oferecidos aos voluntários.

FORMULÁRIO RESPOSTA – Avaliação Sensorial / Aceitação	
NOME:	
DATA:	
Avalie a amostra provada usando a escala abaixo para descrever o quanto você gostou ou desgostou do produto. Marque a posição da escala que melhor reflita seu julgamento. A seguir , assinale sua preferência.	
Código da amostra:	Código da amostra:
<input type="checkbox"/> gostei extremamente	<input type="checkbox"/> gostei extremamente
<input type="checkbox"/> gostei muito	<input type="checkbox"/> gostei muito
<input type="checkbox"/> gostei moderadamente	<input type="checkbox"/> gostei moderadamente
<input type="checkbox"/> gostei ligeiramente	<input type="checkbox"/> gostei ligeiramente
<input type="checkbox"/> Indiferente	<input type="checkbox"/> Indiferente
<input type="checkbox"/> Desgostei ligeiramente	<input type="checkbox"/> Desgostei ligeiramente
<input type="checkbox"/> Desgostei moderadamente	<input type="checkbox"/> Desgostei moderadamente
<input type="checkbox"/> Desgostei muito	<input type="checkbox"/> Desgostei muito
<input type="checkbox"/> Desgostei extremamente	<input type="checkbox"/> Desgostei extremamente
Assinale abaixo a sua opção após avaliar as amostras	
<input type="checkbox"/> prefiro amostra “____” <input type="checkbox"/> prefiro amostra “____” <input type="checkbox"/> não há diferença	

Figura 7: Modelo de formulário resposta para teste sensorial

Própria autoria, 2019.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Composição físico-química do leite

A composição média dos leites, destinados às fabricações dos queijos Minas Frescal com e sem enzima fosfolipase encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3: Composição físico-química do leite destinado às fabricações dos queijos Minas Frescal *

Variáveis	Tratamentos	
	Controle (TC)	Com enzima (TE)
Acidez**	15,1±0,1 ^a	15,2±0,2 ^a
Gordura (% m/v)	2,8±0,15 ^a	2,8±0,17 ^a
Proteína (%m/m)	3,4±0,07 ^a	3,6±0,41 ^a

Fonte: o autor.

^a médias seguidas pela mesma letra minúscula, na linha, não diferem significativamente entre si ($P>0,05$), pelo Teste de t Student. $n=2$.

*(média + desvio padrão);

** cada 1°D corresponde a 0,1g/L de compostos ácidos expressos como ácido láctico

A análise de variância (ANOVA) não indicou diferenças significativas ($P>0,05$) para os constituintes gordura e proteína do leite. Este resultado também foi observado por Lilbaek et. al (2006) ao utilizar enzima fosfolipase no leite para a produção de queijo Mozzarella.

O teor de proteína e a acidez do leite também não sofreram alterações entre os tratamentos ($P>0,05$), indicando que a adição de fosfolipase não impactou significativamente os resultados dessas análises no leite tratado com a enzima quando comparado ao tratamento controle, sem enzima.

5.2. Composição físico-química do soro

A composição média das amostras de soro coletadas na produção controle e na produção com tratamento dos queijos Minas Frescal encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4: Composição físico-química do soro proveniente da produção de queijo Minas Frescal com e sem utilização de enzima fosfolipase.

Variáveis	Tratamento	
	Controle (TC)	Com enzima (TE)
Acidez (°D)**	10,0±0,00 ^a	10,7±0,47 ^a
Gordura (% m/v)	0,3 ±0,03 ^a	0,2 ±0,04 ^b
Proteína (%m/v)	0,9 ±0,07 ^a	0,8 ±0,05 ^a

Fonte: o autor.

^{a,b} médias seguidas pela mesma letra minúscula, na linha, não diferem significativamente entre si ($P>0,05$), pelo Teste de t Student, $n=2$

** cada 1°D corresponde a 0,1g/L de compostos ácidos expressos como ácido láctico

A acidez não sofreu alteração entre os tratamentos ($P>0,05$), assim como observado na acidez do leite. A adição da fosfolipase não alterou significativamente a acidez do soro quando comparado ao soro oriundo do tratamento controle.

O teor de gordura no soro do tratamento com enzima foi menor do que os encontrados para o tratamento controle, assim, nota-se que perda de gordura no soro do tratamento com enzima foi significativamente menor ($p<0,05$) do que a perda de gordura no soro do tratamento controle.

Segundo Lilbaek et al (2006), a hidrólise dos fosfolipídios leva à liberação de “lisofosfolipídios” que são excelentes emulsionante por serem menos hidrofóbicos e, portanto, mais solúveis em água, alterando assim a tensão superficial, levando a maior estabilidade da emulsão óleo-água. Assim, o resultado pode ser explicado pela ação da enzima, que promove o aumento da concentração de lisofosfolipídios. Esses por sua vez têm propriedades emulsificantes, promovendo maior retenção de água e gordura na coalhada.

O resultado encontrado, no entanto é divergente daquele apresentado por Trancoso-Reyes et al (2014) que não encontraram diferenças significativas entre os teores de gordura do soro comparando-se o tratamento controle e o

tratamento com enzima fosfolipase. Os resultados foram significativamente diferentes apenas quando o tratamento aplicado foi a combinação de fosfolipase e cultura lática produtora de EPS; apenas nesta situação o teor de gordura no soro do tratamento testado foi inferior ao tratamento controle.

O resultado encontrado por Lilbaek et al (2006) também é divergente do resultado encontrado neste experimento. Lilbaek et al (2006) não encontraram diferenças significativas entre o teor de gordura do soro proveniente das produções de queijo Mozzarella realizadas com uso de fosfolipase comparado ao tratamento controle sem adição da enzima.

Nos experimentos realizados por Lilbaek et al (2006) e Trancoso-Reyes et al (2014) a aplicação da enzima fosfolipase se deu em queijos com tamanho de grão menor quando comparados ao queijo Minas Frescal. Os grãos do queijo Minas Frescal sendo maiores podem ter permitido uma maior interação entre gordura devido à ação das fosfolipases. No caso dos outros queijos, como Mozzarella e Chihuahuas testados, como o grão é menor a intervenção no corte pode provocar maiores perdas e resultado da ação enzimática pode não ser significativo.

Já o teor de proteína no soro proveniente da fabricação controle e da fabricação com enzima fosfolipase não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$). Apesar de uma provável maior interação dos liso-fosfolipídios com as proteínas do leite na produção realizada com fosfolipase, conforme relatado por Höier, Lilbaek, e Broe (2006), não houve diferença significativa que pudesse alterar do teor de proteína total do soro proveniente da produção dos queijos Minas Frescal neste experimento.

O resultado também foi encontrado por Trancoso-Reyes et al (2014) que relataram não haver diferenças significativas entre os teores de proteína total do soro comparando-se o tratamento controle e o tratamento com enzima fosfolipase na produção do queijo típico mexicano Chihuahua. O mesmo resultado, relativo ao teor de proteína no soro, foi encontrado por Lilbaek et al (2006) que relataram não haver diferenças significativas entre os tratamentos com e sem fosfolipase na produção de queijo Mozzarella.

5.3. Composição físico-química do Queijo Minas Frescal

As variáveis físico-químicas analisados nas amostras de queijo Minas Frescal encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5: Análises físico-químicas dos queijos Minas Frescal produzidos *

Variáveis	Tratamento	
	Controle (TC)	Com enzima (TE)
Umidade (% m/m)	63,8 ± 0,09 ^a	64,2 ± 0,11 ^b
Gordura (% m/v)	15,7 ± 0,29 ^a	16,0 ± 0,21 ^a
GES** (%m/m)	43,3 ± 0,78 ^a	44,8 ± 0,61 ^b
Proteína (%m/v)	14,4 ± 0,54 ^a	14,5 ± 0,69 ^a

Fonte: o autor.

^a médias seguidas pela mesma letra minúscula, na linha, não diferem significativamente entre si ($P > 0,05$), pelo Teste de t Student. $n=2$.

* (média + desvio padrão);

**GES: gordura no extrato seco em %

- Umidade:

A análise de variância indicou diferença significativa para o teor percentual de umidade dos queijos entre os tratamentos ($p < 0,05$). Os queijos produzidos com a enzima fosfolipase apresentaram umidade percentual maiores do que o queijo produzido sem aplicação da enzima. Este resultado era esperado e pode ser explicado pelo efeito da enzima, que ao hidrolisar fosfolipídeos, aumenta a concentração de lisofosfolipídios no meio. E estes, por sua vez, estão associados à capacidade de se ligar à água, e podem também influenciar no aumento de umidade indiretamente, através da retenção de água devido à formação de uma rede por ligarem-se às proteínas do meio. Segundo Lilbaek et al (2006) os lisofosfolipídios podem interagir com proteínas do leite, contribuindo neste processo. No entanto, segundo Lilbaek et al (2006), os mecanismos envolvidos nesta interação ainda não são totalmente compreendidos. As interações entre liso-fosfolipídios, fosfolipídios e proteínas foram testados também no

experimento de Turcot et al (2001) que utilizaram leiteiro na produção de queijo Cheddar com a finalidade de aumento da concentração de fosfolipídios, que resultou em maior percentual de umidade no queijo Cheddar.

Resultados obtidos por Lilbaek et al (2006) também indicaram diferença significativa entre o teor de umidade dos queijos Mozzarella produzidos com e sem aplicação de fosfolipase, tendo o tratamento com aplicação da enzima apresentado percentual de umidade superior se comparado ao controle.

Em contradição, no experimento conduzido por Trancoso-Reyes et al (2014) os resultados obtidos para o teor de umidade entre os tratamentos com e sem utilização de fosfolipase foram iguais, não sendo portanto observada diferença significativa no teor de umidade para o experimento realizado na fabricação do queijo mexicano Chihuahua.

Do ponto de vista da legislação e do padrão de identidade e qualidade para o queijo Minas Frescal, o valor médio de umidade apresentado pelos queijos deste estudo, segundo classificação dada pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Queijos (RTIQ) (Portaria nº 146/1996), classificaria como queijo de muito alta umidade, por apresentar umidade superior a 55% (BRASIL, 1996).

- Gordura

O teor percentual de gordura dos queijos Minas Frescal produzidos nos tratamentos não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$). Analisando o resultando obtido nas análises do soro, em que nota-se uma menor perda de gordura no tratamento realizado com uso de fosfolipase esperava-se um resultado diferente, ou seja, uma maior retenção de gordura nos queijos com aplicação de fosfolipase. Este resultado pode ser atribuído a possíveis variações inerentes ao processo produtivo em maior escala e à própria complexidade da matriz do queijo, que sofre influência de vários fatores durante a produção.

Ainda em relação ao teor de gordura, o experimento realizado por Trancoso-Reyes et al (2014) também não encontrou diferenças significativas entre o tratamento controle e o tratamento realizado com fosfolipase na produção do queijo Chihuahua. A diferença entre os teores de gordura percentuais entre o tratamento controle e o tratamento teste só foi encontrada quando os pesqui-

sadores utilizaram a enzima fosfolipase combinada à cultura lática produtora de exopolissacarídeo (EPS).

- GES

Tendo o experimento encontrado diferença significativa ($P < 0,05$) para teor de umidade entre os tratamentos, somado ao fato de não ter ocorrido diferença significativa ($P > 0,05$) para o teor de gordura entre os tratamentos, era esperado que o percentual de gordura no extrato seco (GES) entre os tratamentos fosse diferente. O resultado da Tabela 5 apresenta os valores de GES e observa-se que este é significativamente maior para o tratamento com enzima fosfolipase quando comparado ao controle.

- Proteína

O teor percentual de proteína total no queijo Minas Frescal não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos ($P > 0,05$). Resultado semelhante ao encontrado por Lilbaek et al (2006) que não encontrou diferença significativa entre os teores de proteína total dos queijos produzidos com e sem utilização de fosfolipase.

Por outro lado o resultado diverge do experimento conduzido por Trancoso-Reyes et al (2014) que obtiveram teor de proteína superior no tratamento com enzima fosfolipase quando comparado ao tratamento controle.

- Escala de produção:

Assim como o resultado obtido para teor de proteína no queijo, as diferenças e similaridades encontradas entre os demais parâmetros comparados e discutidos anteriormente (gordura, umidade e GES) podem ser explicado pelas diferenças na tecnologia de fabricação entre os queijos, uma vez que os queijos Chihuahua produzidos nos experimentos de Trancoso-Reyes et al (2014) não passaram por etapa de filagem como no caso do queijo Mozzarella do experimento conduzido por Lilbaek et al (2006). Sendo que, do ponto de vista da similaridade entre as tecnologias de fabricação e características do produto final, o queijo Minas Frescal testado neste estudo seria mais próximo ao queijo Chihuahua testado por Trancoso-Reyes (2014) do que ao queijo de massa filada testado por Lilbaek et al (2006). Sendo assim, os resultados esperados nes-

te estudo para a composição dos queijos Minas Frescal, deveriam ser maior similaridade ao queijo Chihuahua. O que não foi observado, como por exemplo, no que se refere ao teor de proteína, em que os resultados foram divergentes entre o presente estudo e os resultados obtidos por Trancoso-Ryes et al (2014).

Essas diferenças podem ser explicadas pelo volume de leite e tipo de ensaio realizado. Trancoso-Ryes et al (2014) produziram miniaturas do queijo Chihuahua, em escala laboratorial, com partidas de leite com volume de 250 mililitros. Já Lilbaek et al (2006) realizaram os teste em tanques contendo cerca de 150 kg de leite cada. Já no presente estudo foram realizados testes em escala industrial em tanques de 1500 litros de leite simulando produção industrial de uma indústria de laticínios.

5.4. pH

Os resultados do acompanhamento de pH para os queijos Minas Frescal, em cada tratamento, e ao longo do tempo estão organizados na Tabela 6.

Tabela 6: pH dos queijos Minas Frescal dentro de cada tratamento e ao longo do tempo de estocagem*

Tempo de estocagem (dias)	Tratamento	
	Controle (TC)	Enzima (TE)
	pH	pH
3	6,5±0,02 ^{aA}	6,5±0,03 ^{aA}
12	6,5±0,02 ^{aA}	6,5±0,08 ^{aA}
23	6,3±0,02 ^{aB}	6,3±0,04 ^{aB}

Fonte: o autor.

^A Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem significativamente entre si ($P>0,05$), pelo Teste t de Student. $n=2$.

^a Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na linha, não diferem significativamente entre si ($P>0,05$), pelo t de Student. $n=2$.

* (média + desvio padrão)

Comparando-se os tratamentos, com e sem enzima, o pH dos queijos Minas Frescal não foram afetados pelo uso da enzima fosfolipase, isto é, não houve diferenças significativas ($P < 0,05$) comparando-se os tratamentos em um mesmo estágio de estocagem (3, 12 ou 23 dias).

Este resultado também foi observado no estudo conduzido por Tranco-Reyes et al. (2014) ao utilizar enzima fosfolipase na produção de queijos tipo Chihuahua. Em outro estudo, conduzido por Libaek et al. (2006), o mesmo comportamento, comparando-se o pH de queijos Mozzarella fabricados com e sem adição de enzima fosfolipase, foi reportado.

Por outro lado, analisando a influência de tempo no pH dentro de cada tratamento observa-se diferença significativa ($P < 0,05$). Ao longo do tempo de estocagem a $3 \pm 2^\circ\text{C}$ houve queda do pH dos queijos, o que era esperado. O aumento de acidez durante o tempo de estocagem pode ser atribuída à fermentação da lactose residual presente no queijo, por meio da ação de microrganismos presentes, como as NSLAB (*non stater latic acid bacteria*) não eliminadas pela pasteurização, ou ainda por bactérias provenientes de contaminação pós-tratamento térmico, durante a manipulação dos queijos (COSTA et al., 2019) (FURTADO, 2017).

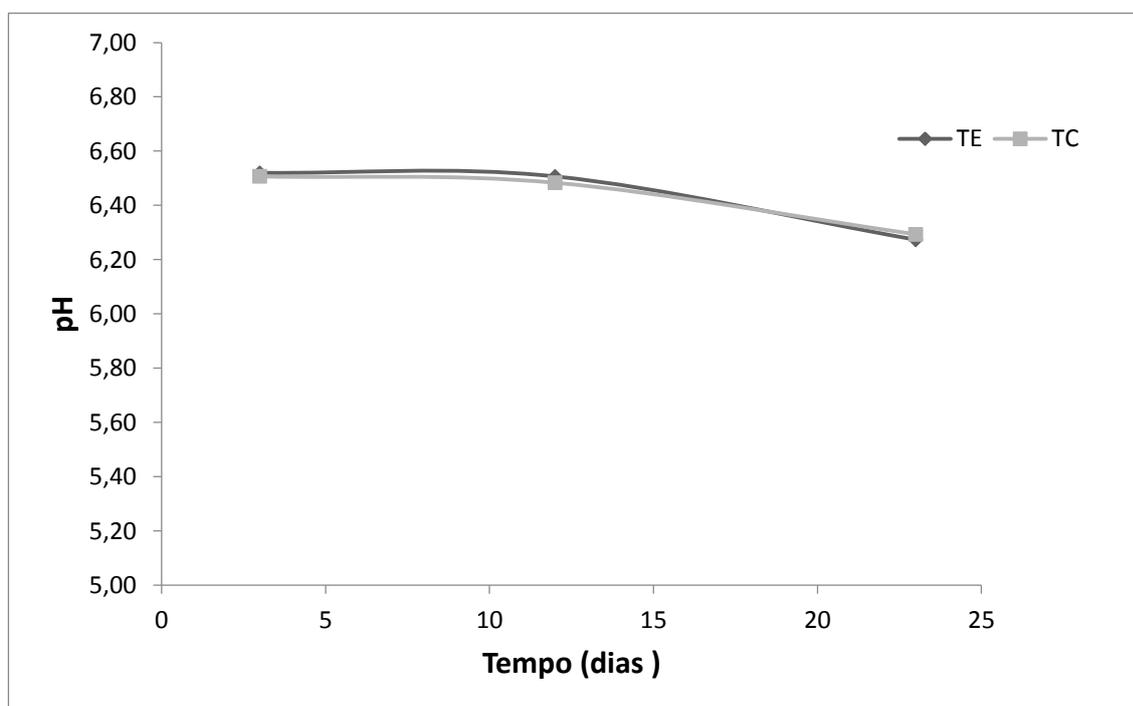


Figura 8: Gráfico de evolução do pH do queijo Minas Frescal ao longo do tempo de estocagem. Sendo: TE tratamento com enzima, e TC o tratamento controle.

:

A Tabela 7 apresenta o rendimento atual (kg queijo / 100 kg leite) e o rendimento atual ajustado (Ra-aj) também em kg queijo / 100 kg leite para os queijos Minas Frescal produzidos nos dois tratamentos. Com relação aos rendimentos, os mesmos aumentaram significativamente ($P < 0,05$) com a adição da enzima fosfolipase. A fosfolipase teve influência significativa sobre o rendimento atual e sobre o rendimento atual ajustado dos queijos, conforme pode ser observado na tabela.

A umidade dos queijos para cálculo do Rendimento atual ajustado (Raj) foi fixada em 63%. A definição do valor corresponde à umidade normalmente utilizada pela indústria da cooperativa onde foram realizados os experimentos, levando-se em consideração fatores econômicos (custo) bem como de preferência do consumidor.

Tabela 7: Valores* obtidos de Rendimento atual - Ra (Kg queijo/100 kg de leite) e Rendimento atual ajustado - Raj (kg queijo /100 kg de leite) em ambos tratamentos.

	Tratamento	
	Controle (TC)	Com enzima (TE)
Ra	15,8±0,30 ^a	16,5±0,31 ^b
Raj	15,4±0,28 ^a	16,0±0,28 ^b

a,b Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na linha, não diferem significativamente entre si ($P > 0,05$), pelo teste de T de Student. $n=2$.

* (média + desvio padrão)

Fonte: o autor.

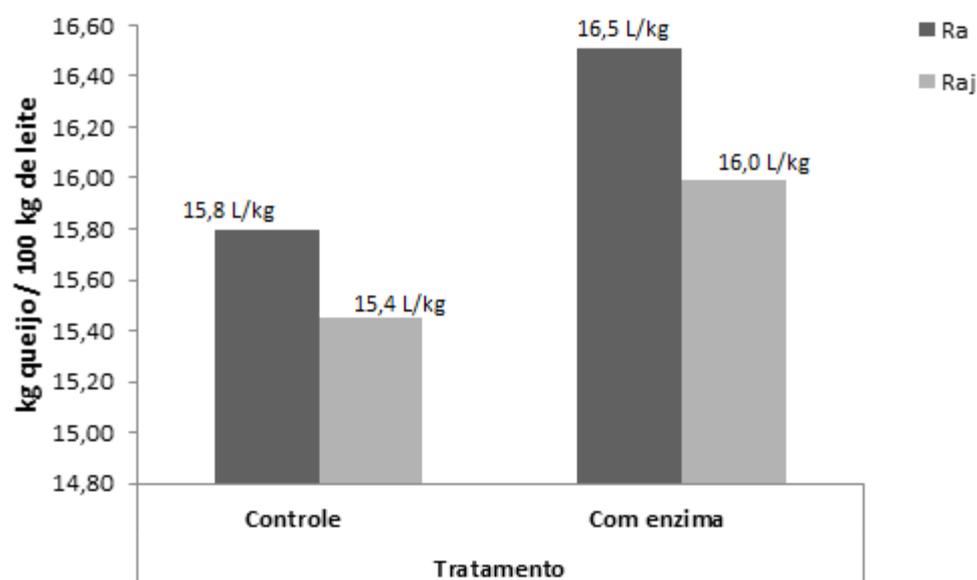


Figura 9: Comparativo dos rendimentos obtidos em ambos os tratamentos.

Observa-se que houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos. O rendimento atual (kg queijo / 100 kg leite) foi significativamente maior para o tratamento com enzima, quando comparado ao tratamento controle, sem adição de fosfolipase. Rendimento atual do tratamento com enzima obteve aumento de 4,30 % em relação ao tratamento controle.

O rendimento atual ajustado, em que umidade dos queijos foi fixada em 63% para os tratamentos, também apresentou diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os tratamentos. Sendo o rendimento do tratamento com fosfolipase superior ao tratamento controle. O aumento representou 3,38% de aumento no tratamento com enzima quando comparado ao tratamento controle, considerando a umidade ajustada para 63%.

Nota-se que a umidade teve influência no aumento de rendimento do queijo fabricado com a enzima, já que quando se observa o rendimento atual, sem ajuste de umidade, a diferença percentual é maior.

Entre os efeitos esperados com o uso da fosfolipase estão a maior retenção de água na coalhada e menor perda de gordura no soro devido ao caráter emulsificante da fosfolipase. Os resultados de rendimento acima relatados e as diferenças observadas entre o desempenho nos resultados com e sem ajuste de umidade parecem estar diretamente relacionados ao uso da enzima, uma vez que outras condições e fatores foram mantidos iguais entre os tratamentos.

Os resultados obtidos por Lilbaek et al (2006) também demonstraram diferenças no rendimento entre produções feitas com fosfolipase quando comparadas à fabricação controle, sem adição da enzima. No experimento conduzido para avaliação de rendimento e funcionalidade do queijo Mozzarella Lilbaek et al obtiveram rendimento 3,2% superior ao rendimento da produção controle. Neste mesmo estudo relataram também o efeito na umidade dos queijos preparados com enzima, que tendem a ter maior percentual de umidade quando comparados aos queijos preparados sem uso de fosfolipase.

Em contrapartida, os resultados obtidos por Trancoso-Reyes et al. (2014) divergem dos resultados encontrados. Em seu experimento Trancoso-

Reyes et al. (2014) realizaram testes na produção do queijo típico mexicano, Chihuahua. Os resultados obtidos demonstraram que o rendimento dos queijos produzidos com e sem a enzima fosfolipase não tiveram diferença significativa ($P > 0,05$). Apenas quando utilizaram a combinação de enzima fosfolipase e cultura produtora de exopolissacarídeos (EPS) os pesquisadores obtiveram aumento de rendimento em relação à produção controle (sem aplicação de enzima e cultura produtora de EPS). No entanto, vale ressaltar que a escala do experimento realizado por Trancoso-Reyes et al. (2014) foi reduzida, tendo conduzido o teste em laboratório com volumes de 250 ml de leite por partida, o que pode explicar em parte as diferenças feitas em queijos em escala industrial.

5.6. Avaliação microbiológica

5.6.1. Contagem de microrganismos mesófilos

Os resultados obtidos nas análises microbiológicas de mesófilos aeróbios ao longo do tempo de estocagem refrigerada (temperatura de estocagem: 3 ± 2 °C) estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Análise de mesófilos aeróbios ao longo do tempo do queijo Minas Frescal produzido com e sem enzima fosfolipase*

Tempo de Estocagem (dias)	Tratamentos	
	Controle (TC)	Enzima (TE)
3	4,06 ^{aA}	3,83 ^{aA}
12	5,09 ^{aB}	4,42 ^{bB}
23	6,09 ^{aC}	5,05 ^{bC}

Fonte: o autor.

^{A,B,C} Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem significativamente entre si ($P > 0,05$), pelo Teste t de Student, $n=2$.

^{a,b,c} Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na linha, não diferem significativamente entre si ($P < 0,05$), pelo t de Student, $n=2$.

* Expresso em log UFC/ g

Comparando-se os resultados obtidos para contagens de microrganismos mesófilos nos queijos, nota-se que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos no tempo inicial (3 dias de estocagem). Contudo, observou-se que para os tempos de estocagem 12 dias e 23 dias há diferença entre os tratamentos ($P < 0,05$). No tempo 12 dias os queijos tratados com fosfolipase obtiveram contagem inferior ao queijo do tratamento controle, bem como no tempo 23 dias. Demonstrando possível interferência ou ação da enzima fosfolipase sobre microrganismos deste grupo durante a estocagem do produto.

Neste sentido, experimento realizado por Qu e Lehrer (1998), demonstrou que fosfolipases A2 tiveram capacidade de eliminar um amplo espectro de bactérias testadas, entre elas *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, que são de interesse também na área de alimentos por serem microrganismos veiculados por produtos refrigerados e/ou manipulados como o que ocorre na produção de queijo Minas Frescal.

No entanto, Trancoso-Reyes et al (2014) realizaram testes para avaliação da influência da enzima fosfolipase sobre o desenvolvimento de bactérias de culturas lácticas (cultura *starter*) e cultura produtora de exopolissacarídeos (EPS). Mas os resultados obtidos demonstram que a enzima não afetou o crescimento da cultura produtora de EPS nem o crescimento da cultura *starter* utilizada na produção de queijo Chihuahua. A presença desta enzima não produziu qualquer alteração no tempo de latência ou taxa de crescimento da cultura produtora de EPS.

Como a enzima testada é uma fosfolipase A1 é necessário que se faça uma avaliação mais minuciosa sobre as possíveis influências da enzima fosfolipase A1 sobre o desenvolvimento de bactérias e outros microrganismos em produtos lácteos, como queijos elaborados com uso desta enzima.

Analisando-se os tratamentos individualmente ao longo do tempo, observa-se que os queijos produzidos em ambos os tratamentos tiveram aumento das contagens de mesófilos ao longo dos dias de estocagem ($P < 0,05$). Resultado esperado para análise microbiológica de queijos com alto teor de umidade

ao longo do tempo de armazenamento devido ao crescimento de bactérias lácticas ou bactérias NSLAB (*non starter latic acid bacteria*) remanescentes no produto, conforme experimentos realizados por Sangaletti et al. (2009) que evidenciaram em seu experimento aumento significativo ($P < 0,05$) das contagens de mesófilos ao longo dos 30 dias de estocagem do queijo Minas Frescal.

5.6.2. Contagem de Coliformes totais

Os resultados obtidos nas análises microbiológicas de Coliformes totais ao longo do tempo de estocagem refrigerada (temperatura de estocagem: 3 ± 2 °C) estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Análise de Coliformes totais nas amostras de queijo Minas Frescal produzido com e sem enzima fosfolipase, ao longo do tempo.*

Tempo de Estocagem (dias)	Tratamentos	
	Controle (TC)	Enzima (TE)
3	2,71 ^{aA}	2,73 ^{aA}
12	3,49 ^{bB}	3,38 ^{bB}
23	4,04 ^{aC}	3,89 ^{cC}

Fonte: o autor

^{A,B,C} Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem significativamente entre si ($P > 0,05$), pelo Teste t de Student.

^{a,b,c} Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na linha, não diferem significativamente entre si ($P > 0,05$), pelo t de Student. n=2.

* Expresso em log UFC/ g

Comparando-se os resultados obtidos para contagens de Coliformes totais nos queijos, nota-se que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos no tempo inicial (3 dias de estocagem) nem no tempo 12 dias.

Contudo, observou-se que para os tempos de estocagem 23 dias há diferença entre os tratamentos ($P < 0,05$). No tempo 23 dias os queijos tratados com fosfolipase obtiveram contagem inferior ao queijo do tratamento controle. Demonstrando possível interferência ou ação da enzima fosfolipase sobre microrganismos deste grupo.

Assim como discutido para os resultados de microrganismos mesófilos neste estudo, é necessário que se faça uma avaliação minuciosa sobre as possíveis influências da enzima fosfolipase A1 sobre o desenvolvimento de bactérias do grupo coliforme, com ensaios em laboratório, utilizando microrganismo controle no início de cada produção, minimizando desta forma outros fatores de interferência como manipulação ou contatos com superfície de equipamentos de produção.

Analisando-se os tratamentos individualmente ao longo do tempo, observa-se que os queijos produzidos em ambos os tratamentos tiveram aumento das contagens de Coliformes totais ao longo dos dias de estocagem ($P < 0,05$). Resultado também encontrado, conforme experimentos realizados por Sangalietti et al. (2009) que observaram diferenças significativas ($P < 0,05$) para as contagens de Coliformes ao longo do tempo de estocagem do queijo Minas Frescal, sendo que ao longo do tempo o queijo apresentou aumento da contagem de Coliformes ao longo de 30 dias de estocagem

5.6.3. Contagem de Coliformes termotolerantes

Os resultados obtidos nas análises microbiológicas de Coliformes termotolerantes ao longo do tempo de estocagem refrigerada (3 ± 2 °C) estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Análise de Coliformes* termotolerantes no queijo Minas Frescal produzido com e sem enzima fosfolipase, ao longo do tempo.

Tempo Estocagem (dias)	Tratamento	
	Controle (TC)	Enzima (TE)
3	1,41 ^{aA}	1,41 ^{aA}
12	1,41 ^{aA}	1,41 ^{aA}
23	2,23 ^{aA}	1,41 ^{bA}

Fonte: o autor

A,B,C Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem significativamente entre si ($P > 0,05$), pelo Teste t de Student.

a,b,c Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na linha, não diferem significativamente entre si ($P > 0,05$), pelo t de Student. $n=2$.

*Expresso em $(x + 1)^{1/2}$, onde x é igual ao resultado da contagem em UFC/g

Parte dos resultados para Coliformes termotolerantes apresentou contagem menor que o limite de detecção do método ($< 1 \times 10^1$ UFC/g), ou seja, não houve crescimento nas placas feitas na menor diluição (10^{-1}) utilizando-se alíquota de 1 ml. Apenas no tempo 23 dias, para o tratamento controle, houve crescimento maior que o limite de detecção do método. (1×10^1) sendo possível a enumeração de colônias, pela metodologia utilizada. Sendo assim os resultados da tabela foram tratados estatisticamente com uso de transformação radial $((x + 1)^{1/2})$ devido aos resultados com valor “zero”, isto é, placas sem crescimento na diluição utilizada.

A resultado das análises de Coliformes termotolerantes observado na Tabela 9, demonstra que não houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos 3 e 12 dias ($P > 0,05$). Apenas no tempo de estocagem de 23 dias, foi possível observar diferença entre os tratamentos ($P < 0,05$).

Analisando-se cada tratamento individualmente, observa-se que não houve diferença significativa dos resultados ao longo do tempo de estocagem ($P > 0,05$).

5.6.4. Contagem de Fungos filamentosos e Leveduras

Os resultados obtidos nas análises microbiológicas fungos filamentosos e leveduras ao longo do tempo de estocagem refrigerada (temperatura de estocagem: 3 ± 2 °C) estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11: Análise* de fungos filamentosos e leveduras do queijo Minas Frescal produzido com e sem enzima fosfolipase, ao longo do tempo.

Tempo de Estocagem (dias)	Tratamento	
	Controle (TC)	Enzima (TE)
3	2,71 ^{aA}	2,73 ^{aA}
12	3,49 ^{aB}	3,38 ^{aB}
23	4,05 ^{aC}	3,89 ^{aC}

Fonte: o autor

^{A,B,C} Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem significativamente entre si ($P > 0,05$), pelo Teste t de Student.

^{a,b,c} Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na linha, não diferem significativamente entre si ($P > 0,05$), pelo t de Student. $n=2$.

* Expresso em log UFC/ g

Comparando-se os resultados obtidos para contagens de fungos filamentosos e leveduras nos queijos, nota-se que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos, seja no tempo 3, 12 ou 23 dias. Desta forma, para o grupo de fungos filamentosos e leveduras o tratamento enzimático com fosfolipase parece não ter tido nenhuma influência sobre o desenvolvimento destes microrganismos.

Analisando-se os tratamentos individualmente ao longo do tempo, observa-se que os queijos produzidos em ambos os tratamentos tiveram aumento das contagens de fungos e leveduras ao longo dos dias de estocagem ($P < 0,05$). Resultado também encontrado, por D'Almeida (2010) que constatou diferenças significativas ($P < 0,05$) para as contagens de fungos e leveduras ao

longo do tempo de estocagem do queijo Minas Frescal, sendo que ao longo do tempo o queijo apresentou aumento da contagem de Coliformes ao longo de 28 dias de estocagem.

5.6.5. *Listeria monocytogenes*, *Salmonella sp.* e *Staphylococcus aureus*

Os queijos Minas Frescal, obtidos na segunda repetição foram utilizadas para os testes sensoriais.

Além dos microrganismos testados no experimento (grupos de Coliformes totais e termotolerantes, Mesófilos e Fungos filamentosos e leveduras) as amostras da segunda repetição foram testadas quanto à presença de *Listeria* e *Salmonela*, e foi realizada contagem de *Staphylococcus aureus*, com objetivo de assegurar a inocuidade dos queijos utilizados na avaliação sensorial. Os resultados obtidos nas análises microbiológicas estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12: Análises microbiológicas do queijo Minas Frescal produzido com e sem enzima fosfolipase, no 12º dia de estocagem*

Tratamentos	Análises		
	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella sp.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC / g)
Controle (TC)	Ausente/25g	Ausente/25g	<1x10 ¹
Enzima (TE)	Ausente/25g	Ausente/25g	<1x10 ¹

Fonte: o autor

* temperatura de estocagem: 3 ± 2°C

A portaria nº146 de 1996 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento preconiza no “Regulamento Técnico Geral para fixação dos Requisitos Microbiológicos de Queijos” a ausência de *Listeria* e *Salmonela* em 25 g de amostra para queijos de muito alta umidade (umidade > 55%) sem bactérias

láticas em forma viável e abundantes. Os resultados apresentados para as amostras coletadas atendem, portanto, os requisitos dispostos na legislação para *Listeria* e *Salmonela*. (BRASIL, 1996)

A portaria 146 de 1996 do MAPA também fixa requisito para contagem de *Estafilococos* coagulase positiva para os queijos de muito alta umidade sem culturas lácteas em 5×10^2 UFC/g como valor máximo aceitável para consumo. Portanto o resultado obtido atende ao valor preconizado pela legislação, contudo a análise realizada foi específica para *Staphylococcus aureus*.

5.7. Avaliação sensorial

5.7.1. Teste de aceitação

Foram realizados testes sensoriais para avaliação da aceitação dos queijos produzidos com e sem enzima fosfolipase.

Os testes sensoriais foram realizados utilizando-se queijo controle e queijos com enzima, produzidos na mesma data. A avaliação ocorreu no 12º dia de estocagem dos queijos, que corresponde ao tempo médio entre a produção e compra do queijo pelo consumidor, considerando a logística de entrega e reposição nos pontos de venda.

Os 40 provadores realizaram o teste na sede administrativa da COCA-TREL, sendo eles colaboradores e cooperados que acessam o local diariamente. Os provadores foram conduzidos à bancada do refeitório do local, individualmente, para prova dos queijos. Cada voluntário provou aleatoriamente uma amostra de cada um dos tratamentos (controle e com tratamento enzimático). As notas atribuídas a cada amostra utilizando a escala hedônica de nove pontos geraram médias para cada tratamento, conforme apresentado nas Tabelas 13 e 14.

Tabela 13: Resultados de aceitação do queijo Minas Frescal produzido com e sem adição de fosfolipase.

Tratamento	
Controle (TC)	Enzima (TE)
6,9 ± 0,95 ^a	7,2 ± 0,80 ^a

Fonte: o autor

^{a,b,c} Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na linha, não diferem significativamente entre si ($P > 0,05$), pelo t de Student. $n=2$

Tabela 14: Resultados do teste McNemar para avaliação pareada de resultados, comparando os tratamentos realizados para produção do queijo Minas Frescal

		SEM ENZIMA		TOTAL
		0	1	
COM ENZIMA	0	0	<u>12</u>	12
	1	<u>12</u>	18	30
	TOTAL	12	30	42

Fonte: o autor.

Não foram observadas diferenças significativas nos testes de aceitação pelos consumidores entre os tratamentos ($P > 0,05$). O mesmo comportamento pôde ser observado no teste McNemar para avaliação pareada ($p = 0.838$), o que demonstra que a utilização da enzima fosfolipase na fabricação deste tipo de queijo, não provocou nenhum tipo de alteração na aceitação do produto, e não demonstrou haver diferenças que pudessem levar a escolha de um dos queijos em detrimento de outro.

Trancoso-Reyes et al (2014) realizaram testes sensoriais com o queijo típico mexicano Chihuahua elaborado com e sem utilização de fosfolipase. As avaliações foram feitas atribuindo-se notas para os padrões de textura e sabor.

E neste experimento também se concluiu que os queijos produzidos com fosfolipase quando comparado ao mesmo queijo produzido sem enzima fosfolipase não apresentaram diferenças significativas para os parâmetros usados para avaliação.

Trancoso-Reyes et al (2014) afirmam também que uma preocupação no caso dos queijos fabricado com fosfolipase foi o possível desenvolvimento de sabores rançosos produzidos por hidrólise de triglicérides. No entanto, e de acordo com os comentários dos juízes, estes queijos não apresentaram sabor rançoso.

6. CONCLUSÃO

Conclui-se, portanto, que a utilização da enzima fosfolipase tipo A1 para produção do queijo Minas Frescal impactou positivamente no rendimento, além de apresentar uma aceitação similar pelos consumidores em relação ao produto fabricado sem a enzima. Além disso, o experimento demonstrou possíveis influências da enzima sobre crescimento de alguns grupos de microrganismos nos queijos, o que poderia ser um fator adicional de interesse para indústria de laticínios, especialmente em produtos como o queijo Minas Frescal, mais susceptíveis à contaminação, e precisará ser avaliado mais detalhadamente. Portanto, a utilização de fosfolipase tipo A1 na produção em escala industrial de queijo Minas Frescal é absolutamente possível, se mostrando uma boa alternativa como coadjuvante de tecnologia a ser empregado nas indústrias para a fabricação deste tipo de queijo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBFOOD R-BIOPHARM. Compact Dry – Um método de contagem simples para contagem de microrganismos. Ambfood R-Biopharm AG, 2005. Disponível em: www-ambifood.com. Acesso em 20 de fevereiro de 2018.

APOLINÁRIO, T. C. C., SANTOS, G. S., LAVORATO, J. A. A. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal produzido por laticínios do estado de Minas Gerais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. V.69. p. 433-442. 2014.

ARAVINDAN, R., ANBUMATHI, P., VIRUTHAGIRI, T. Lipase applications in food industry. **Indian Journal of Biotechnology**. Vol 6. p. 141-158. 2006.

BRASIL, 2016. Ministério da Cultura. Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional – IPHAN. Inventário Nacional de Referências Culturais -INRC. Queijo Artesanal de Minas. V.1. Belo Horizonte. 2016.

BRASIL, 2006. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

BRASIL, 2018. Controle de patógenos. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/controle-de-patogenos>. Acesso em 20 de janeiro de 2019.

BRASIL, 2003. Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Capítulo VI. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União**. Brasília 18 de setembro de 2003.

BRASIL, 1996. Portaria nº 146 de 7 de março de 1996. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Queijos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 11 de março de 1996.

BRASIL, 1997. Portaria nº352 de 09 de abril de 1997– Aprova o “Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) do queijo Minas Frescal”. **Diário Oficial da União**. Brasília, 4 de setembro de 1997.

BRASIL, 2014. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 53, de 07 de Outubro de 2014. Dispõe sobre a lista de enzimas, aditivos alimentares e veículos autorizados em preparações enzimáticas para uso na produção de alimentos em geral. **Diário Oficial da União** nº 194, Brasília, DF, 08 de outubro de 2014.

BUZATO, R. M. P. **Influência da relação caseína/gordura do leite e da temperatura de cozimento da massa no rendimento de fabricação e nas propriedades físico-químicas, funcionais e sensoriais do queijo de coalho**. Tese de Doutorado. Universidade de Campinas. Campinas 2011.

CABRAL, G. J. **Estudo do processo de pré solubilização de CO₂ em queijo Minas Frescal: modelagem matemática e avaliação da influência da concentração de CO₂ no crescimento de bactérias psicrófilas e ácido lácticas**. Florianópolis, SC. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina. 2016.

CAP-LAB, **Manual de Instruções do Analisador de Umidade IV-2000**. Cap-Lab, 2000.

CARDOSO, R. R. **Influência da microbiota psicrófila no rendimento de queijo Minas Frescal elaborado com leite estocado sob refrigeração**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa. 2006.

CARVALHO, M. P., MARTINS, P. C., WRIGHT, J. T. C., SPERS, R. G. **Cenários para o leite no Brasil em 2020**. Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora. 2007.

CARVALHO, P. O., CALAFATTI, S., MARASSI, M., SILVA, D. M., CONTESINI, F. J., BIZACO, R. Potencial de biocatálise enantioselectiva de lipases microbianas. **Química Nova**. v.28. no 4. p. 614-621. 2005.

CASADO, V., MARTIN, D., TORRES, C., REGLERO, G. Phospholipases in food industry: a review. **Methods in Molecular Biology**. V.861. 2012.

CASTRO, K. A., SILVA, K. A. L., PEREIRA, A. I. A., ORSINE, J. V. C. Efeito da contagem de células somáticas sobre a qualidade dos queijos Prato e Mussarela. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**. V.8. p. 1237-1250. 2014.

CHR. HANSEN. Ficha técnica: **Informação de Produto**. Versão: 7 PI GLOB PT 04-01-2018.

CHR. HANSEN. Ha-La Biotec. **Informativo Trimestral para Indústria Láctea**. Ano XXVIII. N°140/141. Julho-Dezembro de 2017.

COELHO, K. O., MESQUITA, A. J., MACHADO, P. F., LAGE, M. E., MEYER, P. M., REIS, A. P. Efeito da contagem de células somáticas sobre o rendimento e a composição físico-química do queijo Muçarela. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. V.66. p. 1260-1268. 2014.

COSTA, M. R., FLORES, R. J., GIGANTE, M. L. Propriedades da membrana do glóbulo de gordura do leite. **Alimentos e Nutrição**. V.20. n.3 p.507-514. 2009.

COSTA, F. F., BRITO, M. A. V. P., SOUZA, G. N., PEREIRA, D. B. C., PINTO, I. S. B., MARTINS, M.F. Efeito da temperatura das amostras de leite na con-

centração de cálcio solúvel e de beta-caseína: interferência no teste de estabilidade frente ao etanol. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. V.66. p.573-578. 2014.

COSTA, R. G. B. et al. Effect of partial replacement of sodium chloride with potassium chloride on the characteristics of Minas Padrão cheese. **Internacional Dairy Journal**, v. 91, p. 48–54, 2019

D'ALMEIDA, W. K. **Uso da lactoferrina na conservação do queijo Minas Frescal**. Dissertação (Mestrado). Ciência e Tecnologia do Leite. Universidade Norte do Paraná. 2010.

DE MARIA, L., VIND, J., OXENBOLL, K. M., SVENDSEN, A. PATKAR, S. Phospholipases and their industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**. No.74. p. 290-300. 2007.

DEAN A.G., SULLIVAN K. M., SOE, M. M. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, Version. www.OpenEpi.com, updated 2013/04/06, Acesso em: 02/05/2019.

KARAHAN, L. E, AKIN, M. S. Phospholipase Applications in Cheese Production. **Journal of Food Science and Engineering**. No.7. p 312-315. 2017.

ELLOLY, M. M. Composition, properties and nutritional aspects of milk fat globule membrane a review. **Polish Journal of Food and Nutrition Science**. V.61. p. 7-32. 2011.

ESTEVES, C. Phospholipase. Disponível em: <http://knoow.net/ciencterravida/biologia/fosfolipase/>. 2017. Acesso em 15 de maio de 2019.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. Published by Blackie Academic & Professional, an imprint of Thomson Science, 2-6 Boundary Row, London SE1 8UK. First ed. 1998.

FICKERS, P., DESTAIN, J., THONART, P. Les lipases sont des hydrolases atypiques: principales caractéristiques et applications. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**. No.2. v.2. p. 119-130. 2008.

FERREIRA, D. F. SISVAR : A COMPUTER STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM
Sisvar : um sistema computacional de análise estatística. **Ciênc. Agrotec.**, v. 35, n. 6, p. 1039–1042, 2011.

FURTADO, M. M. **Principais problemas dos queijos causas e prevenção**. Fonte Comunicações e Editora. São Paulo, SP, Brasil. 2005.

FURTADO, M. M. **Quesos Tipicos de Latinoamerica - Tecnologia y Puntos Críticos**. 2. ed. [s.l.] Editorial Académica Española, 2017

FUKUDA, E. K., VASCONCELOS, A. F. D., MATIAS A. C., BARBOSA A., M., DEKKER R. F. H., SILVA M. L. C. Polissacarídeos de parede celular fúngica: purificação e caracterização. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 30, n. 1, p. 117-134. 2009

HÖIER, E., LILBAEK, H., BROE, M. L. Enhancing cheese yield by phospholipase treatment of cheese milk. **The Australian Journal of Dairy Technology**. V.61. 2006.

HOIER, E., LILBAEK, H. M. Phospholipase, a new enzyme in cheese making. **Enzymes for Food**. Pages 31–36 .2006.

LILBAEK, H. M., BROE, M L., HOIER, E., FATUM T. M., IPSEN, R., SORENSEN, N. K. Improving the Yield of Mozzarella Cheese by Phospholipase Treatment of Milk. **Journal of Dairy Science**. 2006.

QU, X.D., LEHRER R. I. Secretory phospholipase A2 is the principal bactericide for staphylococci and other gram-positive bacteria in human tears. **Infection and Immunity**. American Society for Microbiology. Vol.66. no.6. p.2791–2797. 1998

MACHADO, G. M. **Viabilidade tecnológica do uso de ácido láctico na elaboração de queijo coalho**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Juiz de Fora. 2010.

MANSSON, H. L. Fatty acids in bovine milk fat. **Food & Nutrition Research**. V.52. no1. 2008.

MERCOSUL, Resolução GMC/RES. N°145/1996. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal. Brasil, 1996.

MESSIAS, J. M., COSTA, B. Z., LIMA, V. M. G., GIESE, E.C, DEKKER, R. F. H., BARBOSA, A. M. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**. V.32. p. 213-234. 2011.

MINIM, V. P. R. **Análise sensorial: estudos com consumidores**. Viçosa - MG: Editora UFV. Universidade Federal de Viçosa. 225 p. 2006.

NIELSEN, H., HÖIER, E. Environmental assessment of yield improvements obtained by the use of the enzyme phospholipase in mozzarella cheese production. **The International Journal of Life Cycle Assessment**. V.14. p.137-143. 2009.

PAULA, J. C. J. **Efeito do uso de dióxido de carbono (CO₂) na Fabricação de queijos minas frescal e minas padrão.** Viçosa, MG. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa. 2010.

PAULA, J. C. J., COSTA, R. G. B., CARVALHO, E. C., SOBRAL, D., PAIVA, P.H. C., PIRES, A. C. S., PINTO, M. S., TEODORO, V. A. M. Effect of the use of carbon dioxide on Prato cheese making. **International Dairy Journal.** V. 91. p. 172-177. 2019.

PAULA, J. C. J. CARVALHO, A. F., FURTADO, M. M. Princípios básicos da fabricação de queijos: do histórico à salga. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes.** V.64. p.19-25. 2009.

PASTORE, G. M., COSTA, V. S. R., KOBLITZ, M. G. B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizops.sp.* **Ciência e Tecnologia dos Alimentos.** v.23. p.135-142. 2003.

PEREIRA, B. C. P. SILVA, P. H. F., JÚNIOR, L.C. G. C., OLIVEIRA, L. L. **Físico-química do leite e derivados: Métodos analíticos.** Templo Gráfica e Editora Ltda. Juiz de Fora. 2ed. 2001.

ROVEDA, M., HEMKEMEIER, M., COLLA, L. M. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. **Revista de Ciência e Tecnologia de Alimentos.** v.30. 2010.

R-BIOPHARM. Compact-Dry. Disponível em: <https://food.r-biopharm.com/products/compact-dry-x-sa/>). Acesso em 25 de abril de 2019.

SANGALETTI, N., PORTO E., BRAZACA S. G. C., YAGASAKI C. A., DALLA DEA R. C., SILVA M. V. Estudo da vida útil de queijo Minas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos.** p. 262-269. 2009

SILVA F. R., SANTANA C. M., MELO, W. F., TALABERA, G. G., SARMENTO, W. E. SOBRINHO, W.S. SÁ J.A. MACHADO A.V. Conservação e controle de qualidade de queijos: Revisão. **PubVet**. 11, n.4, p.333-341. 2017.

SOUSA, M. J., McSWEENEY, P. L. H. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. **Le lait Dairy Science and Technology**. Volume 80, Number 3, 2000.

TURCOT, S., TURGEON, S., ST-GELAIS, S. Effect of buttermilk phospholipid concentrations in cheese milk on production and composition of low fat Cheddar cheese. **Dairy Science and Technology**. p.429-442. 2001

TRANCOSO-REYES, N., GUTIERREZ-MENDEZ, N., SEPULVEDA, D. R., HERNANDEZ-OCHOA, L. R.. **Journal of Dairy Science**. Assessing the yield, microstructure, and texture properties of miniature Chihuahua-type cheese manufactured with a phospholipase A1 and exopolysaccharide-producing bacteria. Vol 97. No.2 2014

VANDERGHEN, C., BODSON, P., DANTHINE, S., PAQUOT, M., DEROANNE, C., BLECKER, C. Milk fat globule membrane and buttermilks from composition to valorization. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**. V.14. p.485-500. 2010.

VILELA, S.C. Nova abordagem sobre rendimento na fabricação de queijos. Pouso Alegre, 23 de março de 2017. 29 slides. Material apresentado no “III Seminário Macalé - Chr.Hansen”.

VINHA, M. B., PINTO, C. L. O., SOUZA, M. R. M., CHAVES, J. B. P. Fatores econômicos da produção de queijo Minas Frescal em agroindústrias familiares de Viçosa, MG. **Ciência Rural**. 2010.

VISOTTO, R.G., OLIVEIRA, M. A., PRADO, S. P. T, BERGAMINI, A. M. M. Queijo Minas Frescal: perfil higiênico-sanitário e avaliação da rotulagem. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. V.70. p. 8-15. 2011.

WWF & NOVOZYMES S/A. GHG emission reducing with industrial biotechnology: Assessing the opportunities. p.7-10. USA. Disponível em: www.wwf.dk. Acesso em 01 de fevereiro de 2019.

ZOCCAL, R. Queijos: importação e exportação. **Revista Balde Branco**. 2016. Disponível em: <http://www.baldebranco.com.br/queijos-producao-e-importacao/>. Acesso em 15 de fevereiro de 2019.

3M COMPANY. **Petrifilm™ Placa para contagem de *E.Coli* e Coliformes. Guia de Interpretação**. 1ªed. Sumaré, 2009.