UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE E DERIVADOS
MESTRADO PROFISSIONAL EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE E DERIVADOS

Tamires Messias Nascimento

EFEITO DA UTILIZAÇÃO DAS ENZIMAS FOSFOLIPASE E TRANSGLUTAMINASE NA FABRICAÇÃO DE REQUEIJÃO CREMOSO

Juiz de Fora
2025

Tamires Messias Nascimento

EFEITO DA UTILIZAÇÃO DAS ENZIMAS FOSFOLIPASE E TRANSGLUTAMINASE NA FABRICAÇÃO DE REQUEIJÃO CREMOSO

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 à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Orientadora: Dra. Renata Golin Bueno Costa

Juiz de Fora

2025

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

Nascimento, Tamires Messias.
Efeito da utilização das enzimas fosfolipase e transglutaminase na fabricação de requeijão cremoso / Tamires Messias Nascimento. -- 2025.
85 p. : il.

Orientadora: Renata Golin Bueno Costa
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, 2025.

1. Enzima fosfolipase. 2. Enzima transglutaminase. 3. Rendimento. 4. Perfil de textura. 5. Microestrutura. I. Costa, Renata Golin Bueno, orient. II. Título.

Tamires Messias Nascimento

Efeito da utilização das enzimas fosfolipase e transglutaminase na fabricação de requeijão cremoso

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 à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados. Área de concentração: Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Aprovada em 31 de outubro de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Renata Golin Bueno Costa - Orientadora
EPAMIG/ILCT

Profa. Dra. Vanessa Aglaê Martins Teodoro
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Denise Sobral
EPAMIG/ILCT

Juiz de Fora, 21/10/2025.

Documento assinado eletronicamente por **Renata Golin Bueno Costa**, **Usuário Externo**, em 30/01/2026, às 07:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Vanessa Aglaê Martins Teodoro**, **Professor(a)**, em 02/02/2026, às 21:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Denise Sobral**, **Usuário Externo**, em 10/02/2026, às 17:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **2696839** e o código CRC **2D58CEC5**.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da adição das enzimas fosfolipase e transglutaminase, aplicadas de forma isolada e combinada, adicionadas no leite para elaboração da massa do requeijão cremoso, investigando seus impactos sobre o rendimento, as características físico-químicas, o perfil de textura, a cor instrumental, a capacidade de derretimento e as propriedades sensoriais do produto, assegurando a conformidade com a legislação vigente aplicável a essa categoria. Adicionalmente, utilizou-se microscopia eletrônica de varredura (MEV) para estudar e esclarecer as modificações na matriz proteico-lipídica decorrentes da ação enzimática. O experimento foi conduzido em delineamento em blocos casualizados, contemplando quatro tratamentos: controle (sem adição de enzimas), adição isolada de fosfolipase, adição isolada de transglutaminase e aplicação combinada das duas enzimas. As análises físico-químicas demonstraram que a aplicação enzimática não promoveu alterações significativas nos parâmetros avaliados, sendo que todos os tratamentos atenderam aos requisitos estabelecidos pela Portaria nº 359/1997. Referente ao desempenho tecnológico, o rendimento (kg/100 kg de leite) dos tratamentos com TG, isolada ou combinada com fosfolipase, não apresentaram diferenças significativas entre si, porém demonstraram desempenho superior em relação aos demais tratamentos. A recuperação de proteínas do leite para a massa do requeijão indicou que não houve diferenças significativas entre os tratamentos. Já em relação à recuperação de gordura, os resultados evidenciaram diferenças significativas entre os tratamentos, o controle apresentou o menor percentual de recuperação lipídica em comparação aos demais tratamentos enzimáticos, indicando que tanto a fosfolipase quanto a transglutaminase, aplicadas isoladamente ou em combinação, promoveram maior retenção de gordura na massa do requeijão. O perfil de textura e a cor instrumental não foram significativamente influenciados pela aplicação das enzimas, contudo, ao longo do período de armazenamento, foram verificadas modificações nesses parâmetros. De modo semelhante, a capacidade de derretimento não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos nem em função do tempo de armazenamento. Todas as amostras atenderam aos padrões microbiológicos exigidos pela legislação vigente. A avaliação sensorial evidenciou maior aceitação do requeijão cremoso elaborado com adição de fosfolipase, enquanto o uso isolado da transglutaminase resultou em menor aceitação sensorial. As análises

de microscopia eletrônica de varredura confirmaram os resultados tecnológicos, evidenciando modificações estruturais caracterizadas por melhor organização da matriz proteica e distribuição mais homogênea dos glóbulos de gordura nos tratamentos com aplicação enzimática.

Palavras-chave: enzima; fosfolipase; transglutaminase; rendimento; perfil de textura; análise sensorial; microestrutura.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effects of adding phospholipase and transglutaminase enzymes, applied individually and in combination, to milk for the production of creamy requeijão, investigating their impacts on yield, physicochemical characteristics, texture profile, instrumental colour, melting capacity, and sensory properties of the product, ensuring compliance with current legislation applicable to this category. Additionally, scanning electron microscopy (SEM) was used to study and clarify the modifications in the protein-lipid matrix resulting from enzymatic action. The experiment was conducted in a randomised block design, including four treatments: control (no enzyme addition), isolated addition of phospholipase, isolated addition of transglutaminase, and combined application of the two enzymes. Physicochemical analyses demonstrated that the enzymatic application did not promote significant changes in the evaluated parameters, and all treatments met the requirements established by Ordinance No. 359/1997. Regarding technological performance, the yield (kg/100 kg of milk) of the treatments with TG, alone or combined with phospholipase, did not differ significantly from each other and showed higher yields than the other treatments. The recovery of milk proteins in the requeijão cremoso indicated no significant differences among treatments. In contrast, fat recovery results showed significant differences, with the control treatment presenting the lowest lipid recovery among the enzymatic treatments, indicating that both phospholipase and transglutaminase, applied individually or in combination, promoted greater fat retention in the requeijão cremoso. The texture profile and instrumental colour were not significantly affected by enzyme application; however, changes in these parameters were observed across all treatments throughout the storage period. Similarly, there were no significant differences in melting capacity among treatments or with storage time. All samples met the microbiological standards required by current legislation. Sensory evaluation showed greater acceptance of requeijão cremoso made with phospholipase addition, whereas the use of isolated transglutaminase resulted in lower acceptance. Scanning electron microscopy analyses confirmed the technological results, showing structural changes characterised by better organisation of the protein matrix and more homogeneous distribution of fat globules in the treatments with enzyme application

Keywords: enzyme; phospholipase; transglutaminase; yield; texture profile; sensory analysis; microstructure.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Descrição de atributos sensoriais de requeijão cremoso 17
Figura 1 - Estrutura da membrana do glóbulo de gordura do leite (MGGL) 21
Figura 2 - Estrutura do fosfolipídio 22
Figura 3 - Reações catalisadas pela enzima transglutaminase 25
Figura 4 - Ligações cruzadas catalisas pela enzima transglutaminase 26
Quadro 2 - Descrição dos tratamentos experimentais aplicados na fabricação de requeijão cremoso 29
Figura 5 - Fluxograma de fabricação da massa do requeijão cremoso dos tratamentos Controle, Fosfolipase, TG e TG + Fosfo 32
Figura 6 - Processo de fabricação do requeijão cremoso 34
Figura 7 - Sistema de cor – CIELAB (A) e Modelo de cor – CIELAB (B) 38
Figura 8 - Tubos de vidro e suporte de madeira de inclinação controlada usados para teste de derretimento 39
Figura 9 - Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de requeijão cremoso em diferentes tratamentos 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos do requeijão cremoso 16
Tabela 2 - Composição físico-química do leite pasteurizado utilizado nos tratamentos (média ± DP)* 42
Tabela 3 - Composição físico-química da massa do requeijão nos diferentes tratamentos (média ± DP)* 43
Tabela 4 - Composição físico-química do soro dos diferentes tratamentos 45
Tabela 5 - Rendimento (kg/100 kg), a recuperação de proteína na massa (%) e recuperação de gordura na massa (%) nos diferentes tratamentos (média ± DP)* 46
Tabela 6 - Composição físico-química do Requeijão cremoso dos diferentes tratamentos (média ± DP)* 48
Tabela 7 - Elasticidade (mm) do requeijão cremoso submetido aos diferentes tratamentos ao longo do tempo (média ± DP)* 50
Tabela 8 - Dureza (N) do requeijão cremoso submetido aos diferentes tratamentos avaliados ao longo do tempo* 52
Tabela 9 - Coesividade do requeijão cremoso avaliada ao longo do tempo (média ± DP)* 54
Tabela 10 - Gomosidade (g) do requeijão cremoso submetido aos diferentes tratamentos ao longo do tempo (média ± DP)* 55
Tabela 11 - Luminosidade (L*) dos requeijões cremosos em função do tempo (média ± DP)* 56
Tabela 12 - Coordenada cromática (a*) dos requeijões cremosos em função do tempo (média ± DP)* 57
Tabela 13 - Coordenada cromática b* dos requeijões cremosos em função do tempo (média ± DP)* 58
Tabela 14 - Capacidade de derretimento (mm) do requeijão em função dos diferentes tratamentos aplicados (média ± DP)* 59
Tabela 15 - Resultados obtidos na avaliação microbiológica do requeijão cremoso. 60
Tabela 16 - Teste de aceitação sensorial do requeijão cremoso nos diferentes tratamentos (médias ± DP)* 61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIQ	Associação Brasileira das Indústrias de Queijos
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANOVA	Análise de Variância
AOAC	*Association of Official Agricultural Chemists*
DBC	Delineamento em Blocos Casualizados
DP	Desvio Padrão
EPAMIG	Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
EST	Extrato Seco Total
FOSFO	Fosfolipase
GES	Gordura no Extrato Seco
ILCT	Instituto de Laticínios Cândido Tostes
IN	Instrução Normativa
IMCU	*International Milk-Clotting Unit*
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MGGL	Membrana do glóbulo de gordura do leite
NaOH	Hidróxido de Sódio
N-NPN	Nitrogênio de compostos não proteicos
NT	Nitrogênio Total
pH	Potencial hidrogeniônico
RG	Recuperação de gordura
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
RP	Recuperação de proteína
SEM	*Scanning Electron Microscopy*
TG	Transglutaminase
TGM	Transglutaminase Microbiana
TPA	*Texture Profile Analysis*
UAT	Ultra Alta Temperatura
UFC	Unidades Formadoras de Colônias;
UHT	*Ultra High Temperature*

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Percentual
°C	Graus Celsius (unidade de temperatura)
cm	Centímetro
cm^2	Centímetro ao quadrado
g	Grama (unidade de medida de massa)
kg	Quilograma (unidade de medida de massa)
L	Litros
m/m	Massa/massa
m/v	Massa/volume
mg	Miligrama (unidade de medida de massa)
mL	Mililitro - (unidade de medida de volume)
Nm	Nanômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13
2 OBJETIVOS 15
2.1 OBJETIVO GERAL 15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 15
3 REVISÃO DE LITERATURA 16
3.1 REQUEIJÃO 16
3.1.1 Tecnologia de fabricação do requeijão cremoso 17
3.2 UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS COMO ALTERNATIVA TECNOLÓGICA 20
3.2.1 Enzima Fosfolipase 20
3.2.2 Enzima transglutaminase (TG) 24
3.2.3 Aplicação da enzima transglutaminase (TG) em produtos lácteos 26
4 MATERIAL E MÉTODOS 28
4.1 DESENHO EXPERIMENTAL 28
4.2 FABRICAÇÃO DA MASSA DO REQUEIJÃO 29
4.3 FABRICAÇÃO DO REQUEIJÃO CREMOSO 33
4.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE PARA FABRICAÇÃO DA MASSA DO REQUEIJÃO 34
4.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DA MASSA DO REQUEIJÃO 35
4.6 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO SORO 35
4.7 RENDIMENTO DA MASSA DO REQUEIJÃO 36
4.8 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO REQUEIJÃO CREMOSO 36
4.9 ANÁLISE DO PERFIL DE TEXTURA DO REQUEIJÃO CREMOSO 37
4.10 ANÁLISE DE COR INSTRUMENTAL 37
4.11 ANÁLISE DA CAPACIDADE DE DERRETIMENTO 38
4.12 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS 39
4.13 ANÁLISE SENSORIAL 40
4.14 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) 40
4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA 41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 42
5.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE PASTEURIZADO UTILIZADO NA FABRICAÇÃO DA MASSA DO REQUEIJÃO 42
5.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DA MASSA DO REQUEIJÃO 42

5.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO SORO 44
5.4 RENDIMENTO DA MASSA DO REQUEIJÃO 46
5.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO REQUEIJÃO CREMOSO 48
5.6 ANÁLISE DO PERFIL DE TEXTURA 49
5.6.1 Elasticidade 50
5.6.2 Adesividade 51
5.6.3 Dureza 51
5.6.4 Coesividade 53
5.6.5 Gomosidade 54
5.7 ANÁLISE DE COR INSTRUMENTAL 55
5.7.1 Luminosidade (L*) 55
5.7.2 Coordenada cromática a* 57
5.7.3 Coordenada cromática b* 58
5.8 CAPACIDADE DE DERRETIMENTO DO REQUEIJÃO CREMOSO 59
5.9 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS 60
5.10 ANÁLISE SENSORIAL 61
5.11 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) 62
6 CONCLUSÃO 69
REFERÊNCIAS 71
APÊNDICE 83
APÊNDICE A - Modelo da ficha-resposta do teste de aceitação (escala hedônica de nove pontos) para requeijão cremoso 83

1 INTRODUÇÃO

O requeijão é um produto tipicamente brasileiro, integra a categoria dos queijos de massa fundida e tem expressiva importância no mercado nacional. Sua produção baseia-se no aquecimento da massa obtida por coagulação ácida ou enzimática do leite, seguido da incorporação de água, creme de leite, cloreto de sódio e sais fundentes. Trata-se de um produto de elevado valor comercial e ampla inserção na cadeia láctea nacional.

Nos últimos anos, a produção brasileira de queijos fundidos teve uma expansão considerável. Esse fortalecimento se evidencia no aumento da produção desta categoria de queijo, com ênfase para o requeijão cremoso. Segundo dados da Associação Brasileira das Indústrias de Queijos (ABIQ, 2022), a produção de requeijão no ano de 2022 totalizou 376 toneladas para as versões requeijão culinário e cremoso.

As inovações tecnológicas aplicadas à produção do requeijão cremoso abrangem diferentes aspectos, desde a otimização dos processos industriais até o desenvolvimento de formulações mais funcionais e diferenciadas. Nesse contexto, diversos estudos têm sido conduzidos com o objetivo de elevar o padrão de qualidade do produto final e, ao mesmo tempo, reduzir os custos de fabricação, garantindo maior eficiência e valor agregado ao produto. Essas inovações evidenciam o esforço contínuo da indústria de laticínios em assegurar a qualidade, a segurança e a atratividade de seus produtos, alinhando-se às demandas do mercado e às expectativas dos consumidores por alimentos mais saudáveis, sustentáveis e economicamente acessíveis.

Dentre os diversos benefícios associados ao uso de enzimas na indústria de alimentos, destacam-se o aumento da eficiência produtiva, resultante da aceleração das reações químicas, a melhoria dos atributos sensoriais, como textura, sabor e aparência, o aprimoramento do valor nutricional e o incremento no rendimento dos processos de fabricação.

A enzima fosfolipase, por sua capacidade de atuar sobre os fosfolipídios presentes na membrana dos glóbulos de gordura, gera compostos com propriedades emulsificantes que interagem com as caseínas. Essa interação favorece a retenção de gordura e umidade na coalhada, resultando em maior rendimento de fabricação e em melhorias significativas na textura e no sabor dos queijos.

A transglutaminase tem sido amplamente empregada na indústria de alimentos por sua habilidade de catalisar ligações entre moléculas proteicas, especialmente entre as caseínas. A ação dessa enzima provoca modificações estruturais nas redes de proteínas, o que resulta em diversos ganhos tecnológicos, como melhoria na textura, aumento do rendimento, redução da sinérese, aprimoramento das propriedades emulsificantes, maior viscosidade, elasticidade e capacidade de retenção de água, sem provocar alterações perceptíveis no pH, na cor ou no sabor dos produtos.

O presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos da adição das enzimas fosfolipase e transglutaminase, isoladamente e em combinação, adicionadas no leite para elaboração da massa, analisando seu impacto no rendimento, nas características físico-químicas, no perfil de textura, na cor instrumental, na capacidade de derretimento, na microestrutura e nas propriedades sensoriais do requeijão cremoso, assegurando o cumprimento da legislação vigente aplicável a essa categoria de produto.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da utilização das enzimas fosfolipase e transglutaminase, aplicadas de forma isolada e em conjunto, adicionadas ao leite destinado à fabricação da massa, bem como sua influência sobre o rendimento, as características físico-químicas, o perfil de textura, a cor instrumental, a capacidade de derretimento, a aceitação sensorial e a microestrutura do requeijão cremoso.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as características físico-químicas do requeijão cremoso obtido a partir de massas fabricadas com a aplicação das enzimas fosfolipase e transglutaminase, verificando possíveis alterações decorrentes do tratamento enzimático.
- Investigar o efeito da aplicação de enzimas sobre o rendimento de fabricação do requeijão cremoso.
- Avaliar a cor instrumental e o perfil de textura do requeijão cremoso fabricado com as diferentes enzimas.
- Determinar a capacidade de derretimento das diferentes formulações de requeijão cremoso fabricado com as diferentes enzimas.
- Verificar se os requeijões cremosos fabricados atendem aos requisitos microbiológicos estabelecidos pela legislação.
- Verificar a aceitação sensorial dos requeijões cremosos fabricados.
- Caracterizar e comparar a microestrutura do requeijão cremoso obtido com e sem a adição das enzimas fosfolipase e transglutaminase no leite destinado à elaboração da massa, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 REQUEIJÃO

Requeijão é um queijo de origem brasileira, definido pela legislação por meio da Portaria nº 359, de 04 de setembro de 1997 (Portaria 359/1997), do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), como o produto obtido pela fusão da massa coalhada, cozida ou não, dessorada e lavada, obtida por coagulação ácida e/ou enzimática do leite opcionalmente adicionada de creme de leite e/ou manteiga e/ou gordura anidra de leite ou *butter oil.* Pode ser adicionado de condimentos, especiarias e/ou outras substâncias alimentícias, entretanto, a denominação requeijão está reservada ao produto no qual a base láctea não contenha gordura e/ou proteína de origem não láctea (BRASIL, 1997).

A Tabela 1 apresenta os requisitos físico-químicos do requeijão cremoso exigidos pela legislação (BRASIL, 1997).

Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos do requeijão cremoso.

Requisitos Físico-químicos	**Critério de aceitação**	**Método de Análises**
Matéria gorda no extrato seco g/100 g	Mín. 55,0	Norma FIL 5B: 1986
Umidade g/100 g	Máx. 65,0	Norma FIL 4A: 1982

Fonte: Brasil (1997).

O requeijão cremoso é geralmente consumido pouco tempo após sua produção e deve possuir sabor levemente ácido e agradável, aroma característico de fermentação láctica e textura homogênea, com cremosidade ou untuosidade típica do produto (Oliveira, 1987).

As características sensoriais do requeijão cremoso estão detalhadas no Quadro 1 (Cavalcante, 1971; Van Dender *et al.*, 2000).

Quadro 1 - Descrição de atributos sensoriais de requeijão cremoso.

Atributo	Definição
Cor	A coloração típica do requeijão apresenta-se do branco-creme uniforme ao amarelo claro. Alterações incomuns na coloração incluem a formação de manchas e tons mais acentuadamente amarelados.
Aroma	Característico, com tendência à acidez e sem sabor picante.
Textura	Cremosa, lisa ou compacta com formação de fios.
Consistência	Consistência macia e uniforme. Alterações incomuns incluem textura arenosa e presença de grumos.
Gosto ácido	Acidez leve e característica, resultante dos componentes ácidos presentes no produto.
Gosto salgado	Sabor levemente salgado, característico do produto.
Gosto amargo	Sabor amargo ausente, não característico do requeijão.
Definição sensorial	O sabor deve ser suave e levemente salgado, podendo apresentar leve adocicado, mas sem picância.

Fonte: Adaptado de Cavalcante (1971).

Os queijos fundidos, como o requeijão cremoso, apresentam elevados teores de gordura. Esse componente desempenha papel importante na estabilidade térmica, na emulsificação e na incorporação de ar, proporcionando uma textura mais macia e fácil de espalhar, além de influenciar positivamente sua cor e sabor (Alves *et al.*, 2015; Mayta-Hancco *et al.*, 2019; Ningtyas *et al.*, 2019; Karahan; Akin, 2017).

3.1.1 Tecnologia de fabricação do requeijão cremoso

No Brasil, a indústria utiliza principalmente três métodos para a produção da massa destinada ao requeijão cremoso: pela coagulação ácida: a) via processo fermentativo, em que se utiliza culturas láticas; b) a acidificação direta do leite quente utilizando ácidos como lático a 85% ou ácido acético e c) a coagulação enzimática (Anon, 1999; Fernandes, 1981).

A coagulação ácida ocorre quando o pH do leite é reduzido até atingir o ponto isoelétrico da caseína, aproximadamente 4,6, a cerca de 20 °C. Nesse processo, as cargas elétricas das partículas coloidais da caseína são neutralizadas, eliminando a

força de repulsão eletrostática causada pelo excesso de cargas negativas presente em pH próximo à neutralidade. Com isso, as partículas coloidais podem se agregar, formando um coágulo ou gel (Oliveira, 1987).

A acidificação pode ocorrer de maneira direta, pela adição de ácido, ou indireta, por meio da fermentação láctica (Gigante, 1998). Quando se utilizam culturas láticas, as bactérias degradam a lactose, produzindo ácido lático, o que reduz o pH do leite de aproximadamente 6,6 para cerca de 4,6, promovendo a coagulação do leite (Oliveira, 1987).

Na coagulação enzimática, uma enzima proteolítica, sendo a quimosina a mais utilizada na prática, atua sobre a fração “kappa” da micela de caseína, eliminando sua função protetora. Com isso, as partículas coloidais tornam-se instáveis na presença de íons cálcio, levando à formação de um gel e, consequentemente, à coagulação do leite (Oliveira, 1987).

Na fabricação do requeijão, aplica-se o princípio fundamental de fusão dos seus principais constituintes, gordura e proteína, submetendo a matéria-prima simultaneamente ao calor e à agitação mecânica, preferencialmente em tachos específicos, a fim de obter uma mistura homogênea. Além disso, é indispensável a adição de sais fundentes, cuja função é promover a emulsificação e evitar a separação entre as fases gordurosa e aquosa da massa (Cruz *et al.*, 2017; Van Dender; Zacarchenco, 2016).

Os sais fundentes removem o cálcio do sistema proteico, promovem a peptização, hidratação, a solubilização e a dispersão das proteínas, além de estabilizar a emulsão, regular o pH e favorecer a formação de uma estrutura adequada no produto após o resfriamento. É desejável, ainda, que os sais não alterem o sabor e o aroma, não recristalizem durante o armazenamento e apresentem efeito bacteriostático (Caric *et al.*, 1985; Holtorff *et al.*, 1951; Meyer, 1973; Palmer; Sly, 1994; Shimp, 1985).

Os sais fundentes mais utilizados na produção de requeijão incluem citratos, monofosfatos de sódio e fosfatos à base de sódio e potássio (Cruz *et al.*, 2017; Masson, Viganó; Bordignon, 2016). Os sais fundentes são essenciais na produção de queijos fundidos, porém o tipo e a quantidade a serem empregados variam de acordo com diversos fatores, incluindo o tipo de massa utilizada como matéria-prima, seu pH e estrutura; a inclusão de outros ingredientes permitidos pela legislação; o equipamento utilizado no processo de fusão; e as características desejadas para o

produto final (Meyer, 1973; Zehren; Nusbaum, 1992).

A água desempenha papel essencial na fusão e na fabricação de requeijão cremoso e de outros queijos fundidos, facilitando a transferência de energia térmica e mecânica, além de atuar como solvente e dispersante da mistura. É incorporada à massa para dissolver o sal, favorecer a dispersão da caseína e promover a emulsificação entre proteínas e gordura (Belsito, 2016).

O creme de leite, a manteiga ou outras fontes de gordura permitidas são incorporados à massa durante o processo de fusão (Valle, 1981). A quantidade de gordura adicionada é determinada pelo teor desejado no extrato seco do produto final, bem como pelos níveis de gordura e de extrato seco presentes na massa inicial (Meyer, 1973; Valle, 1981). Além de contribuir para o sabor do requeijão, a adição de gordura é fundamental para conferir cremosidade, tornando o produto mais agradável ao consumo e aprimorando suas características sensoriais (Valle, 1981).

O cloreto de sódio é empregado na produção de queijos por diversos motivos. Além de realçar e complementar o sabor, o sal contribui para a melhoria da textura e da aparência do produto, além de inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis (Ribeiro, 2000).

A cremificação é um processo físico-químico obtido por meio da malaxagem a quente, cujo objetivo é hidratar as finas partículas do queijo, parcialmente modificadas, aumentando sua viscosidade. Esse processo tem início durante o aquecimento da massa a altas temperaturas (92–95 °C) na homogeneizadora e se prolonga até o resfriamento. Nessa etapa, os ânions polivalentes dos sais fundentes com efeito cremificante, especialmente o difosfato de sódio, interagem com as proteínas modificadas, ampliando seu caráter hidrofílico. Além disso, novas ligações são formadas na presença de moléculas deslizantes, resultando em partículas capazes de reter grandes quantidades de água e, consequentemente, aumentar a viscosidade da massa coloidal (Van Dender *et al.*, 2000).

Ressalta-se a necessidade de utilizar leite de alta qualidade na produção de requeijão cremoso, pois qualquer falha nesse insumo compromete toda a cadeia de processamento. Da mesma forma, é fundamental assegurar a qualidade dos demais ingredientes, prevenindo problemas de contaminação microbiológica ou física no produto final (Van Dender *et al.*, 2000).

Uma das principais formas de comercialização do requeijão cremoso é em copos de vidro ou polietileno, sendo os mais comuns com fechamento com folha-de-

flandres de fácil abertura . A vedação e a hermeticidade desse tipo de embalagem são garantidas pela baixa tensão de oxigênio interna formada durante o resfriamento do produto, mantendo-se praticamente constante ao longo de sua vida útil. A durabilidade do requeijão nesse tipo de embalagem varia entre 45 e 60 dias ou até 5 meses, dependendo do processo de fabricação adotado (Van Dender *et al.*, 2000).

3.2 UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS COMO ALTERNATIVA TECNOLÓGICA

No contexto industrial, o setor de alimentos destaca-se como o que apresenta a maior demanda por enzimas de aplicação tecnológica em nível mundial. Essas biomoléculas desempenham papel crucial na otimização de processos, no aprimoramento da qualidade dos produtos e no incremento da eficiência produtiva (Garg; Sehrawat; Yadav, 2016).

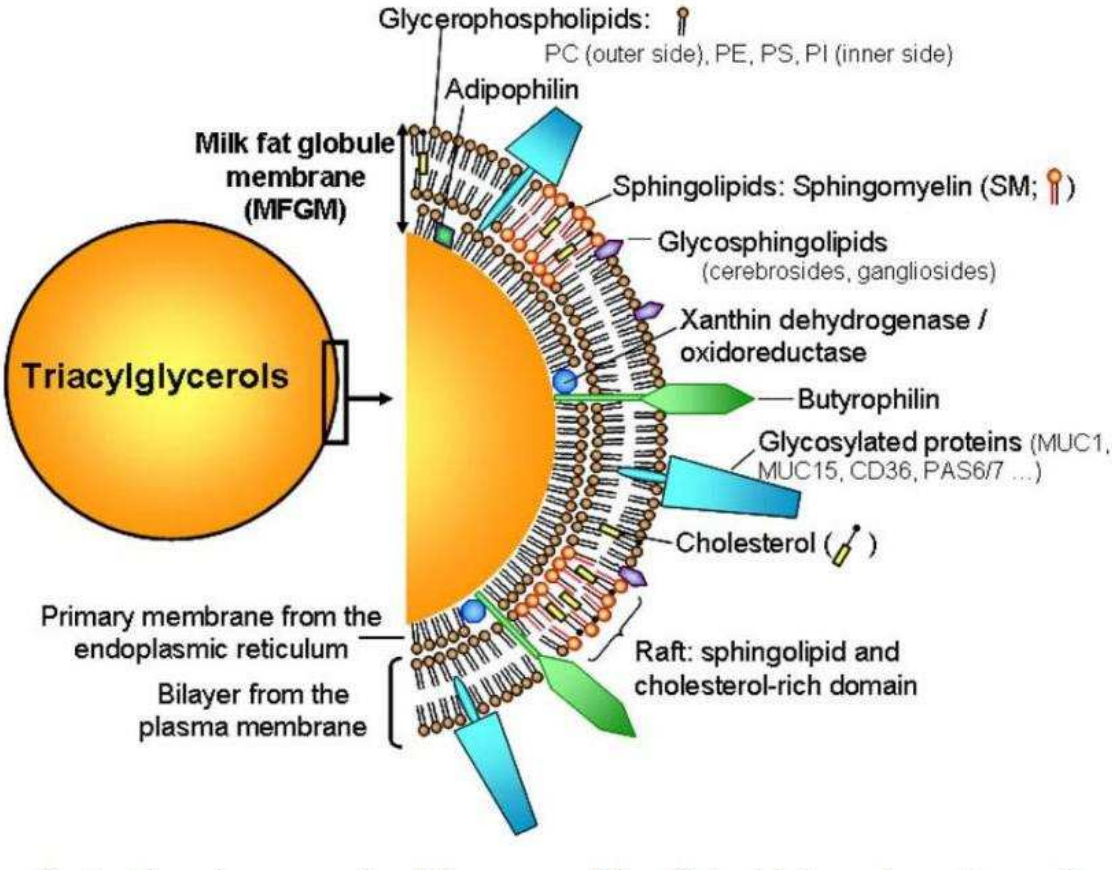
Enzimas são um grupo de proteínas produzidas por organismos vivos, capazes de modificar ou acelerar reações bioquímicas, sendo comumente denominadas biocatalisadores. Sua atuação é altamente específica, de modo que cada enzima catalisa apenas um tipo de reação (Vidal; Saran Netto, 2018). São utilizadas em diversos segmentos da indústria alimentícia, como panificação, bebidas, carnes e laticínios. Sua aplicação difundida se deve à elevada especificidade em relação ao substrato, pH, temperatura e pressão, além da alta atividade catalítica e da eficiência na conversão em produtos desejados (Fernandes, 2010). No setor de alimentos, as enzimas desempenham papel fundamental ao modificar matérias-primas para a obtenção de produtos específicos, influenciando a composição, o processamento e a preservação dos alimentos (Domingos, 2022). Para a aplicação em escala industrial, é fundamental considerar fatores como especificidade, estabilidade durante o armazenamento, disponibilidade e custo. Adicionalmente, é importante avaliar o desempenho da enzima em relação a pH, temperatura, força iônica, tempo de reação e tipo de substrato (Monteiro; Silva, 2009).

3.2.1 Enzima Fosfolipase

Os lipídios do leite encontram-se na forma de glóbulos esféricos, revestidos por uma membrana composta por proteínas, fosfolipídios, glicolipídios, esteróis e glicerídeos (El-Loly, 2011).

A Figura 1 apresenta uma representação da membrana do glóbulo de gordura do leite. A camada mais interna envolve a gota lipídica, formada por lipídios polares e proteínas, seguida por uma camada proteinácea eletrodensa. Na superfície externa, observa-se uma bicamada composta por lipídios polares e proteínas. Embora diversos fatores possam alterar essa estrutura, normalmente ela contém cerca de 25% de proteínas, principalmente glicoproteínas, e aproximadamente 70% de lipídios, dos quais 55 a 70% são lipídios neutros e cerca de 40% são lipídios polares (Costa, Jiménez-Flores; Gigante, 2009).

Figura 1 - Estrutura da membrana do glóbulo de gordura do leite (MGGL).

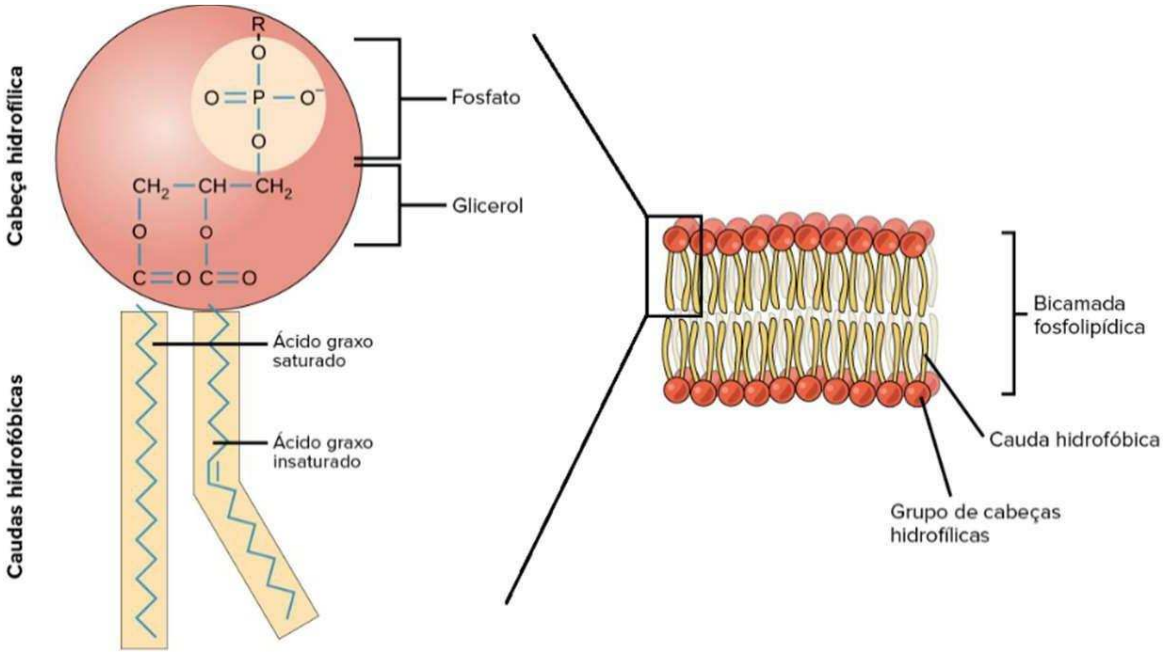


Fonte: Lopez, Madec e Jimenez-Flores (2010).

Entre os lipídios neutros presentes na membrana do glóbulo de gordura do leite, cerca de 95% correspondem a triacilgliceróis, enquanto diacilgliceróis, monoacilgliceróis, colesterol e seus ésteres aparecem em menor proporção. Os lipídios polares são formados principalmente por diferentes tipos de fosfolipídios, com destaque para glicerofosfolipídios e esfingofosfolipídios (Costa, Jiménez-Flores; Gigante, 2009).

A Figura 2 ilustra a estrutura de um fosfolipídio, uma molécula de natureza anfifílica, que possui uma extremidade hidrofílica e outra hidrofóbica. A porção hidrofílica (“cabeça”), contém um grupo fosfato ligado a diferentes grupos orgânicos, enquanto a extensão hidrofóbica (“cauda”) é constituída por ácidos graxos saturados e insaturados (Dewettinck *et al.*, 2008).

Figura 2 - Estrutura do fosfolipídio.



Fonte: Fay (1967).

As fosfolipases são um grupo de lipases que se distinguem pela capacidade de hidrolisar fosfolipídios e outros lipídios (Borrelli; Trono, 2015). Essas enzimas atuam rompendo as ligações éster dos fosfolipídios e, dependendo do sítio de ação, podem gerar diversos produtos, como liso-fosfolipídios, ácidos graxos livres, diacilgliceróis, fosfatidilcolina e fosfatídios (Borrelli; Trono, 2015).

Essas enzimas têm origem microbiana e são sintetizadas por diferentes tipos de fungos, incluindo espécies como *Aspergillus oryzae* e *Fusarium oxysporum*. Após a produção, elas passam por etapas de processamento e purificação antes de serem aplicadas em escala industrial (Casado; Silva; Oliveira, 2012; Karahan; Akin, 2017).

Dentre as fosfolipases, destacam-se as empregadas pela indústria de laticínios, com o objetivo de aprimorar a textura e aumentar o rendimento de fabricação dos queijos. Isso porque, embora presentes em pequenas quantidades na membrana dos

glóbulos de gordura, os fosfolipídeos desempenham papel fundamental na estabilização da gordura no leite (De Maria *et al.*, 2007; Karahan; Akin, 2017).

De acordo com Lilbaek *et al.* (2006), a adição de fosfolipase ao leite durante o processamento promove a hidrólise dos fosfolipídeos presentes na membrana dos glóbulos de gordura, resultando na formação de lisofosfolipídeos, compostos com elevada capacidade emulsificante que interagem com as caseínas. Essa interação promove a retenção dos constituintes do leite na matriz do queijo, contribuindo para o aumento do rendimento do produto final.

A ação dessas moléculas contribui para reduzir perdas de sólidos no soro e ajustar a umidade da coalhada, favorecendo, consequentemente, maior rendimento (De Maria *et al.*, 2007; Karahan; Akin, 2017). Em termos tecnológicos, o efeito positivo da aplicação de fosfolipases relaciona-se à hidrólise parcial dos fosfolipídios, resultando na liberação de ácidos graxos e lisofosfolipídios, compostos que aumentam a estabilidade da emulsão durante o processamento (Casado; Silva; Oliveira, 2012; Lilbaek *et al.*, 2006; Trancoso-Reyes *et al.*, 2014). Portanto, a adição dessa enzima contribui para a melhoria da consistência, a redução de sinérese e a otimização do rendimento final do produto.

Com o crescente interesse da indústria em otimizar a produção de queijos, foi desenvolvido um método enzimático que utiliza o tratamento do leite com fosfolipase. Essa abordagem tem se mostrado eficaz para elevar o rendimento sem comprometer a qualidade do produto final (Karahan; Akin, 2017; Kelly; Huppertz; Sheehan, 2008).

De acordo com De Maria *et al.* (2007), essa reação aumenta a retenção de gordura e umidade, mantendo entre 85% e 95% da gordura e cerca de 75% da proteína do leite retidas na coalhada. Höier *et al.* (2006) relataram que a interação entre fosfolipídios hidrolisados e proteínas elevou a retenção de gordura no coágulo, resultando em aumentos de rendimento de 0,7% a 3,8%.

Segundo Lilbaek *et al.* (2006), a aplicação de fosfolipase na produção de queijo muçarela aumentou o rendimento, sem afetar a qualidade nem as propriedades funcionais do produto. A hidrólise dos fosfolipídios antes da coagulação favoreceu a retenção de gordura durante a remoção do soro. Os queijos obtidos com a adição da enzima apresentaram rendimento 3,2% superior em comparação ao tratamento controle, sem enzima. Além disso, verificou-se que os queijos obtidos com o uso de fosfolipase apresentaram maior teor de umidade quando comparados aos elaborados sem sua adição.

Conforme Brito (2019), a aplicação de fosfolipase na fabricação do queijo Minas Frescal apresentou efeitos benéficos tanto no rendimento quanto na aceitação sensorial, sendo esta última semelhante à do produto elaborado sem enzima. O rendimento (kg de queijo/100 kg de leite) foi significativamente superior no tratamento com enzima, com incremento de 3,38% em relação ao controle, além de menor perda de gordura no soro atribuída à ação emulsificante da fosfolipase. A autora destaca que esse efeito pode estar relacionado às características tecnológicas do queijo Minas Frescal, cuja formação de grãos maiores favorece a interação entre a enzima e os glóbulos de gordura, potencializando sua ação.

A aplicação de fosfolipase na produção de queijo Minas Padrão também apresentou resultados promissores. Observou-se que foi possível alcançar o mesmo rendimento em queijos elaborados com leite contendo 3,1% e 2,5% de gordura, sem alterações significativas na umidade ou no teor de gordura do extrato seco. Esse resultado representa um benefício importante para a indústria, pois permite o aproveitamento do creme excedente em outros derivados, por exemplo, a manteiga, sem comprometer as características tecnológicas e sensoriais do queijo (Domingos, 2022).

3.2.2 Enzima transglutaminase (TG)

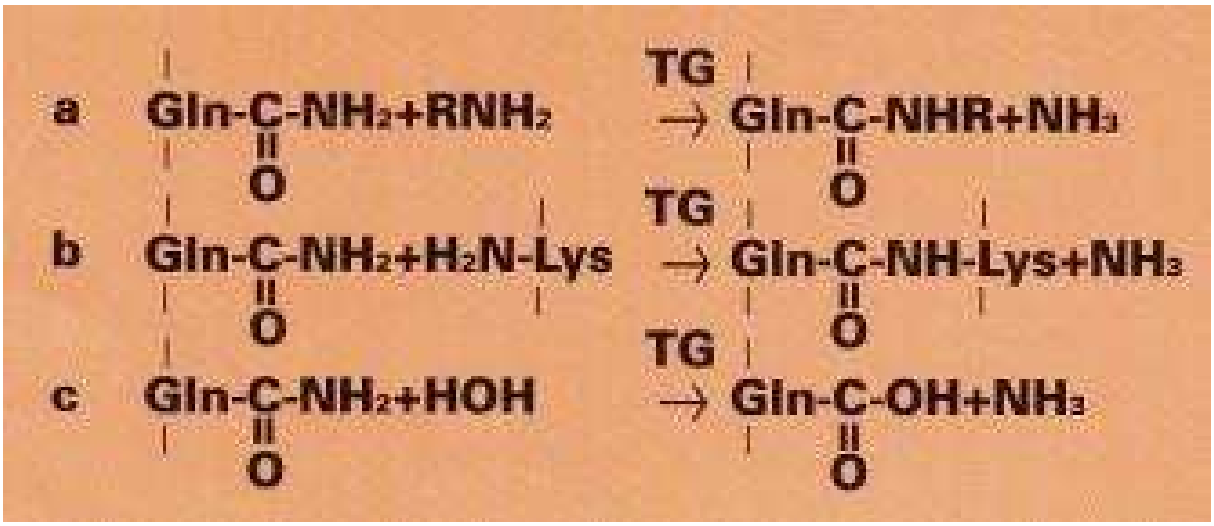
A transglutaminase é uma enzima da classe das transferases que atua catalisando reações de acil-transferência entre resíduos de proteínas. Diferentemente de outras enzimas, que promovem a degradação de substratos em compostos menores, a transglutaminase estimula a formação de polímeros, unindo pequenos substratos proteicos em moléculas de maior peso molecular. Promove a formação de ligações covalentes cruzadas (*crosslinks*) entre os resíduos dos aminoácidos glutamina e lisina (ligações G-L). Tal mecanismo pode ser explorado para incorporar lisina às proteínas, contribuindo para o aprimoramento de suas propriedades funcionais e nutricionais (Nokata *et al.*, 1996).

Para uso industrial, a transglutaminase é produzida por meio de fermentação microbiológica, geralmente utilizando microrganismos como *Streptoverticillium mobaraense*, capazes de sintetizar a enzima em escala industrial. Após a etapa fermentativa, o produto passa por processos de concentração e purificação, visando remover impurezas, garantindo estabilidade, segurança e eficiência tecnológica para

aplicação em alimentos (Motoki; Seguro, 1998; Yokoyama; Nio; Kikuchi, 2004; Fadini *et al.*, 2021).

A Figura 3 ilustra as reações catalisadas pela enzima transglutaminase, evidenciando o mecanismo de formação das ligações covalentes entre resíduos de glutamina e lisina nas proteínas.

Figura 3 - Reações catalisadas pela enzima transglutaminase.

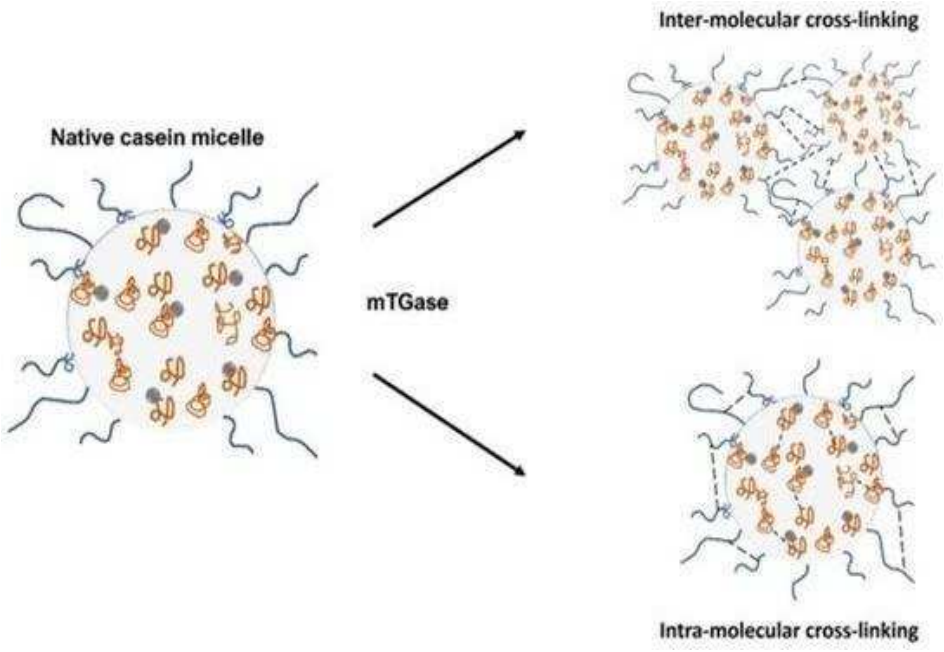


a: reação de acil-transferência; b: reação de ligação cruzada entre resíduos proteicos de Gin e Lys; c: deamidação.
Fonte: Kuraishi *et al.* (1996).

A transglutaminase microbiana (TGM) tem-se mostrado uma alternativa promissora no processamento de alimentos, pois catalisa a transferência de radicais acil, promovendo a formação de ligações cruzadas intra- e intermoleculares entre proteínas, principalmente por meio de ligações covalentes entre resíduos de glutamina e lisina (Han *et al.*, 2008; Nonaka *et al.*, 1989), conforme ilustrado na Figura 4.

Essas reações modificam significativamente as matrizes proteicas, trazendo diversos benefícios tecnológicos, como melhoria da textura, estabilidade térmica, aumento do rendimento e redução da sinérese (Özer *et al.*, 2013; Ajinomoto, 2013). Adicionalmente, a TGM melhora diversas propriedades funcionais dos alimentos, como a capacidade de emulsificação, gelificação, formação de espuma, viscosidade, elasticidade e retenção de água, sem causar alterações no pH, na cor ou no sabor dos produtos (Damodaran; Agyare, 2013).

Figura 4 - Ligações cruzadas catalisas pela enzima transglutaminase.



Fonte: Velazquez-Dominguez *et al.* (2023).

3.2.3 Aplicação da enzima transglutaminase (TG) em produtos lácteos

Em 12 de março de 2024, foram publicadas no Diário Oficial da União a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 849, de 8 de março de 2024, e a Instrução Normativa (IN) nº 286, de 8 de março de 2024 (BRASIL, 2024 a, b), que internalizam no Brasil a norma do Mercosul sobre princípios gerais, funções tecnológicas e condições de uso de aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia em alimentos. Essas regulamentações estabelecem critérios harmonizados para aplicação segura e adequada desses insumos, contemplando diferentes categorias de alimentos e coadjuvantes de tecnologia. Entre as disposições aprovadas, destaca-se a autorização para o uso de enzimas na fabricação de queijos, incluindo especificamente transglutaminase e fosfolipase, que desempenham papel relevante na melhoria da textura, funcionalidade e características sensoriais do produto.

Entre as proteínas do leite, as caseínas se destacam como excelentes substratos para a TG devido ao seu baixo grau de estrutura terciária, oferecendo condições ideais para a ação enzimática (Bonisch *et al.*, 2007; Huppertz; Kruif, 2007). A κ-caseína, localizada na superfície da micela, possui quatro resíduos potenciais de glutamina, sendo dois deles situados na região hidrofílica do caseino-macropeptídeo (CMP). Esses resíduos atuam como pontos de reticulação para a TG, contribuindo

para o elevado potencial de alterar as propriedades de textura em produtos lácteos (Lorenzen, 2007).

De acordo com Lorenzen e Schlimme (1998), a TG apresenta aplicações relevantes em diferentes produtos lácteos. Em iogurtes, sua utilização está associada ao aumento da firmeza do gel e à redução da sinérese. Na fabricação de queijos, contribui para maior rendimento e menor perda de sólidos no soro. Em sorvetes, a enzima favorece a retenção de água e melhora as propriedades de gelificação, resultando em estabilidade estrutural. Além disso, pode elevar a viscosidade e a capacidade de emulsificação dos caseinatos, viabilizando também a produção de concentrados lácteos gelificados para uso em sobremesas.

Rodrigues *et al.* (2016) observaram que a adição de TG (0,06%) no processamento de queijo Minas Frescal promoveu um aumento de aproximadamente 6,5% no rendimento, quando comparado ao tratamento sem a enzima. Esse efeito foi associado à formação de ligações cruzadas entre as proteínas do leite, que promovem uma rede gelificada mais coesa e estável, com maior capacidade de retenção de água. A compactação da matriz proteica reduziu o tamanho e a permeabilidade dos poros do gel, limitando a perda de soro durante o processamento (Faegemand; Qvist, 1997).

De acordo com Coelho (1998), estudos sobre a aplicação de TG em iogurte desnatado indicaram efeitos positivos no tempo de fermentação do leite, bem como na firmeza do gel e na redução da sinérese durante o armazenamento refrigerado. A adição não alterou o tempo de fermentação, confirmando os resultados observados por Bönisch *et al.* (2007). Além disso, o iogurte desnatado com TG apresentou firmeza significativamente maior em relação ao controle, mantendo suas características ao longo do período de armazenamento.

O uso da TG constitui uma alternativa tecnológica promissora, possibilitando a produção de derivados lácteos com propriedades reológicas e sensoriais aprimoradas, além de promover maior aproveitamento do leite, reduzir custos e aumentar a rentabilidade na indústria (Oliveira, 2003).

Portanto, a investigação do uso da TG em requeijão revela-se de grande importância para a indústria de laticínios, pois a enzima apresenta potencial para avanços tecnológicos e econômicos, atendendo às demandas do mercado e promovendo inovações no setor de derivados lácteos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A fabricação do requeijão cremoso e as análises físico-químicas, perfil de textura, cor instrumental, capacidade de derretimento e análise sensorial foram realizadas nas instalações da fábrica-escola e nos laboratórios da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais Instituto de Laticínios Candido Tostes (EPAMIG ILCT). A microscopia de varredura foi realizada no laboratório de Física da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). As análises microbiológicas foram realizadas por um laboratório terceirizado.

4.1 DESENHO EXPERIMENTAL

O desenvolvimento do trabalho ocorreu em etapas distintas. Inicialmente, foram realizados pré-testes com o objetivo de ajustar a tecnologia utilizada, considerando o teor de gordura do leite e a aplicação da enzima fosfolipase na fabricação da massa. De forma semelhante, foram avaliadas a dosagem e o momento de aplicação da enzima TG, visando buscar o melhor desempenho no processo de produção.

A aplicação da enzima fosfolipase foi realizada na mesma forma que utilizada no queijo muçarela com o teor de gordura do leite de 2,5%. Para a inclusão da enzima TG no processo tecnológico, foi utilizada as especificações e o modo de aplicação de acordo com as recomendações do fabricante.

As concentrações de gordura nas formulações foram estabelecidas de modo a atender à exigência mínima definida pela Portaria 359/1997 (BRASIL, 1997). Para fins deste estudo, as formulações consideraram as características do extrato seco total (EST), conforme estabelecido na legislação, garantindo adequação nos teores de gordura e umidade, bem como atendendo às propriedades desejáveis do produto final. O experimento foi conduzido em delineamento em blocos casualizados (DBC), no esquema de parcelas subdivididas, composto por quatro tratamentos e três repetições. Nas análises realizadas ao longo do armazenamento, os tratamentos constituíram o fator principal e os tempos de avaliação, o subfator. Para as análises realizadas em um único momento como a análise sensorial, a composição centesimal e o rendimento, utilizou-se o delineamento em blocos casualizados (DBC).

As análises de textura, cor instrumental e capacidade de derretimento foram realizadas em quatro tempos de estocagem: 1, 30, 45 e 60 dias de estocagem refrigerada.

Os tratamentos experimentais foram estruturados conforme apresentado no Quadro 2.

Quadro 2 - Descrição dos tratamentos experimentais aplicados na fabricação de requeijão cremoso.

Tratamento	Descrição
CONT. (Controle)	Produção realizada sem a adição de enzimas (fosfolipase e TG), representando a tecnologia convencional e servindo como parâmetro de comparação.
FOSFO (fosfolipase)	A produção foi conduzida mediante a adição da fosfolipase no leite destinado à elaboração da massa, na dosagem de 0,016% (v/v) para avaliação isolada de seus efeitos.
TG (transglutaminase)	A produção foi conduzida mediante a adição da TG no leite destinado à elaboração da massa, na dosagem de 0,01% (m/v) para avaliação isolada de seus efeitos.
TG + FOSFO (Enzimas transglutaminase + fosfolipase)	Produção desenvolvida com aplicação conjunta das enzimas fosfolipase e TG no leite destinado à elaboração da massa, nas dosagens 0,016% (v/v) e 0,01% (m/v) respectivamente, a fim de investigar possíveis efeitos sinérgicos decorrentes da utilização combinada.

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

4.2 FABRICAÇÃO DA MASSA DO REQUEIJÃO

Neste trabalho, optou-se pela utilização da coagulação enzimática, empregando quimosina, para a obtenção da massa láctea. O leite foi previamente padronizado para 2,5% de gordura e submetido à pasteurização em trocador de calor a placas (72-75 °C por 15-20 segundos). Após a pasteurização, foi pesado, empregando-se 30 kg em cada fabricação. Importante destacar que o mesmo leite foi utilizado em todos os tratamentos, a fim de garantir a comparabilidade entre as

diferentes formulações, assegurando maior confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos durante o estudo.

O leite foi aquecido a 35 °C e inoculado 0,14 g de fermento lácteo composto pelas culturas *Lactobacillus helveticus* e *Streptococcus thermophilus*, com tempo de pré-maturação de 30 minutos. Na sequência, foram adicionados 15 mL de solução de cloreto de cálcio a 40%(m/v) e 1,5 ml de quimosina com atividade de 600 IMCU, sendo o tempo de coagulação fixado em 40 minutos.

Nos tratamentos que envolveram a aplicação de enzimas, foco central deste estudo, adotaram-se adaptações específicas no processamento, de modo a possibilitar a avaliação comparativa de seus efeitos sobre a massa e no requeijão.

Para o ensaio envolvendo fosfolipase, a enzima foi adicionada simultaneamente à inoculação do fermento lácteo, na dosagem de 5 ml para cada 30 kg de leite, respeitando-se um período de 30 minutos destinado tanto à ativação enzimática quanto à pré-maturação do fermento. Após esse intervalo, procedeu-se à adição do coagulante para início da coagulação enzimática.

No tratamento utilizando a TG, foi inicialmente separada uma alíquota de 1 L de leite, à qual foram adicionados 3 g de enzima e devidamente dissolvida em leite a 42 °C. A mistura permaneceu em incubação por 30 minutos para permitir a completa ativação da enzima, sendo posteriormente incorporada ao tanque de fabricação contendo o leite. Em seguida procedeu-se à adição do coagulante para início da coagulação enzimática.

Nos tratamentos que envolveram a aplicação conjunta de fosfolipase e TG adotaram-se os mesmos procedimentos descritos para a adição isolada de cada enzima. Inicialmente, a fosfolipase foi incorporada diretamente ao leite juntamente com o fermento lácteo, na dosagem de 5 mL para cada 30 kg de leite, respeitando o período de 30 minutos destinado à ativação da enzima e à pré-maturação do fermento. Paralelamente, 3 gramas de TG foi previamente diluída em uma alíquota de 1 L de leite aquecido a 42 °C e incubada na mesma temperatura por 30 minutos, essa alíquota foi transferida para o tanque de fabricação e posteriormente seguiu-se a adição do coagulante, iniciando-se assim a coagulação enzimática.

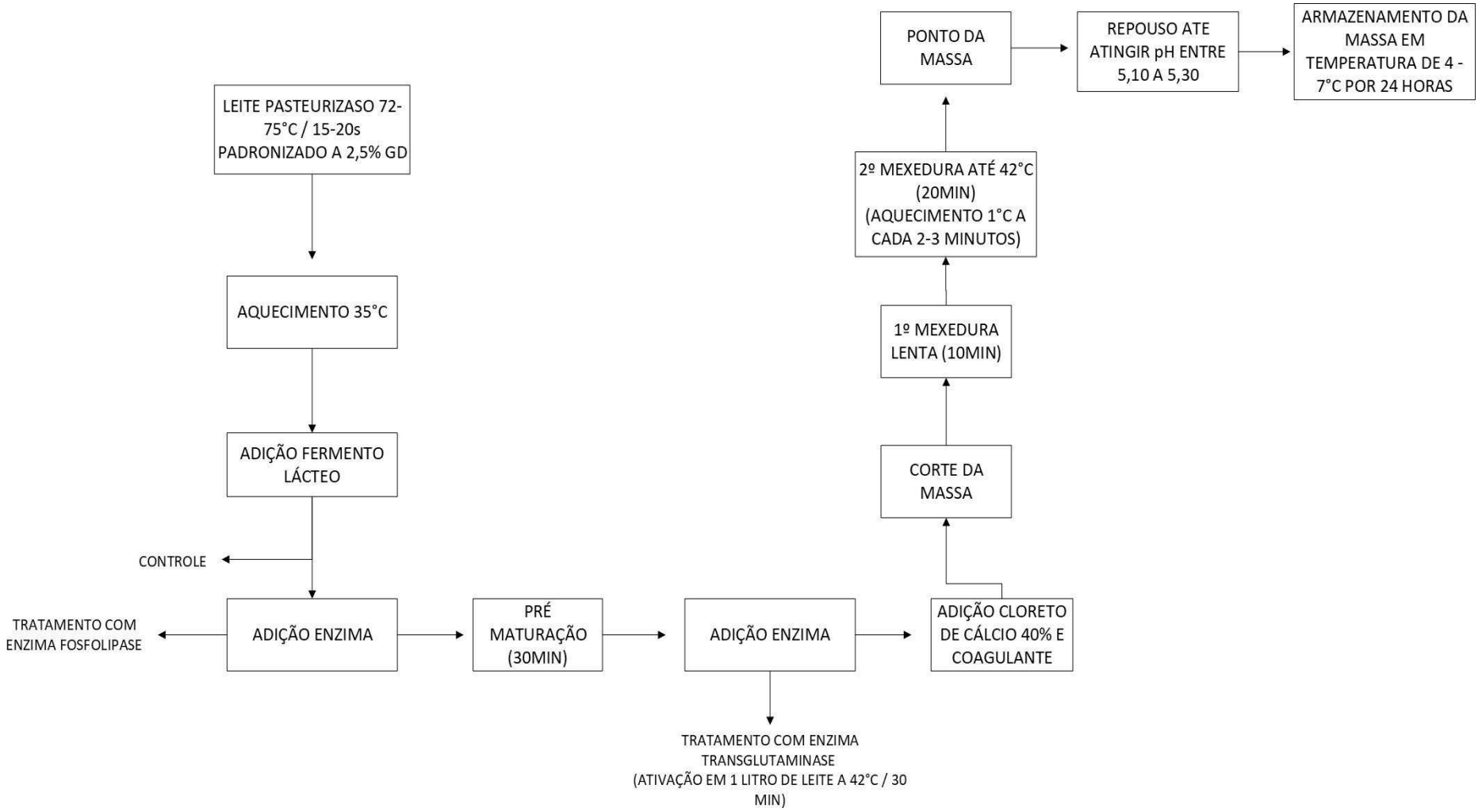
A massa coagulada foi cortada em grãos entre 1,0 e 1,5 cm² de aresta, seguido da primeira mexedura lenta, conduzida por 10 minutos. Posteriormente, realizou-se a segunda mexedura, em que o aquecimento da massa foi conduzido de forma gradual, a uma taxa aproximada de 1 °C a cada 2 a 3 minutos, até atingir a temperatura de 42

°C, em um período total de aproximadamente 20 minutos até a obtenção do ponto. Após a obtenção do ponto, com auxílio de lira, a massa foi direcionada a uma das extremidades do tanque. Em seguida, a massa permaneceu em repouso, coberta pelo soro, até que o pH atingisse valores compreendidos entre 5,10 e 5,30, quando foi cortada em blocos e armazenada em câmara fria, sob temperatura controlada entre 4 e 7 °C, pelo período de 24 horas.

Cada lote de massa obtido nas diferentes formulações foi cuidadosamente identificado conforme o tratamento aplicado, pesado e armazenado adequadamente para avaliações posteriores.

O fluxograma referente ao processamento da massa do requeijão cremoso Controle, Fosfo, TG e TG +Fosfo está apresentados na Figura 5.

Figura 5 - Fluxograma de fabricação da massa do requeijão cremoso dos tratamentos Controle, Fosfolipase, TG e TG + Fosfo.



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

4.3 FABRICAÇÃO DO REQUEIJÃO CREMOSO

O processo de fusão da massa para a elaboração do requeijão cremoso foi realizado no equipamento Thermomix (Volwerk) equipado com balança acoplada e controle de temperatura e velocidade.

Os ingredientes foram pesados diretamente no equipamento, sendo utilizados 350 g de creme de leite com 50% de gordura, 15 g de cloreto de sódio, 19 g de sal fundente JOHA S9 B (marca comercial, fornecido por ICL Foods) e 200 mL de água.

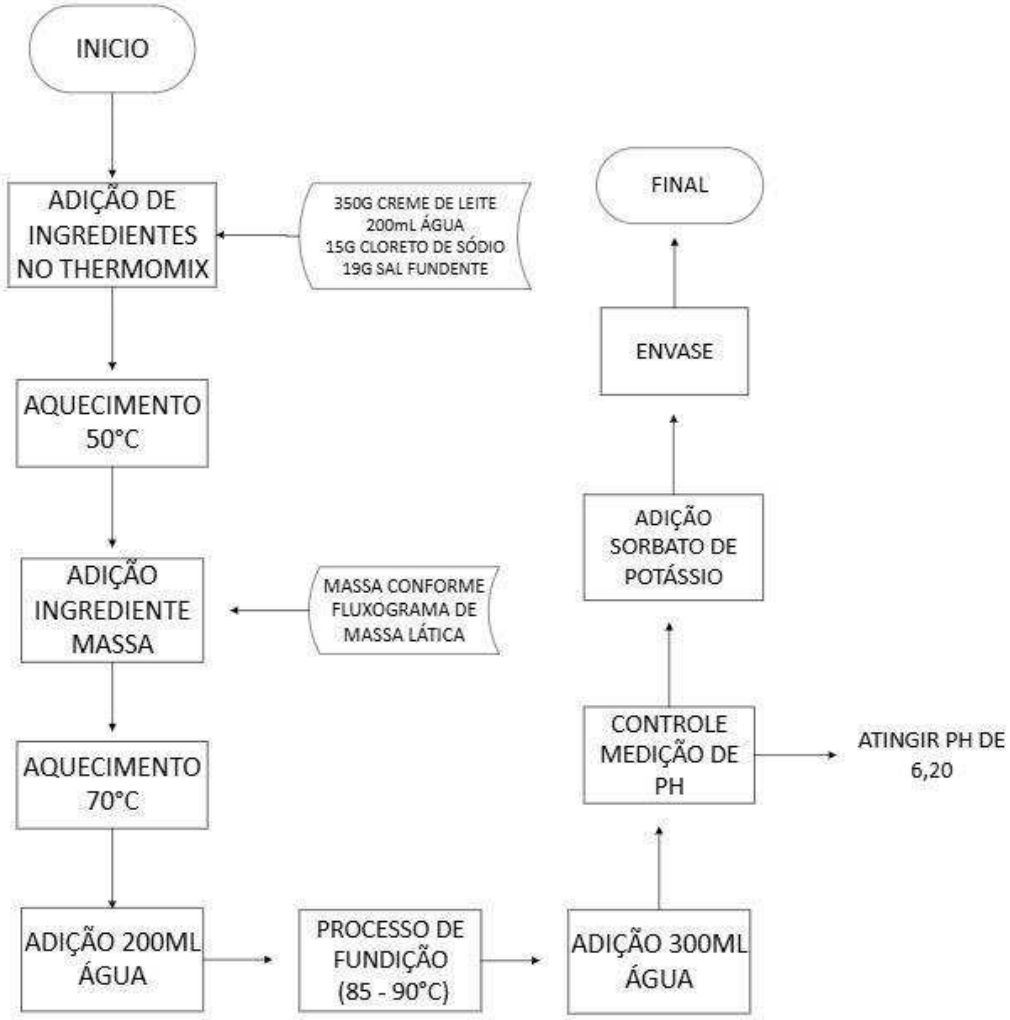
O aquecimento ocorreu de forma gradual até atingir 50 °C, operando na velocidade 2 do equipamento. Em seguida, adicionaram-se 650 g de massa láctea, e a mistura foi aquecida lentamente até 70 °C, momento em que foram incorporados mais 200 mL de água. Posteriormente, a temperatura foi elevada gradativamente até 90 °C, sendo mantida por 10 minutos sob constante agitação, operando na velocidade 4 do equipamento. Por fim, adicionou-se 300 mL de água, obtendo a consistência desejada para o requeijão cremoso.

Após a fusão da massa, procedeu-se à aferição do pH, realizando-se ajustes por meio da adição gradual de bicarbonato de sódio (1 g por vez), até atingir aproximadamente pH 6,20. Com os padrões de consistência e pH definidos, adicionou-se 0,30 g de sorbato de potássio como conservante, ao final do processo de fabricação.

O requeijão cremoso foi envasado a quente em recipientes plásticos com capacidade de 200 mL, previamente higienizados por imersão em solução de hipoclorito de sódio a 15 mg/L por 30 minutos e devidamente identificados.

Após o envase, os recipientes foram imediatamente resfriados em água gelada (5 a 7 °C) e, em seguida, armazenados em câmara fria a 5 - 7 °C. As amostras permaneceram sob refrigeração até a realização das análises físico-químicas, instrumentais, microbiológicas e avaliação sensorial. O processo de fabricação do requeijão está demostrado na Figura 6.

Figura 6 - Processo de fabricação do requeijão cremoso.



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

4.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE PARA FABRICAÇÃO DA MASSA DO REQUEIJÃO

As amostras de leite pasteurizado foram avaliadas quanto ao teor % de gordura (m/v), utilizando-se o método butirométrico (BRASIL, 2006), com o objetivo de padronizar o teor de gordura do leite antes do processamento. As amostras de leite pasteurizado, correspondentes aos diferentes tratamentos experimentais, foram avaliadas quanto a:

- Teor percentual (m/v) de proteína total: determinado a partir da quantificação do nitrogênio total (NT) pelo método de *Kjeldahl* (Costa Júnior, 2020). O fator de conversão do nitrogênio em proteína foi de 6,38.
- Teor percentual (m/v) de gordura: avaliado pelo método butirométrico (BRASIL, 2006), visando a padronização do teor de gordura do leite.
- Teor percentual de extrato seco total (EST): determinado pelo método gravimétrico em estufa a 102 ± 2 °C (BRASIL, 2006).

4.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DA MASSA DO REQUEIJÃO

A massa de requeijão foi avaliada após a fabricação, em cada repetição experimental, quanto aos seguintes parâmetros:

- Teor percentual (m/m) de umidade: determinado pelo método gravimétrico em estufa a 102 ± 2 °C (BRASIL, 2006);
- Teor percentual (m/m) de gordura: avaliado pelo método butirométrico (BRASIL, 2006);
- Teor percentual de gordura no extrato seco (GES): calculada como a razão entre o teor de gordura e o extrato seco (BRASIL, 2006);
- pH da massa: utilizando medidor de pH.
- Teor percentual (m/m) de nitrogênio total: quantificado pelo método de *Kjeldahl*, conforme descrito por Costa Júnior (2020), para cálculo do teor percentual de proteína, com base no teor de nitrogênio total, utilizando-se o fator de conversão 6,38.

4.6 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO SORO

As amostras de soro foram coletadas ao término da primeira mexedura, após aproximadamente 20 minutos, e submetidas às seguintes análises:

- Teor percentual (m/v) de proteína total: determinado a partir do teor de nitrogênio total (NT) pelo método de *Kjeldahl (*Costa Júnior, 2020), utilizando-se o fator de conversão de nitrogênio em proteína igual a 6,38;
- Teor percentual (m/v) de gordura: avaliado pelo método butirométrico (BRASIL, 2006).

4.7 RENDIMENTO DA MASSA DO REQUEIJÃO

O estudo do rendimento foi realizado por meio das amostras de soro, leite e massa coletadas e analisadas para o estudo do rendimento de fabricação, com registro da massa do leite e do queijo. O rendimento dos queijos foi calculado de acordo com a Equação 1.

$$Rendimento\ (kg\ queijo\ /\ 100\ kg\ de\ leite) = \frac{massa\ de\ queijo\ obtida}{massa\ de\ queijo\ utilizada}\ x\ 100 \qquad (1)$$

A recuperação de gordura (RG) e proteína (RP) do queijo foi calculada conforme descrito por Spadoti *et al.* (2003), de acordo com a Equação 2. A amostra apresentada nessa equação pode ser representada pelo teor de proteína e de gordura da massa.

$$RG\ ou\ RP = \frac{(massa\ da\ amostra\ x\ \%\ do\ componente\ da\ amostra)\ x\ 100}{(massa\ de\ leite\ \%\ componente\ leite\ )} \qquad (2)$$

4.8 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO REQUEIJÃO CREMOSO

Amostras de cada tratamento foram avaliadas em 1 dia de estocagem refrigerada, em cada repetição experimental, quanto aos seguintes parâmetros:

- Teores percentuais (m/m) de Umidade e Extrato Seco Total: método gravimétrico em estufa a 102 ºC ± 2 ºC (Costa Júnior 2020);
- Teor percentual de gordura: método butirométrico (BRASIL, 2006);
- Determinação do teor percentual de Gordura no Extrato Seco (GES) foi realizada por meio da fórmula: % GES = % gordura × 100/ % extrato seco (BRASIL, 2006);
- Nitrogênio total: método *Kjeldahl*, conforme descrito por Costa Júnior (2020) para se calcular teor percentual de proteína com base no teor de nitrogênio total. O fator utilizado para conversão do NT em proteína foi 6,38.
- pH da massa: utilizando medidor de pH.

4.9 ANÁLISE DO PERFIL DE TEXTURA DO REQUEIJÃO CREMOSO

A análise do perfil de textura do requeijão cremoso foi conduzida ao longo do período de armazenamento, em quatro tempos distintos: 1, 30, 45 e 60 dias de estocagem refrigerada. Os parâmetros avaliados incluíram dureza, adesividade, elasticidade, gomosidade e coesividade. A textura dos requeijões foi determinada por meio da análise do perfil de textura (TPA – Texture Profile Analysis), utilizando-se o texturômetro CT3, Textura Analyzer (Brookfield, Middleboro, EUA).

As amostras foram acondicionadas em béqueres plásticos com capacidade de 50 ml resistentes à penetração, e durante os ensaios, as amostras foram comprimidas por um cilindro de 25,4 mm de diâmetro e 35 mm de largura, a uma velocidade de 1 mm/s, com célula de carga de 4500 g, em dois ciclos com 20 % de compressão. As determinações foram realizadas em sextuplicata, permitindo a obtenção dos parâmetros de textura de forma instrumental, análise do perfil de textura (TPA - Texture Profile Analysis).

4.10 ANÁLISE DE COR INSTRUMENTAL

A análise de cor instrumental do requeijão cremoso foi conduzida ao longo do período de armazenamento, em quatro tempos distintos: 1, 30, 45 e 60 dias de estocagem refrigerada.

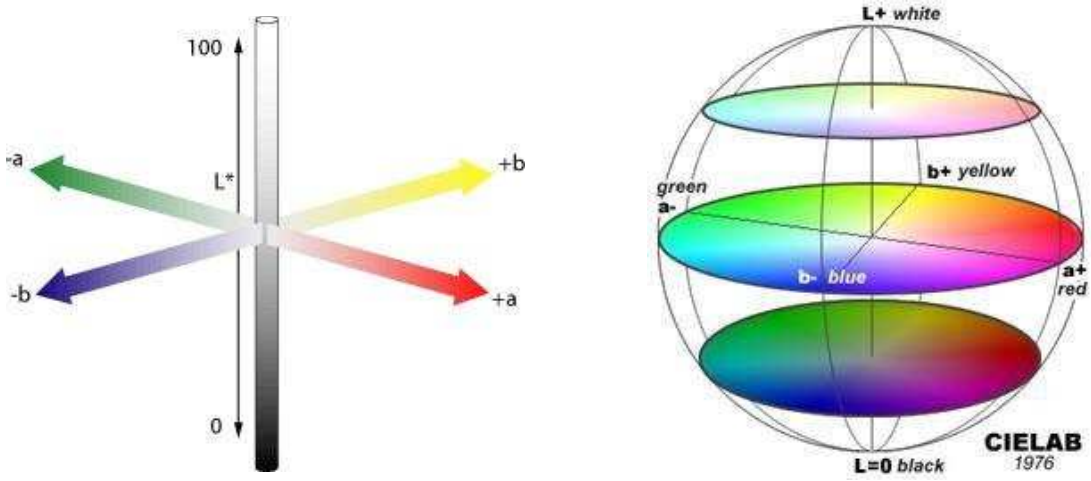
Para a avaliação da cor dos queijos, foi utilizado um colorímetro CM-5 (Konica Minolta, Sensing Americas, Inc., EUA) com abertura inferior, calibrado automaticamente pelo padrão branco (refletância 100%). As medições foram realizadas no sistema de cores CIELAB. A refletância foi avaliada em faixa de comprimento de onda de 360 a 740 nm, com área de medição LAV (diâmetro de 30 mm) e componente especular incluído (SCI – *Specular Component Included*). Para as medições foram utilizadas máscaras específicas para mini placa de Petri (CM-A158) e placa de Petri padrão (CM-A128).

As medições foram realizadas apoiando-se a abertura do aparelho na superfície das amostras, sendo o resultado demonstrado automaticamente no leitor do aparelho. O método utilizado para avaliar diferença na coloração foi o das variáveis L*, a* e b*, onde:

- “L” representa a variação da luminosidade de 0 a 100, em que 0=preto e 100=branco;
- “a*” variação do verde ao vermelho, onde valores negativos representam a cor verde e valores positivos, a cor vermelha;
- “b*” variação do amarelo ao azul, onde valores positivos representam a cor amarela e valores negativos representam a cor azul, refletidos ou transmitidos pelo objeto.

A cor pode ser representada no sistema de coordenadas retangulares (L*, a*, b*), conforme Figura 7.

Figura 7 - Sistema de cor – CIELAB (A) e Modelo de cor – CIELAB (B).



(A) (B)

Fonte: Sobral (2007).

4.11 ANÁLISE DA CAPACIDADE DE DERRETIMENTO

A análise da capacidade de derretimento do requeijão cremoso foi conduzida ao longo do período de armazenamento, em quatro tempos distintos: 1, 30, 45 e 60 dias de estocagem refrigerada, segundo o método descrito por Gigante (1998), adaptado às condições definidas por Sobral (2007).

A Figura 8 apresenta o equipamento utilizado para a realização desta análise, incluindo os tubos de vidro e o suporte de madeira com inclinação controlada de 45°, com capacidade para acomodar três tubos simultaneamente.

As amostras de 15,00 ± 0,20 g de requeijão cremoso, foram colocadas diretamente dentro do tubo de derretimento (de vidro, forma cilíndrica, com 250 mm

de comprimento e 30 mm de diâmetro, com duas linhas de referência gravadas no vidro, no sentido longitudinal e transversal). Em seguida, os tubos foram colocados na posição horizontal sobre um suporte de madeira numa estufa a 110 °C. Passados 8 minutos, o suporte foi retirado da estufa e inclinado a 45° para interromper o fluxo do requeijão e marcada a distância do fluxo a partir da linha de referência até a borda da amostra derretida. O suporte retornou para a posição horizontal e foi colocado por mais 2 minutos na estufa, atingindo o tempo total de 10 minutos, repetindo-se a marcação da distância percorrida pelo requeijão no tubo. Essa distância medida em milímetros no total dez minutos de aquecimento é denominada “fluxo de queijo” e usada como medida da capacidade de derretimento (Sobral, 2007).

Figura 8 - Tubos de vidro e suporte de madeira de inclinação controlada usados para teste de derretimento.



Fonte: Sobral (2007).

4.12 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

As amostras de requeijão foram analisadas após 20 dias de fabricação, conforme critérios microbiológicos estabelecidos na legislação (BRASIL, 1997) e incluíram:

- Contagem de coliformes totais: utilizando Petrifilm Coliform Count Plate (3M, NMUSA), conforme AOAC (1995);

- Contagem de coliformes termotolerantes: utilizando Petrifilm E. coli/Coliform Count Plate (3M, NMUSA), conforme AOAC (1995);
- Contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo/g: utilizando Petrifilm Staph Express Count Plate (3M, NMUSA), conforme AOAC (1995).

Os resultados obtidos foram comparados com os limites microbiológicos estabelecidos para requeijão pela Portaria 359/1997 (BRASIL, 1997). Estas análises visaram assegurar a qualidade do produto e a aptidão para posterior avaliação sensorial, realizada de acordo com o protocolo aprovado pelo comitê de ética.

4.13 ANÁLISE SENSORIAL

O projeto foi submetido à Plataforma Brasil para aprovação pelo comitê de ética CAAE: 85066424.4.0000.5103. Foram utilizados 100 provadores não treinados, e a aceitação do produto foi avaliada por meio de uma escala hedônica de nove pontos (Jones; Peryam; Thurstone, 1955), apresentada no Apêndice A, para os atributos sabor, aroma, aparência, textura e impressão global.

Para todas as análises sensoriais, as amostras, após 30 dias de fabricação, foram apresentadas em copos plásticos brancos de 50 mL, previamente identificados com códigos numéricos de três dígitos, garantindo a ocultação da identidade do produto. As amostras permaneceram armazenadas em geladeira a 9 ± 1 °C até o momento da avaliação. A análise foi conduzida de forma monádica e balanceada, seguindo a metodologia descrita por Macfie (1989), conforme citado por Torres (2015), de modo a assegurar a imparcialidade e reduzir possíveis efeitos de ordem na percepção dos avaliadores.

Durante os testes, água e biscoito de água e sal foram disponibilizados para que os provadores realizassem a limpeza do paladar entre a análise de cada amostra.

As respostas dos provadores foram convertidas em valores numéricos para posterior análise estatística dos resultados.

4.14 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas aos 60 dias de estocagem refrigerada, utilizando o equipamento TESCAN CLARA UHR-

SEM (TESCAN Ltd., Kohoutovice, República Tcheca), operando com feixe de elétrons a 20 keV. Inicialmente, foi realizada uma varredura geral de toda a superfície das amostras, seguida pela seleção de três regiões distintas por amostra para análise em maior detalhe. Em cada uma dessas regiões, foram adquiridas duas imagens sequenciais: a primeira com aumento de 5.000× e a segunda com aumento de 15.000×, sempre na mesma área de interesse, a fim de permitir a comparação morfológica em diferentes escalas. As imagens foram obtidas no modo ANALYSIS, utilizando o detector de elétrons secundários (E-T), com velocidade de varredura 6, que fornece tempo de exposição intermediário, adequado para boa resolução sem danificar a amostra. As condições operacionais incluíram campos de visão (FoV) de 55,8 µm (para 5.000×) e 18,6 µm (para 15.000×), com pixel sizes de 54,5 nm e 18,2 nm, respectivamente.

Na técnica de microscopia eletrônica de varredura (*Scanning Electron Microscopy – SEM*), um feixe estreito de elétrons é direcionado para a superfície da amostra, promovendo a emissão de elétrons refletidos e secundários a partir da camada de ouro utilizada no revestimento da amostra. Esses elétrons secundários, de baixa energia, são captados e transformados em imagem, a qual pode ser visualizada em um monitor e registrada por meio de um sistema de captura acoplado (Cabrelon; Boschi, 2005; Kamal, 2024).

4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O experimento foi conduzido em delineamento em blocos casualizados, no esquema de parcelas subdivididas. Para as análises realizadas ao longo do armazenamento, adotou-se o esquema de parcelas subdivididas no tempo, em que os tratamentos constituíram o fator principal e os tempos de avaliação, o subfator. Já para as análises realizadas em um único momento, como a análise sensorial, a composição centesimal e o rendimento, utilizou-se o delineamento em blocos casualizados.

Os dados obtidos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, considerando-se nível de significância de 5%, com o auxílio de software estatístico SISVAR (Ferreira, 2019).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE PASTEURIZADO UTILIZADO NA FABRICAÇÃO DA MASSA DO REQUEIJÃO

A Tabela 2 apresenta a composição físico-química do leite pasteurizado utilizado nas fabricações da massa em todos os tratamentos.

Tabela 2 - Composição físico-química do leite pasteurizado utilizado nos tratamentos (média ± DP)*.

Análise (% m/v)	**Tratamentos**			
	Controle	Fosfo	TG	TG + Fosfo
Proteína	3,01 ± 0,04[a]	2,97 ± 0,04[a]	2,99 ± 0,08[a]	2,99 ± 0,06[a]
Gordura	2,47 ± 0,11[a]	2,47 ± 0,05[a]	2,53 ± 0,03[a]	2,50 ± 0,09[a]
Extrato seco total (EST)	11,13 ± 0,53[a]	11,00 ± 0,42[a]	11,00 ± 0,56[a]	11,00 ± 0,82[a]

*Médias seguidas de letras diferentes na linha não são iguais pelo teste de Tukey (α = 5%).
Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Não foram observadas diferenças significativas (P > 0,05) entre os tratamentos nos teores de proteína, gordura e extrato seco total. Os valores médios obtidos e apresentados evidenciam a uniformidade da matéria-prima.

Conforme apontam Walstra *et al.* (2006), diversos fatores, como o estágio da lactação, a alimentação do animal, as variações sazonais e a procedência do rebanho, podem afetar a composição do leite, o que evidencia a necessidade de padronização para o controle experimental.

O teor de gordura exerce influência direta na textura, na cremosidade, no rendimento e na estabilidade do requeijão. A padronização permitiu que os efeitos observados nos tratamentos fossem atribuídos às variáveis estudadas, e não a diferenças na composição inicial do leite, aumentando a confiabilidade e reprodutibilidade do experimento.

5.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DA MASSA DO REQUEIJÃO

A Tabela 3 apresenta a composição físico-química da massa nos diferentes tratamentos.

Tabela 3 - Composição físico-química da massa do requeijão nos diferentes tratamentos (média ± DP)*.

Análise	Tratamentos			
	Controle	Fosfo	TG	TG +Fosfo
Umidade (%m/m)	50,10 ± 6,19^{a}	48,90 ± 5,30^{a}	50,10 ± 3,67^{a}	49,70 ± 1,35^{a}
Proteína (%m/m)	23,78 ± 1,09^{ab}	24,81 ± 2,06^{a}	20,43 ± 0,08^{c}	21,53 ± 0,90^{bc}
Gordura (% m/m)	21,50 ± 4,09^{a}	22,30 ± 3,79^{a}	20,70 ± 1,15^{a}	20,50 ± 3,97^{a}
pH	4,87 ± 0,10^{a}	4,84 ± 0,12^{a}	4,76 ± 0,18^{a}	4,78 ± 0,11^{a}

*Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem pelo teste de Tukey (α = 5%).
Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Não foram observadas diferenças estatísticas (P > 0,05) entre os tratamentos para o percentual de gordura, teor de umidade e pH da massa. Para o teor de proteína, entretanto, verificou-se diferença significativa (P < 0,05) entre os tratamentos.

A ausência de diferenças estatísticas entre os parâmetros apresentados na Tabela 3 indica que o leite utilizado em todos os tratamentos para a elaboração da massa foi devidamente padronizado quanto à sua composição e submetido às mesmas condições tecnológicas de processamento, exceto quanto ao teor proteico, que apresentou variação entre os tratamentos. Etapas como pasteurização, ajuste térmico, velocidade e o tempo de agitação foram padronizadas em todos os tratamentos, garantindo que qualquer variação observada fosse devida aos fatores estudados e não a diferenças na manipulação. A definição do ponto da massa foi rigorosamente controlada, monitorada pela padronização da temperatura e do tempo, assegurando que eventuais variações observadas nos resultados deste estudo não fossem decorrentes de inconsistências no processo de fabricação.

Em relação ao teor de proteína, observou-se que o tratamento com adição de fosfolipase apresentou melhor desempenho do que a TG, indicando maior eficiência dessa enzima na retenção proteica durante o processamento. Esse efeito pode ser explicado pela atuação sobre os fosfolipídios da membrana do glóbulo de gordura, aumentando a interação entre proteínas e lipídios e contribuindo para a estabilidade da matriz proteica (Lorenzen; Schlimme, 1998; De Maria *et al.*, 2007).

A elevação do teor de proteína observada no tratamento com adição de fosfolipase está em concordância com resultados previamente relatados. Rodrigues *et al.* (2016) demonstraram que a fosfolipase altera a interface lipídio-proteína dos

queijos, favorecendo maior retenção proteica e formação de uma matriz mais estável. Resultados semelhantes foram observados por Brito (2019), que verificou aumento significativo do teor de proteínas no queijo Minas Frescal tratado com fosfolipase, atribuído ao reforço das interações entre micelas de caseína e fosfolipídios modificados. De acordo com Lopez, Madec e Jimenez-Lopez (2010), essa enzima também promove a hidrólise parcial dos fosfolipídios, gerando componentes mais polares que estabilizam as proteínas na fase contínua e reduzem as perdas proteicas durante o processamento.

O tratamento com aplicação isolada de TG apresentou menor média entre os tratamentos avaliados. Isso indica que, nas condições experimentais adotadas, a ação da TG não foi suficiente para aumentar a retenção proteica, sugerindo que o grau de formação de ligações cruzadas entre proteínas não favoreceu a incorporação de uma maior fração proteica à matriz. A ação da TG depende diretamente da acessibilidade aos resíduos de lisina e glutamina presentes nas proteínas para a formação das ligações cruzadas, conforme descrito por Motoki e Seguro *(*1998) e Zhang *et al.* (2019). O resultado obtido pode estar relacionado ao fato que, a estrutura das proteínas pode não ter favorecido a exposição desses sítios reativos, limitando o grau de reticulação proteica promovido pela enzima.

Assim sendo, mesmo havendo formação de ligações cruzadas entre proteínas, conforme será demonstrado na microscopia eletrônica de varredura (MEV), essa estrutura não foi suficiente para estabilizar e reter uma maior fração proteica na massa comparado aos demais tratamentos.

5.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO SORO

A Tabela 4 apresenta a composição físico-química do soro dos diferentes tratamentos.

Não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) no teor de proteínas do soro entre os tratamentos avaliados. Por outro lado, quanto ao teor de gordura, verificaram-se diferenças significativas ($P < 0,05$).

Tabela 4 - Composição físico-química do soro dos diferentes tratamentos (média ± DP)*.

Análise	Tratamentos			
	Controle	Fosfo	TG	TG + Fosfo
Proteína	0,83 ± 0,03[a]	0,83 ± 0,00[a]	0,87 ± 0,09[a]	0,88 ± 0,06[a]
Gordura	0,37 ± 0,04[a]	0,27 ± 0,04[b]	0,33 ± 0,11[ab]	0,33 ± 0,03[ab]

*Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem pelo teste de Tukey (α = 5%).
Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Em relação ao teor de proteínas, ainda que a fosfolipase promova a hidrólise dos fosfolipídios e favoreça a formação de interações proteína-lipídio, sua ação não implica, necessariamente, em alterações significativas no teor de proteínas solúveis do soro. Isso pode ser explicado pelo fato de que a enzima atua predominantemente na fase lipídica, melhorando a distribuição e estabilização da gordura na matriz, mas não participa diretamente da formação de ligações entre cadeias proteicas, processo que é determinante para a retenção de proteínas no coágulo (Brito, 2019; Buatig *et al.*, 2025; Domingos *et al.*, 2021). Resultados semelhantes foram relatados por Brito (2019), que não verificou diferenças significativas no teor de proteína total do soro em queijos Minas Frescal e por Domingos (2022) na avaliação do soro de queijo Minas Padrão. De forma análoga, Lilbaek *et al.* (2006) observaram que a adição de fosfolipase na produção de queijo muçarela também não afetou significativamente o teor de proteína no soro.

No que se refere à ação da TG, a ausência de diferenças estatísticas quanto ao teor de proteínas do soro pode ser explicada pelo fato que, embora as proteínas como a β-lactoglobulina e a α-lactoalbumina possuam resíduos de lisina e glutamina que podem atuar como substratos para a TG, a disponibilidade desses grupos para reação enzimática depende do seu estado conformacional. Essas proteínas apresentam estrutura globular compacta, na qual parte dos resíduos reativos permanece pouco exposta ao meio, reduzindo a acessibilidade da enzima (Nieuwenhuizen *et al.*, 2004; Savoca *et al.*, 2018). A extensão da reação depende essencialmente do grau de exposição desses resíduos, o que é determinado pelas condições de processamento. Aboumahmoud e Savello (1990) evidenciaram que a enzima estabelece ligações entre α-lactoalbumina e β-lactoglobulina, originando polímeros de elevado peso molecular, sem causar alterações significativas no teor de

proteínas solúveis. De forma similar, Gauche, Barreto e Bordgnon-Luiz (2010) também observaram que a combinação do tratamento térmico com a TG favorece a polimerização e a formação de géis, fortalecendo a estrutura da rede proteica, sem provocar alterações significativas no teor de proteína do soro. Esses resultados corroboram com os resultados obtidos nesse estudo, em que não houve impacto da ação da TG sobre a fração proteica solúvel no soro.

No que se refere ao teor de gordura no soro, o tratamento com fosfolipase destacou-se por apresentar os menores percentuais, diferindo significativamente do controle. Na avaliação da massa, não foram constatadas diferenças significativas quanto ao teor de gordura, entretanto, a baixa perda de gordura no soro pode ser atribuída à estabilidade da matriz lipídio-proteica formada durante a coagulação. Quando os glóbulos de gordura estão bem distribuídos e suas membranas intactas, eles permanecem integrados à rede proteica, o que dificulta sua coalescência e a migração para o soro (Abd Al-Gawad *et al.,* 2012). Trancoso-Reyes *et al.* (2014) também identificaram diferença significativa no teor de gordura do soro no tratamento que combinou fosfolipase com cultura lática produtora de exopolissacarídeo, apresentando valores inferiores aos observados no tratamento controle. De forma similar, Brito (2019), ao trabalhar fosfolipase em queijo Minas Frescal encontrou resultados semelhantes.

5.4 RENDIMENTO DA MASSA DO REQUEIJÃO

A Tabela 5 apresenta o rendimento (kg/100 kg), a recuperação de proteína na massa (%) e recuperação de gordura na massa (%) nos diferentes tratamentos.

Tabela 5 - Rendimento (kg/100 kg), a recuperação de proteína na massa (%) e recuperação de gordura na massa (%) nos diferentes tratamentos (média ± DP)*.

Análise	**Tratamentos**			
	Controle	Fosfo	TG	TG + Fosfo
Rendimento (kg/100 kg)	9,48 ± 0,94^{b}	9,65 ± 0,66^{b}	11,46 ± 0,73^{a}	11,04 ± 0,57^{a}
Recuperação de proteína (%)	74,81 ± 1,38^{a}	76,10 ± 1,98^{a}	75,19 ± 2,56^{a}	75,31 ± 2,52^{a}
Recuperação de gordura (%)	85,46 ± 2,98^{b}	89,37 ± 2,43^{a}	89,05 ± 2,91^{a}	88,30 ± 2,97^{a}

*Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem pelo teste de Tukey (α = 5%).
Fonte: Elaborado pela autora (2025).

A análise estatística do rendimento (kg/100 kg de leite) revelou que os tratamentos com TG, isolada ou combinada com fosfolipase (TG + Fosfo), não apresentaram diferenças significativas entre si (P > 0,05), porém demonstraram desempenho superior em relação aos demais tratamentos (P < 0,05).

Possivelmente a combinação da TG e fosfolipase tenha promovido a formação de uma rede proteica mais coesa e estável, capaz de aprisionar de forma mais eficiente os glóbulos de gordura. Esse fortalecimento da interação proteína-gordura pode ter contribuído diretamente tanto para o aumento do rendimento (kg de produto por 100 kg de leite) quanto para a maior recuperação de gordura na massa, quando comparado ao tratamento controle, conforme demonstrado na Tabela 5.

A avaliação estatística da recuperação de proteínas do leite para a massa do requeijão indicou que não houve diferenças significativas entre os tratamentos (P > 0,05). Estudos como os de Motoki e Seguro (1998) indicam que a enzima TG atua predominantemente por meio da reticulação proteica, reforçando a rede estrutural sem, contudo, modificar os teores de proteína, já que não adiciona ou remove componentes da matriz, apenas reorganiza aqueles já presentes. Dessa forma, mesmo havendo formação de ligações cruzadas, que serão demonstradas na microscopia eletrônica de varredura (MEV), o grau de reticulação alcançado não foi suficiente para reter uma fração proteica maior na avaliação de rendimento ao que se refere à recuperação de proteínas, o que pode justificar a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos. Esses resultados são consistentes com a avaliação realizada por Piccolo (2006) em requeijão cremoso, que também não observou incremento da composição proteica após a aplicação da TG em comparação ao tratamento controle.

Em relação à recuperação de gordura, os resultados evidenciaram diferenças significativas entre os tratamentos (P<0,05). O Controle apresentou o menor percentual de recuperação lipídica em comparação aos demais tratamentos enzimáticos, indicando que tanto a fosfolipase quanto a TG, aplicadas isoladamente ou em combinação, promoveram maior retenção de gordura na massa do requeijão. Esse efeito indica que a atuação enzimática pode influenciar a organização estrutural do coágulo de maneira mais expressiva sobre a fase lipídica do que sobre a fração proteica total (Eren; Akin, 2017; Warsono *et al.*, 2021).

Esses resultados estão em concordância com estudos prévios que demonstraram o efeito positivo das enzimas. Lilbæk *et al.* (2006) observaram que o

tratamento com fosfolipase A1 reduziu significativamente as perdas de gordura no soro e aumentou o rendimento do queijo, resultado atribuído à maior retenção de gordura e umidade na coalhada. De forma semelhante, Brito (2019), ao estudar a utilização de fosfolipase na fabricação de queijo Minas Frescal, constatou que a adição da enzima elevou significativamente o rendimento ajustado do queijo em 3,38% ($P < 0,05$) em comparação ao controle, além de reduzir a perda de gordura no soro, evidenciando maior retenção de lipídios na massa. Referente à TG, Piccolo (2006) avaliou seu efeito na produção de requeijão cremoso, cuja massa foi obtida por acidificação direta, e verificou que a adição da enzima, em comparação ao processo tradicional, resultou em maior rendimento, no entanto, esse aumento não foi acompanhado por elevação significativa do teor de gordura. Essa divergência foi atribuída à maior umidade do requeijão tratado com TG.

.

5.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO REQUEIJÃO CREMOSO

A Tabela 6 apresenta a composição físico-química do requeijão nos diferentes tratamentos.

Tabela 6 - Composição físico-química do Requeijão cremoso dos diferentes tratamentos (média ± DP)*.

Análise	**Tratamentos**			
	Controle	Fosfo	TG	TG + Fosfo
Proteína (%m/m)	9,79 ± 0,94[a]	9,30 ± 0,75[a]	7,70 ± 1,20[a]	8,66 ± 0,33[a]
Gordura (%m/m)	21,83 ± 1,44[a]	23,30 ± 3,50[a]	23,60 ± 1,66[a]	24,53 ± 5,24[a]
Umidade (%m/m)	62,51 ± 1,34[a]	62,50 ± 1,55[a]	64,03 ± 0,30[a]	63,02 ± 1,76[a]
GES (%m/m)	58,26 ± 3,74[a]	61,83 ± 7,18[a]	65,58 ± 5,13[a]	65,93 ± 11,20[a]
pH	6,07 ± 0,29[a]	6,23 ± 0,23[a]	6,16 ± 0,16[a]	6,20 ± 0,15[a]

*Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem pelo teste de Tukey (α = 5%).
Fonte: Elaborado pela autora (2025).

A avaliação dos parâmetros físico-químicos do requeijão cremoso demonstrou que não houve diferenças estatísticas ($P > 0,05$) entre os tratamentos enzimáticos e o controle em relação aos teores de proteína, gordura, umidade, GES e pH. Esse comportamento é coerente com os resultados da literatura, que mostram que tais enzimas atuam predominantemente na microestrutura da matriz láctea, influenciando

propriedades funcionais, como a retenção de água e de gordura, sem necessariamente alterar de forma substancial a composição global determinada por métodos proximais convencionais (Razeghi et al., 2020; Ceren Akal, 2023; Salunke; Metzger, 2024).

Quanto à diferença observada entre a composição da massa (Tabela 3) e a ausência de diferença no produto final, esse resultado também é tecnicamente esperado. A massa inicial do requeijão está mais diretamente sujeita aos efeitos das enzimas, podendo apresentar maior retenção de gordura, menor sinérese ou estrutura proteica mais coesa (Monsalve-Atencio *et al.*, 2022). Uma vez que a etapa de fabricação do requeijão cremoso envolve processos térmicos e mecânicos, pode ocorrer a uniformização do produto e a redução das variações previamente estabelecidas na massa (Razegh; Yazdanpanah, 2020; Monsalve-Atencio *et al.*, 2022).

Ressalta-se que todos os tratamentos mantiveram o requeijão cremoso dentro dos parâmetros legais estabelecidos pela legislação brasileira (Portaria 359/1997 – MAPA), que define matéria gorda no extrato seco mínima de 55,0 g/100 g e umidade máxima de 65,0 g/100 g para essa categoria de produto.

Com relação ao pH, não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os tratamentos. A estabilidade do pH observada neste estudo sugere que a aplicação enzimática não alterou significativamente o equilíbrio ácido-base da matriz do requeijão. Resultados semelhantes foram relatados por Rapacci (1997) e Piccolo (2006). A preservação da estabilidade do pH é tecnologicamente relevante, pois esse parâmetro afeta diretamente a fusão, a textura e a consistência, impactando tanto o rendimento quanto as características sensoriais do produto (Gomes, 2009; Fox *et al.*, 2015).

Portanto, nas condições avaliadas, a utilização das enzimas não comprometeu a composição do produto final, indicando que tais tratamentos podem ser incorporados ao processo sem modificar de forma substancial a matriz físico-química estabelecida.

5.6 ANÁLISE DO PERFIL DE TEXTURA

Os parâmetros analisados compreenderam elasticidade, adesividade, dureza, coesividade e gomosidade.

5.6.1 Elasticidade

Nos queijos, a elasticidade está diretamente relacionada à matriz proteica, a qual constitui a base estrutural do produto e é responsável pela sua flexibilidade e capacidade de recuperar a forma após a aplicação de uma força (Fox *et al.*, 2000).

A análise da elasticidade do requeijão cremoso indicou que não houve diferença significativa entre os tratamentos (P > 0,05) com valor médio de 5,03 ± 0,15 mm. Considerando que não foram observadas diferenças no teor de proteínas entre os requeijões avaliados, conforme demonstrado na Tabela 6, torna-se coerente que os valores de elasticidade também não tenham apresentado variação significativa.

Foi observada diferença significativa no tempo e entre os fatores tratamento × tempo (P < 0,05), indicando que os efeitos dos tratamentos dependeram do período avaliado.

A Tabela 7 apresenta a elasticidade do requeijão cremoso ao longo do tempo.

Tabela 7 - Elasticidade (mm) do requeijão cremoso submetido aos diferentes tratamentos ao longo do tempo (média ± DP)*.

	Tempos (dias)			
	1 dia	30 dias	45 dias	60 dias
Controle	5,10 ± 0,14^{aA}	5,07 ± 0,22 ^{aA}	5,05 ± 0,11 ^{aB}	4,90 ± 0,08 ^{aC}
Fosfo	5,24 ± 0,13 ^{aA}	5,13 ± 0,22^{aA}	4,99 ± 0,11^{aB}	4,97 ± 0,12^{aC}
TG	5,19 ± 0,21^{aA}	4,77 ± 0,21^{bB}	4,86 ± 0,11^{cB}	4,99 ± 0,12^{cC}
TG + Fosfo	5,16 ± 0,12^{aA}	5,07 ± 0,12^{aA}	5,07 ± 0,12^{aB}	4,95 ± 0,12^{aC}

*Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes, na mesma linha, diferem significativamente entre os tempos avaliados (P < 0,05), pelo teste Tukey. Médias seguidas por letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, diferem significativamente entre os tratamentos (P < 0,05), pelo teste Tukey.
Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Observou-se que a elasticidade do requeijão cremoso diminuiu ao longo do tempo de armazenamento, tanto no tratamento controle quanto nos tratamentos com adição enzimática. Esse comportamento pode ser explicado pelo fato de que, durante o armazenamento, as proteínas tendem a aproximar-se e formar maior número de interações intermoleculares, como ligações de hidrogênio e interações iônicas, resultando em uma rede mais compacta e rígida. Esse aumento da densidade estrutural reduz a capacidade de deformação e recuperação elástica da matriz,

justificando a diminuição observada nos valores de elasticidade (Piccolo, 2006; Liu *et al.*, 2024).

5.6.2 Adesividade

A adesividade é um parâmetro de textura que expressa a energia necessária para vencer as forças de atração entre a superfície de um alimento e outra superfície em contato (Fox *et al.*, 2017). Não houve diferença significativa (P > 0,05) entre os tratamentos avaliados, indicando que a aplicação isolada ou combinada das enzimas fosfolipase e TG não provocou alterações expressivas na adesividade do requeijão em comparação ao controle. O valor médio foi de 0,65 ± 0,33 mJ.

Também não foi observada diferença significativa (P > 0,05) no tempo e na interação tratamento × tempo, com valor médio de 0,65 ± 0,13 mJ, o que evidencia que ambos os fatores atuaram de forma independente.

A ausência de diferenças significativas na adesividade, tanto entre os tratamentos quanto ao longo do período de armazenamento, pode estar relacionada às características físico-químicas do produto. Embora tenham sido observadas alterações físico-químicas associadas ao ajuste natural da matriz durante o armazenamento e à ação das enzimas fosfolipase e TG sobre a estrutura interna do produto, tais modificações não interferiram na interface produto-superfície, responsável pela adesividade (Paula, 2019; Seyed-Moslemi *et al.*, 2021).

5.6.3 Dureza

No presente estudo, o valor médio de dureza foi de 16,42 ± 7,39 N e a ausência de diferenças significativas (P > 0,05) entre os tratamentos pode ser explicada pela similaridade estatística da composição físico-química (Tabela 6), uma vez que os teores de umidade e a composição centesimal se mantiveram semelhantes em todos os requeijões. Como destacado por Rapacci (1997), a firmeza de produtos lácteos tende a diminuir à medida que o teor de umidade aumenta, devido à maior plasticidade conferida pela fase aquosa. Da mesma forma, a proporção de gordura no extrato seco e o equilíbrio entre proteína, lipídios e água influenciam a formação e a estabilidade da rede proteica, afetando a resistência mecânica do gel. Assim, a manutenção das características composicionais provavelmente contribuiu para a preservação da

dureza do requeijão cremoso, independentemente da aplicação enzimática. Esses resultados, bem como a ausência de variação estatística, estão em concordância com os achados de Gallina (2005).

O pH exerce papel central na determinação da dureza por afetar diretamente a organização e a compactação da rede de proteínas. Em valores de pH mais elevados (acima de 5,8), as proteínas apresentam maior repulsão eletrostática, o que resulta em uma matriz proteica mais expandida e com maior retenção de água. Essa condição promove menor dureza, devido ao aumento da hidratação e à redução das interações proteína-proteína (Walstra *et al.*, 2006; Fox *et al.*, 2017). Lee e Klostermeyer (2004), ao investigarem o impacto do pH nas propriedades mecânicas de queijos fundidos, observaram que o aumento do pH confere ao queijo uma textura mais fluida.

Verificou-se diferença significativa da dureza no tempo e na interação tratamento × tempo ($P < 0,05$), indicando que os efeitos dos tratamentos dependeram do período avaliado, atuando de forma interdependente.

A Tabela 8 apresenta as médias e os desvios-padrão da dureza do requeijão cremoso submetido aos diferentes tratamentos ao longo do tempo.

Tabela 8 - Dureza (N) do requeijão cremoso submetido aos diferentes tratamentos avaliados ao longo do tempo*.

	Tempo (dias)			
	1	30	45	60
Controle	$21,19 \pm 5,61^{aA}$	$14,09 \pm 4,13^{aB}$	$15,73 \pm 6,14^{aB}$	$20,87 \pm 9,60^{Aa}$
Fosfo	$22,62 \pm 6,22^{aA}$	$16,82 \pm 4,13^{aB}$	$10,18 \pm 6,14^{bB}$	$9,42 \pm 9,60^{bB}$
TG	$19,20 \pm 6,14^{aA}$	$10,28 \pm 6,14^{bB}$	$12,79 \pm 6,14^{aB}$	$20,77 \pm 9,60^{aA}$
TG + Fosfo	$23,02 \pm 7,72^{aA}$	$16,96 \pm 4,13^{aB}$	$12,56 \pm 6,14^{bB}$	$15,73 \pm 9,60^{abB}$

*Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes, na mesma linha, diferem significativamente entre os tempos avaliados ($P < 0,05$), pelo teste Tukey. Médias seguidas por letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, diferem significativamente entre os tratamentos ($P < 0,05$), pelo teste Tukey.
Fonte: Elaborado pela autora (2025).

De maneira geral, as amostras apresentaram valores mais elevados de dureza no primeiro dia, seguidos por uma redução acentuada aos 30 e 45 dias e, posteriormente, uma tendência de aumento aos 60 dias, demonstrando um comportamento não linear. A diminuição inicial da dureza pode ser atribuída ao relaxamento da rede proteica e ao aumento da mobilidade da fase aquosa, resultando em uma textura mais macia e menos resistente à deformação. Esse comportamento

é frequentemente observado em produtos com elevado teor de umidade, como o requeijão cremoso, devido à reorganização das interações proteína-proteína e proteína-gordura (Tunick; Van Hekken, 2015).

O aumento da dureza observado ao final do período de 60 dias pode estar relacionado à compactação da matriz proteica, que aumenta a resistência à compressão e confere maior firmeza ao produto. Esse fenômeno é geralmente associado à redistribuição da água e à formação de regiões com maior densidade proteica durante o armazenamento (Van Dender, 2014).

5.6.4 Coesividade

A análise de coesividade do requeijão cremoso indicou que não houve diferenças significativas entre os tratamentos ($P > 0,05$) com valor médio de 0,73 ± 0,02. O pH influencia as propriedades texturais do produto, especialmente quanto à coesividade. Em valores de pH mais elevados (acima de 5,8), as caseínas apresentam maior carga negativa, o que intensifica a repulsão eletrostática entre as proteínas e aumenta o grau de hidratação da matriz. Como resultado, a estrutura torna-se menos compacta e mais macia, com redução da coesividade (Walstra *et al.*, 2006; Lucey, 2004).

Além do pH, a composição físico-química contribui de forma relevante para esse parâmetro. Teores mais elevados de gordura reduzem a intensidade das interações proteicas, atenuando a força de coesão da matriz, enquanto maiores teores de umidade tendem a enfraquecer ainda mais essas interações, diminuindo a coesividade (Gunasekaran; Ak, 2003). Assim, a ausência de diferenças estatísticas entre os tratamentos, pode ser atribuída à físico-química similar dos requeijões analisados.

Também não foram observadas diferenças significativas na interação Tratamento × Tempo ($P > 0,05$) para coesividade, indicando que ambos atuaram de forma independente. Por outro lado, o fator tempo apresentou efeito significativo ($P < 0,05$). A Tabela 9 apresenta a coesividade do requeijão cremoso avaliada ao longo do tempo.

Tabela 9 - Coesividade do requeijão cremoso avaliada ao longo do tempo (média ± DP)*.

Análise	Tratamentos			
	1 dia	30 dias	45 dias	60 dias
Coesividade	0,75 ± 0,02^{a}	0,75 ± 0,01^{a}	0,73 ± 0,02^{ab}	0,71 ± 0,03^{b}

*Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem pelo teste de Tukey (α = 5%).
Fonte: Elaborado pela autora (2025).

A análise da coesividade do requeijão cremoso indicou diferença significativa (P < 0,05) ao longo do tempo de armazenamento. A redução da coesividade pode estar associada a alterações físico-químicas que afetam a integridade da matriz proteica. Durante o período de estocagem, podem ocorrer rearranjos estruturais na rede proteica, enfraquecendo ligações internas responsáveis pela resistência à ruptura (Guinee *et al.*, 2004). A redistribuição ou liberação de umidade também contribui para esse comportamento, uma vez que maiores teores de água livre reduzem a intensidade das interações proteicas e diminuem a coesão da matriz (Gunasekaran; Ak, 2003). Dessa forma, a interação entre esses fatores físico-químicos pode explicar a redução da coesividade observada durante o armazenamento do requeijão cremoso.

5.6.5 Gomosidade

Em relação à gomosidade do requeijão cremoso não houve diferenças significativas entre os tratamentos (P > 0,05) apresentando valor médio de 0,09 ± 0,04 g. Foram observadas diferenças significativas (P < 0,05) no tempo e na interação tratamento × tempo (P < 0,05), que estão apresentadas na Tabela 10.

A evolução da gomosidade do requeijão cremoso ao longo do armazenamento evidenciou que tanto o tipo de enzima quanto o tempo influenciaram a estrutura da matriz. Todos os tratamentos apresentaram valores mais elevados de gomosidade no tempo inicial (1 dia), entretanto, os demais tempos de avaliação (30, 45 e 60 dias) não diferenciaram estatisticamente entre si.

Modificações estruturais típicas do armazenamento, como rearranjos na rede proteica, redistribuição da água e alterações na interação proteína-gordura, podem reduzir a dureza e a coesividade ao longo do tempo, resultando em menores valores de gomosidade (Lilbaek *et al.*, 2006).

Tabela 10 - Gomosidade (g) do requeijão cremoso submetido aos diferentes tratamentos ao longo do tempo (média ± DP)*.

Análise	Tempos (dias)			
	1 dia	30 dias	45 dias	60 dias
Controle	0,10 ± 0,02^{aA}	0,07 ± 0,02^{aB}	0,07 ± 0,02^{aB}	0,08 ± 0,03^{aB}
Fosfo	0,13 ± 0,03^{aA}	0,09 ± 0,02^{aB}	0,05 ± 0,02^{bB}	0,05 ± 0,02^{bB}
TG	0,10 ± 0,02^{aA}	0,05 ± 0,02^{bB}	0,07 ± 0,02^{aB}	0,09 ± 0,02^{aB}
TG + Fosfo	0,14 ± 0,04^{aA}	0,10 ± 0,03^{aB}	0,07 ± 0,02^{aB}	0,08 ± 0,03^{aB}

*Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes, na mesma linha, diferem significativamente entre os tempos avaliados (P < 0,05), pelo teste Tukey. Médias seguidas por letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, diferem significativamente entre os tratamentos (P < 0,05), pelo teste Tukey.
Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Avaliando os tratamentos em cada um dos tempos de armazenamento, para o tempo inicial (1 dia), não houveram diferenças significativas entre os tratamentos.

Em 30 dias de armazenamento, o tratamento com TG apresentou valor inferior aos demais, com diferença significativa. Os tratamentos controle, fosfo e TG + fosfo mantiveram valores mais elevados e estatisticamente semelhantes entre si, indicando melhor retenção da estrutura nesse período intermediário. Aos 45 e 60 dias, os tratamentos controle, TG e TG + fosfo apresentaram valores iguais, diferenciando apenas do tratamento com fosfoslipase, sugerindo que a ação isolada da fosfolipase resultou em maior perda de coesão estrutural ao longo do armazenamento (Rodriguez-Nogales, 2005; Shahidi; Zhong, 2010).

5.7 ANÁLISE DE COR INSTRUMENTAL

5.7.1 Luminosidade (L*)

Não foram observadas diferenças significativas (P > 0,05) entre os tratamentos, com valor médio de 89,40 ± 1,74, indicando que a aplicação das enzimas fosfolipase e TG, isoladas ou combinadas, não alterou de forma relevante a luminosidade (L*) dos requeijões. Esse resultado sugere que as modificações estruturais promovidas pelas enzimas na massa do requeijão não alteraram a forma como a luz é refletida ou absorvida pelo requeijão cremoso, mantendo-se entre as formulações.

Os valores médios de L* encontrados indicam elevada luminosidade, o que corresponde a uma tonalidade clara, tendendo ao branco. Essa característica é típica

e desejável em requeijões cremosos, pois está associada à aparência do produto e contribui positivamente para sua aceitação sensorial.

Valores elevados de L* refletem maior intensidade de luz, resultando em coloração mais branca e brilhante. Silva (2012) reportou valores de L* entre 78 e 82 em requeijão cremoso light, os quais são considerados elevados e normalmente associados a uma alta luminosidade, conferindo ao produto coloração branca e boa aceitabilidade. De forma semelhante, Lima (2019) registrou valores de L* igualmente altos (≈78-81) em diferentes formulações, reforçando que níveis elevados de L* estão diretamente relacionados à luminosidade característica e desejável do requeijão cremoso.

Não foram observadas diferenças na interação tratamento x tempo (P > 0,05), o que indica que ambos atuaram de forma independente sobre a variável analisada. No entanto, a luminosidade (L*) apresentou diferenças significativas (P < 0,05) ao longo do período de armazenamento. A luminosidade dos requeijões foi monitorada ao longo da vida de prateleira, conforme demonstrado na Tabela 11.

Tabela 11 - Luminosidade (L*) dos requeijões cremosos em função do tempo (média ± DP)*.

Análise	Tratamentos			
	1 dia	30 dias	45 dias	60 dias
Luminosidade (L*)	88,625 ± 2,22^{b}	89,184 ± 1,63^{b}	90,288 ± 1,18^{a}	89,515 ± 2,01^{ab}

*Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem pelo teste de Tukey (α = 5%).
Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Embora houve diferença ao longo do tempo, os valores mantiveram-se elevados, indicando a preservação da coloração clara típica do requeijão cremoso durante o período avaliado. A estabilidade dessa tonalidade ao longo do processamento e do armazenamento é um indicador de qualidade, visto que reduções de L* podem sinalizar escurecimento ou alterações estruturais, como apontado por Prestes *et al.* (2025). Estudos de armazenamento, como o de Pereira *et al.* (2008), mostram que o requeijão tende a manter L* alto durante a vida de prateleira, o que indica preservação da brancura e da integridade da matriz proteica.

Essa variação temporal observada pode estar associada a mudanças físico-químicas naturais que ocorrem durante a vida de prateleira, como oxidação de componentes lipídicos, especialmente os ácidos graxos insaturados presentes nos

triacilgliceróis e fosfolipídios, rearranjos na estrutura da emulsão e alterações na dispersão de partículas de gordura e proteínas. Pequenas variações no pH e na atividade de água também podem influenciar a forma como a luz é refletida, contribuindo para as diferenças observadas (Lee; Lucey, 2010; Cunha; Menezes; Domingues, 2020).

5.7.2 Coordenada cromática a*

Não foram observadas diferenças significativas (P > 0,05) entre os tratamentos, para a coordenada cromática (a*), com valor médio de 0,40 ± 0,21. Em requeijões, essa coordenada geralmente apresenta valores próximos de zero, indicando tonalidades pouco avermelhadas, típicas de emulsões lácteas (Cunha; Menezes; Domingues, 2020).

Os valores médios da coordenada cromática a* mantiveram-se dentro dos intervalos descritos na literatura para o requeijão cremoso em todos os tratamentos. Esses resultados indicam a predominância de tonalidades próximas ao neutro, com mínima tendência para o eixo vermelho, o que é característico de produtos lácteos com coloração branca ou ligeiramente amarelada. Resultados semelhantes foram reportados por Gallina (2005) e Cunha, Dias e Viotto (2010).

A interação tratamento × tempo não foi significativa (P > 0,05) para a coordenada cromática a*, não denotando influência da combinação entre os tratamentos e tempo. A coordenada cromática a* apresentou diferença estatística ao longo do período de armazenamento (P < 0,05). A Tabela 12 apresenta as médias e os desvios-padrão (± DP) de a* em função do tempo de estocagem.

Tabela 12 - Coordenada cromática (a*) dos requeijões cremosos em função do tempo (média ± DP)*.

Análise	Tratamentos			
	1 dia	30 dias	45 dias	60 dias
Coordenada cromática a*	0,41 ± 0,16^{ab}	0,40 ± 0,20^{ab}	0,50 ± 0,23^{a}	0,28 ± 0,23^{b}

*Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem pelo teste de Tukey (α = 5%).
Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Essa variação ao longo do tempo, pode estar associada às alterações de pH, uma vez que esse parâmetro interfere na forma como a luz é refletida pela matriz do produto, contribuindo para as diferenças observadas. O pH influencia diretamente a organização estrutural da matriz proteica do requeijão. Conforme apontado por Fox e McSweeney (2017), o afastamento do ponto isoelétrico das proteínas lácteas promove maior dispersão proteica, reduzindo o tamanho dos agregados e alterando a distribuição dos glóbulos de gordura. Essas mudanças estruturais modificam a interação da luz com a matriz, afetando a reflectância e, consequentemente, os parâmetros colorimétricos observados (Walstra *et al.*, 2006).

5.7.3 Coordenada cromática b*

Em relação a coordenada cromática b* indicam que não foram observadas diferenças significativas (P > 0,05) entre os tratamentos, com valor médio de 20,56 ± 3,0, assim como para a interação tratamento x tempo (P > 0,05), evidenciando que a adição das enzimas TG e fosfolipase, isoladas ou combinadas, não afetou significativamente a tonalidade amarelada do requeijão cremoso. Os dados sugerem estabilidade cromática em relação à cor amarela, característica relevante para a padronização industrial e para a aceitação sensorial do produto. Ainda, para este parâmetro, foram observadas diferenças significativas (P < 0,05) em relação ao tempo.

A Tabela 13 apresenta os resultados da coordenada cromática b* do requeijão cremoso em função do tempo de armazenamento.

Tabela 13 - Coordenada cromática b* dos requeijões cremosos em função do tempo (média ± DP)*.

Análise	Tratamentos			
	1 dia	30 dias	45 dias	60 dias
coordenada cromática b*	21,96 ± 3,423^{a}	20,61 ± 3,230^{b}	19,70 ± 3,156^{c}	19,99± 3,580^{bc}

*Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem pelo teste de Tukey (α = 5%).
Fonte: Elaborado pela autora (2025).

As alterações ao longo do tempo podem estar relacionadas a mudanças físico-químicas naturais do produto, como oxidação de pigmentos residuais, variações no

estado coloidal da fase lipídica ou reorganizações da matriz proteica, que influenciam a forma como a luz é refletida e dispersa no sistema (Cunha; Menezes; Domingues, 2020). Pequenas flutuações no pH e no teor de umidade durante o armazenamento também podem influenciar a dispersão dos pigmentos e dos glóbulos de gordura, resultando em variações na intensidade do tom amarelado. Esse padrão é frequentemente observado e tem sido descrito em estudos sobre a estabilidade de cor e a microestrutura de requeijões e queijos fundidos (Fox *et al.*, 2017; Lee; Lucey, 2010).

5.8 CAPACIDADE DE DERRETIMENTO DO REQUEIJÃO CREMOSO

A Tabela 14 apresenta a capacidades de derretimento do requeijão em função dos diferentes tratamentos enzimáticos aplicados.

Tabela 14 - Capacidade de derretimento (mm) do requeijão em função dos diferentes tratamentos aplicados (média ± DP)*.

Análise	**Tratamentos**			
	Controle	Fosfo	TG	TG + Fosfo
Derretimento (mm)	12,78 ± 4,72[a]	14,00 ± 4,49[a]	16,11 ± 1,28[a]	16,58 ± 3,20[a]

*Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem pelo teste de Tukey (α = 5%).
Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Não foram observadas diferenças significativas (P > 0,05) entre os tratamentos em relação a capacidade de derretimento do requeijão cremoso. Esse resultado indica que, sob as condições de formulação e processamento adotadas, as modificações estruturais promovidas pelas enzimas não foram suficientemente intensas para influenciar no derretimento, preservando o comportamento típico do produto (Paula, 2019; Gomes; Penna, 2010). A capacidade de derretimento em requeijões está intimamente associada à estrutura e coesão da rede proteica, à eficiência da emulsificação da gordura, à distribuição dos glóbulos lipídicos na matriz, à presença e tipo de sais fundentes (emulsificantes) e à razão entre proteína e gordura do sistema (Koca; Metin, 2004; Cunha; Alcântara; Viotto, 2012; Landin *et al.*, 2021).

Modificações marcantes na capacidade de derretimento do requeijão cremoso são geralmente observadas quando há alterações substanciais na composição da matriz láctea. Pesquisas sobre requeijões demonstram que variáveis tecnológicas,

como tempo e temperatura de fusão, tipo e teor de sais emulsificantes, condições de homogeneização e pH, influenciam diretamente o comportamento de derretimento (Paula, 2019; Vieira, 2024).

Dentro desse contexto, alterações microestruturais discretas promovidas por enzimas, como TG ou fosfolipase, quando não afetam de maneira significativa a organização da matriz láctea, tendem a manter a fusão do produto inalterada, preservando o padrão de derretimento esperado para requeijões cremosos (Lilbaek *et al.*, 2006).

Ademais, a ausência de diferença significativa para a interação tratamento e tempo reforça que ambos atuaram de forma independente, demonstrando que as variações nos tratamentos enzimáticos não influenciaram o derretimento do produto.

Os valores obtidos para a capacidade de derretimento ao longo do tempo não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$) e apontaram média geral de 15,62 ± 4,40 mm. Isso indica que, independentemente do período de estocagem, a capacidade de derretimento do requeijão permaneceu estável, demonstrando que suas propriedades funcionais foram preservadas durante o armazenamento.

5.9 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Os resultados obtidos nas análises microbiológicas estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Resultados obtidos na avaliação microbiológica do requeijão cremoso.

Microrganismo	Critério de aceitação	Tratamentos			
		CONT.	TG.	FOSFO.	TG. + FOSFO.
Coliformes/g (30°C)	n=5 c=2 m=10 M=100	*<10^2 UFC/g (est.)*	*<10^2 UFC/g (est.)*	*<10^2 UFC/g (est.)*	*<10^2 UFC/g (est.)*
Coliformes/g (45°)	n=5 c=2 m < 3 M=10	*<10^2 UFC/g (est.)*	*<10^2 UFC/g (est.)*	*<10^2 UFC/g (est.)*	*<10^2 UFC/g (est.)*
Staphylococcus coagulase positivo/g	n=5 c=2 m=100 M=1000	*<10^2 UFC/g (est.)*	*<10^2 UFC/g (est.)*	*<10^2UFC/g (est.)*	*<10^2UFC/g (est.)*

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Os resultados das análises microbiológicas estiveram dentro dos critérios de aceitação estabelecidos pela Portaria 359/1997 (BRASIL, 1997), demonstrando que o produto atendeu aos padrões de segurança alimentar.

5.10 ANÁLISE SENSORIAL

O teste de aceitação foi conduzido com 100 provadores, após a confirmação da inocuidade dos requeijões por meio das análises microbiológicas. Os resultados da análise de aceitação sensorial estão apresentados na Tabela 16.

A análise sensorial do requeijão cremoso revelou diferenças ($P < 0,05$) importantes entre os tratamentos para todos os atributos avaliados.

Tabela 16 - Teste de aceitação sensorial do requeijão cremoso nos diferentes tratamentos (médias ± DP)*.

Análise	**Tratamentos**			
	Controle	Fosfo	TG	TG + Fosfo
Aparência	7,30 ± 1,47^{a}	7,63 ± 1,34^{a}	6,53 ± 1,77^{b}	7,50 ± 1,24^{a}
Textura	6,93 ± 1,84^{a}	7,28 ± 1,68^{a}	5,55 ± 2,16^{b}	6,91 ± 1,83^{a}
Aroma	6,84 ± 1,43^{ab}	7,15 ± 1,28^{a}	6,51 ± 1,71^{b}	7,01 ± 1,38^{ab}
Sabor	6,66 ± 1,89^{ab}	6,94 ± 1,61^{a}	6,15 ± 1,89^{b}	6,74 ± 1,79^{ab}
Aceitação global	6,64 ± 1,76^{a}	7,02 ± 1,55^{a}	5,93 ± 1,79^{b}	6,81 ± 1,57^{a}

*Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem pelo teste de Tukey (α = 5%).
Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Observou-se que o tratamento com TG isolada apresentou menor aceitação em todos os parâmetros avaliados. Esse resultado pode ser explicado pelo efeito característico dessa enzima na matriz proteica dos produtos lácteos. A TG catalisa ligações cruzadas entre proteínas, aumentando a compactação e a coesão da rede proteica (Velazquez-Dominguez *et al.*, 2023). Em produtos nos quais se espera textura cremosa, como é o caso do requeijão cremoso, essa compactação da estrutura proteica pode resultar em descaracterização na aparência por reduzir a cremosidade percebida e conferir sensação de menor fluidez e consequente menor aceitação (Chen *et al.*, 2018; Razeghi; Yazdanpanah, 2020). Estudos prévios relatam que esse efeito da TG pode reduzir a aceitabilidade sensorial em produtos lácteos quando a cremosidade é um atributo central da qualidade (Velazquez-Dominguez *et al.*, 2023).

Desse modo, a menor aceitação observada no presente estudo mostra-se consistente com os padrões previamente descritos na literatura.

O tratamento com adição de fosfolipase apresentou desempenho sensorial superior, evidenciado pelos maiores índices de aceitabilidade em todos os atributos avaliados. A ação da fosfolipase sobre os fosfolipídios da membrana dos glóbulos de gordura leva à formação de lisofosfolipídios com alta capacidade emulsificante, os quais favorecem a distribuição homogênea da fase lipídica na matriz do produto (Eren; Akin, 2017). Além disso, a gordura presente no produto exerce um efeito positivo sobre o sabor, atuando como veículo de compostos aromáticos, intensificando a sensação de cremosidade e atenuando notas indesejáveis, como a acidez excessiva. Em conjunto, tais fatores resultam em uma percepção sensorial mais equilibrada e agradável ao consumidor (Spence; Piqueras-Fiszman, 2016; Fellows, 2017).

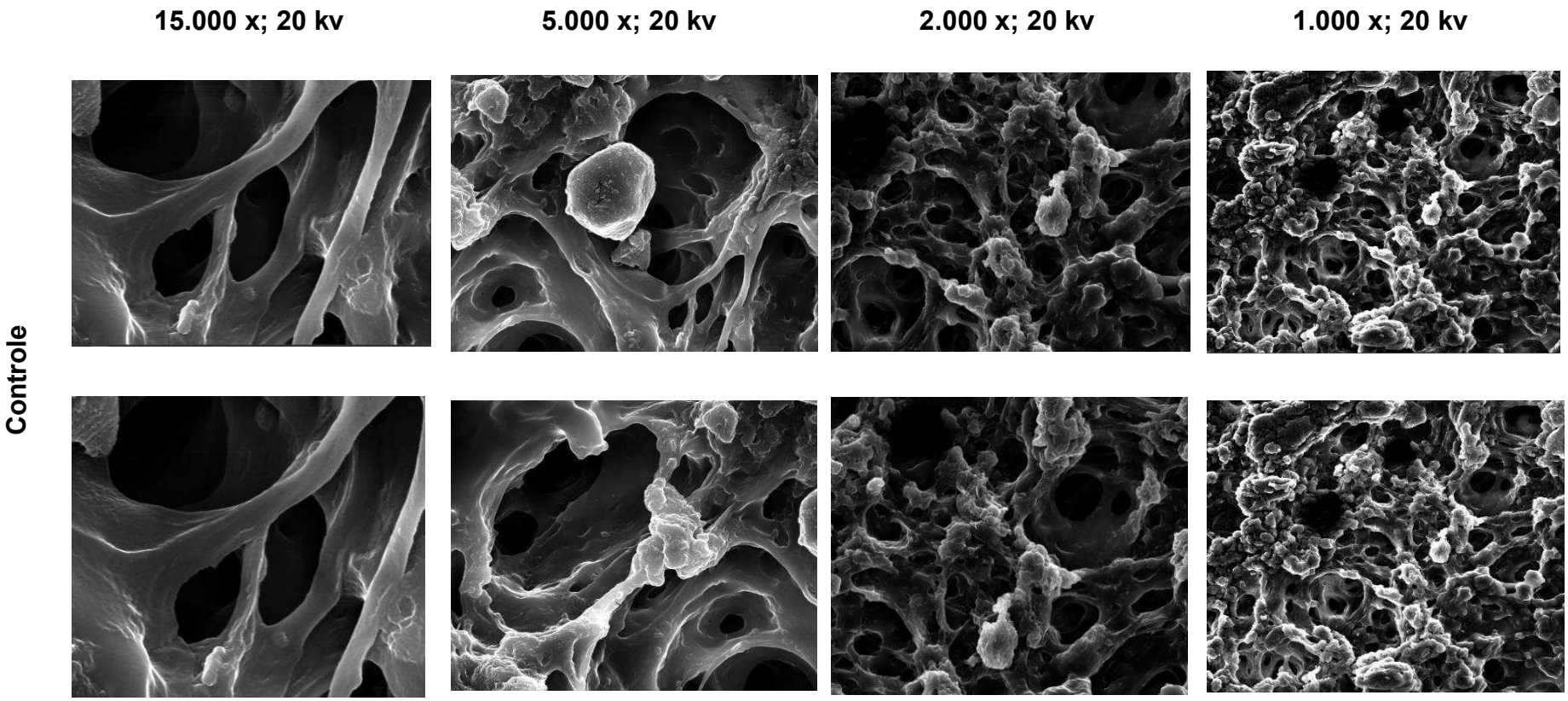
O tratamento combinado (TG + fosfo) apresentou desempenho sensorial satisfatório para todos os atributos avaliados, com médias estatisticamente semelhantes às do controle e do tratamento contendo apenas fosfolipase ($p > 0,05$), conforme observado na Tabela 16. Esses resultados indicam que a associação das enzimas foi capaz de manter a aceitabilidade do requeijão cremoso, sem comprometer suas características sensoriais.

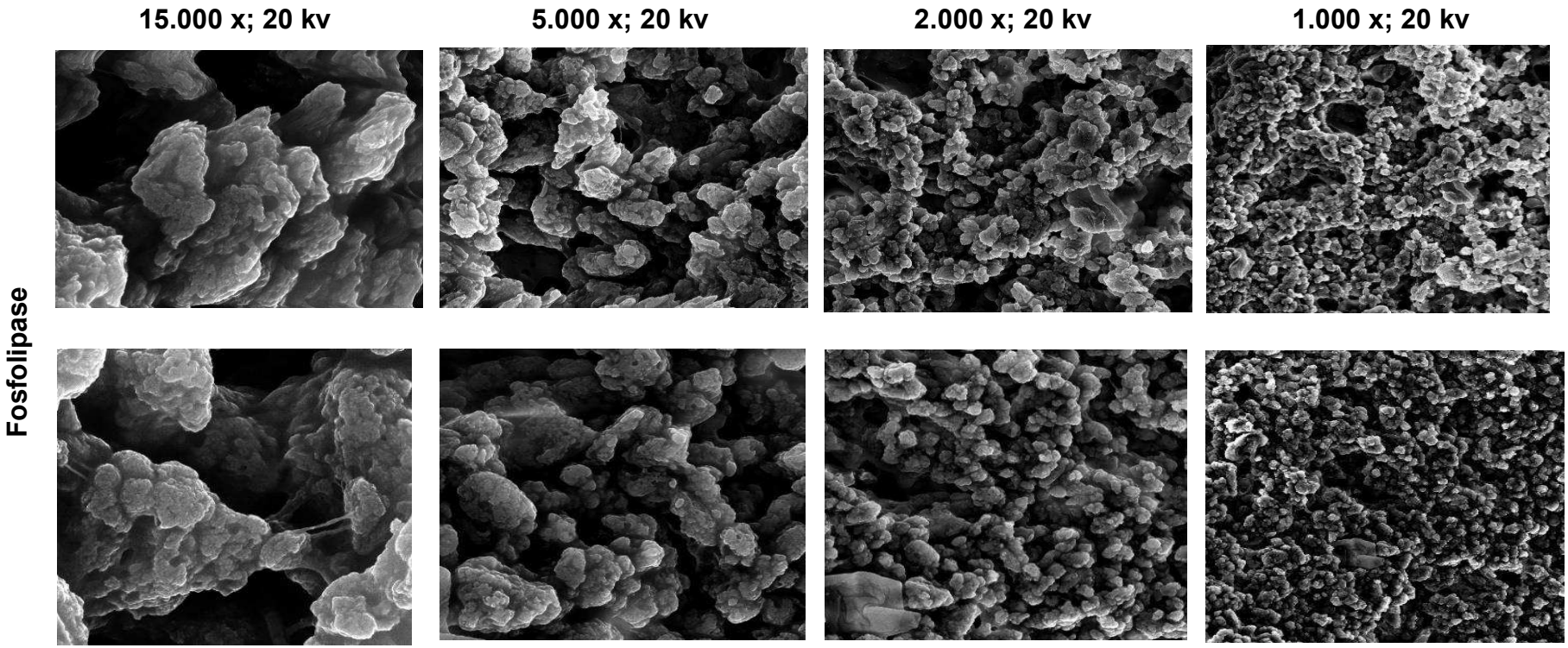
Cabe destacar que a menor aceitação para o tratamento contendo TG indica que, embora essa enzima possa aprimorar determinadas propriedades tecnológicas, sua aplicação em requeijões requer avaliação criteriosa. Esses parâmetros, embora não capturados pelos ensaios de textura realizados, influenciam de maneira decisiva a experiência sensorial do consumidor.

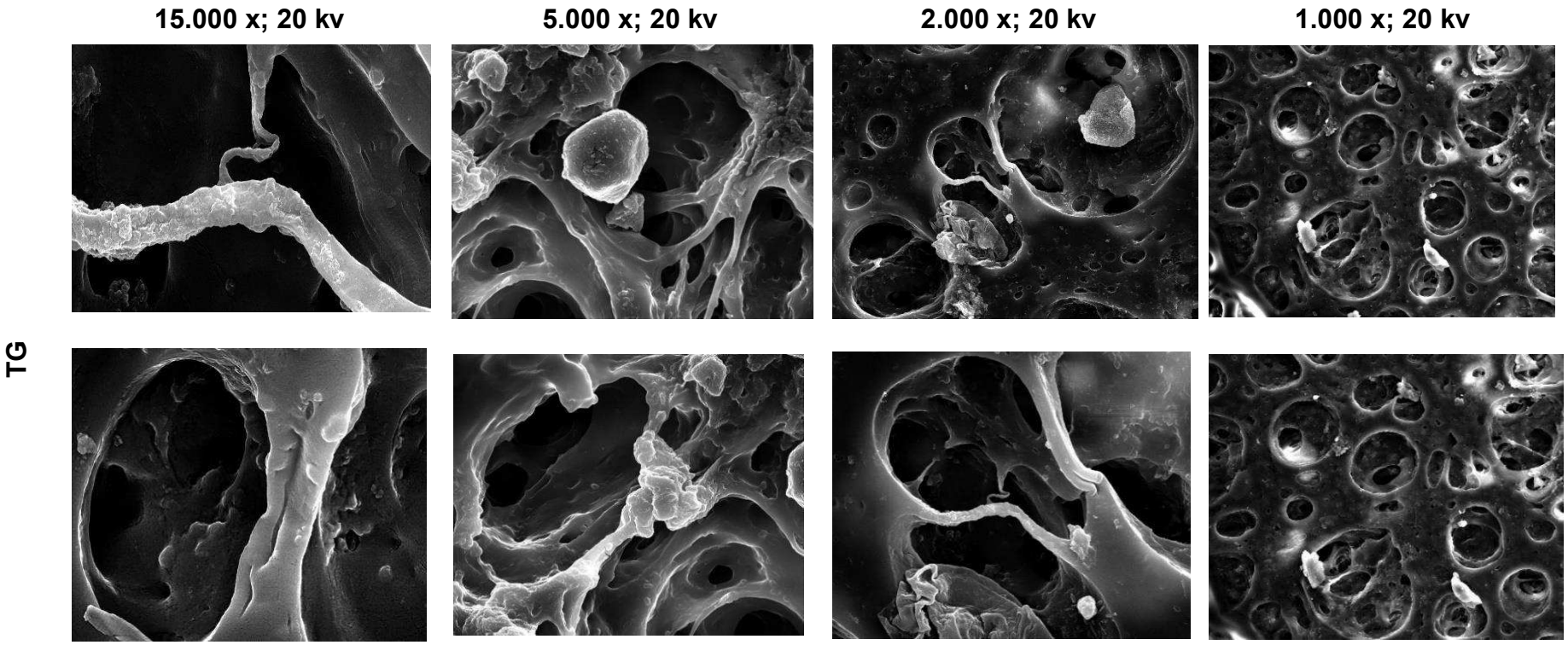
5.11 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

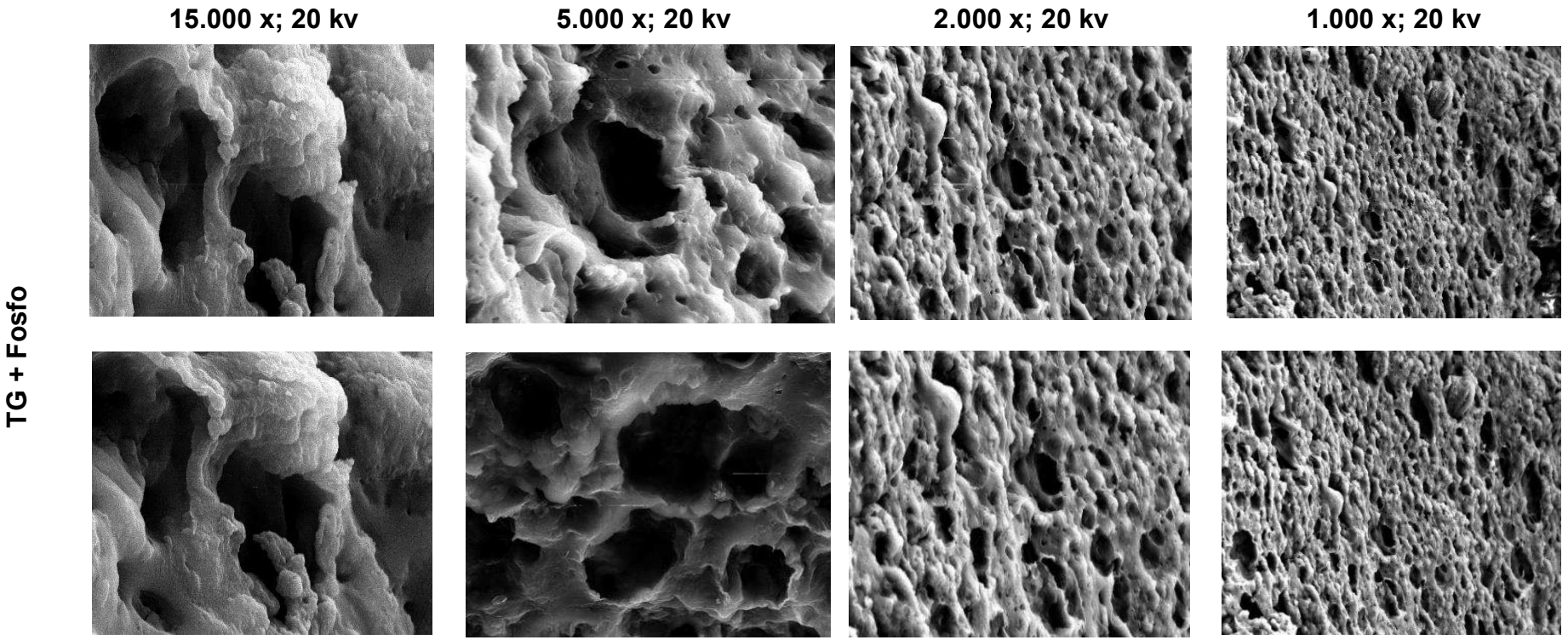
A Figura 9 apresenta as micrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de requeijão cremoso para ambos os tratamentos, elaborado conforme o método de produção adotado neste estudo. As imagens foram registradas com tensões de 20 kV, em ampliações variando de 1.000×,2000×,5000× e 15.000×.

Figura 9 - Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de requeijão cremoso em diferentes tratamentos.




15.000 x; 20 kv
5.000 x; 20 kv
2.000 x; 20 kv
1.000 x; 20 kv
Fosfolipase


15.000 x; 20 kv
5.000 x; 20 kv
2.000 x; 20 kv
1.000 x; 20 kv
TG



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

As micrografias obtidas não evidenciaram a presença de cristais em forma de agulha ou a ocorrência de fendas estruturais e descontinuidades na rede proteica, o que sugere a ausência de precipitação em decorrência de sais fundentes. Tal observação indica que a concentração de sal fundente utilizada foi adequada para promover a solubilização e reorganização da matriz, sem ocasionar dano estrutural.

No tratamento controle, observou-se um maior volume de glóbulos de gordura na matriz proteica. Foi possível identificar espaços vazios distribuídos na microestrutura, correspondentes a glóbulos de gordura de diferentes diâmetros, dispersos e estabilizados em uma rede contínua de micelas de caseína, característica típica de sistemas emulsificados aquecidos.

A adição das enzimas, por sua vez, alterou o diâmetro médio dos glóbulos de gordura e as interações hidrofóbicas intermoleculares, influenciando diretamente a coesão e estabilidade do gel proteico.

A formulação contendo fosfolipase, verificou-se a diminuição no diâmetro dos glóbulos de gordura em comparação ao tratamento controle. Esse efeito está relacionado à ação da enzima sobre os fosfolipídios da membrana dos glóbulos de gordura, promovendo sua hidrólise e originando lisofosfolipídios com maior capacidade de interação com proteínas. A alteração na composição da interface lipídio-proteína favorece a coalescência parcial dos glóbulos de gordura e contribui para uma redistribuição mais homogênea da fase lipídica na matriz (Pan *et al.*, 2025; Zhao *et al.*, 2024).

No tratamento com TG, observou-se uma redução no diâmetro dos glóbulos de gordura, indicando maior eficiência na estabilização da fase lipídica pela matriz proteica. Esse resultado está associado à capacidade da TG de promover ligações cruzadas intra e intermoleculares entre moléculas de caseína, intensificando a coesão da rede proteica. A formação desses polímeros proteicos aumenta a capacidade de emulsificação da matriz, uma vez que a proteína reticulada atua como agente estabilizante na interface lipídio-proteína (Hinz *et al.*, 2007; Er; Sert; Mercan, 2019).

A redução da coalescência e a maior integração entre as fases proteica e lipídica reforçam a eficácia da TG na estabilização estrutural do sistema. Dessa forma, a enzima contribui para uma microestrutura mais homogênea e consolidada, o que pode refletir positivamente em atributos funcionais, como resistência à sinérese (Hinz *et al.*, 2007).

No tratamento combinado (TG + Fosfo), verificou-se uma emulsificação menos eficiente, caracterizada pelo aumento no diâmetro dos glóbulos de gordura e pela distribuição menos homogênea da fase lipídica na matriz proteica. Esse comportamento pode estar relacionado à possível competição entre as enzimas pelos mesmos sítios de interação na matriz ou, ainda, à interferência recíproca em suas atividades catalíticas quando aplicadas simultaneamente.

Os resultados reforçam que o efeito final das enzimas no requeijão não depende apenas de sua presença na formulação, mas da forma como são incorporadas ao processo tecnológico, considerando suas especificidades, limitações e condições ótimas de atuação. Cada enzima apresenta requerimentos próprios, como pH, temperatura, tempo de reação e disponibilidade de substrato, que determinam sua eficiência e o tipo de modificação gerada na matriz proteico-lipídica.

Portanto, a interação entre o modo de aplicação, as características intrínsecas de cada enzima e as etapas tecnológicas do processo influenciam diretamente a organização estrutural, e consequentemente, o desempenho sensorial e funcional do produto final.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho permitiu compreender de forma ampla os efeitos da aplicação das enzimas fosfolipase e transglutaminase, isoladas ou combinadas, na fabricação do requeijão cremoso. As aplicações das enzimas não interferiram na composição físico-químicas do requeijão cremoso. Além disso, a qualidade microbiológica foi mantida em todos os tratamentos sob estocagem refrigerada, demonstrando que as formulações permaneceram conformes aos padrões estabelecidos para produtos lácteos. Houve um aumento no rendimento nos tratamentos TG e (TG+Fosfo), e uma maior recuperação de gordura nesses dois tratamentos e também no tratamento Fosfo. Não houve diferença entre os tratamentos na recuperação de proteína. Os parâmetros colorimétricos (L*, a* e b*) não foram alterados pela aplicação das enzimas, mas houve mudanças sutis ao longo do período de armazenamento para todos os tratamentos.

Houve alterações no perfil de textura ao longo do armazenamento, com redução da elasticidade, coesividade e gomosidade, bem como o comportamento não linear da dureza. Porém, os resultados demonstram que o uso de enzimas não compromete a textura do requeijão cremoso, e as modificações observadas são compatíveis com fenômenos físico-químicos típicos do período de estocagem.

A capacidade de derretimento manteve-se semelhante em todos os tratamentos, sem alterações ao longo do tempo de estocagem refrigerada, e os valores obtidos são compatíveis com os padrões tecnológicos esperados para requeijões cremosos.

A avaliação sensorial indicou que os requeijões elaborados com fosfolipase, apresentaram melhor escores entre os provadores em todos os atributos avaliados. Em contrapartida, o tratamento com TG isolada apresentou menor aceitação.

As análises microestruturais, avaliadas por MEV, evidenciaram a capacidade das enzimas de modificar a estabilidade e a organização da matriz láctea, influenciando diretamente a coalescência parcial dos glóbulos, a interação proteína-lipídio e, consequentemente, as propriedades texturais e sensoriais do produto final.

Em síntese, os resultados indicam que a aplicação de fosfolipase e TG na fabricação de requeijão cremoso configura-se como uma alternativa tecnológica consistente para o aumento do rendimento da massa sem comprometimento dos atributos de qualidade. A fosfolipase destacou-se pela maior eficiência na recuperação

de gordura e pela melhor aceitação na análise sensorial, enquanto a TG contribuiu para o fortalecimento da matriz proteica, promovendo maior coesão estrutural e estabilidade da emulsão. Contudo, a aplicação isolada da TG apresentou menor aceitação na análise sensorial, o que indica a necessidade de reavaliação das condições de uso dessa enzima, a fim de minimizar possíveis impactos sensoriais indesejáveis.

REFERÊNCIAS

ABOUMAHMOUD, R.; SAVELLO, P. A. Cross of whey protein by transglutaminase. **Journal of Dairy Science**, [*S.l.*], v. 73, p. 256-263, Feb. 1990.

ABD AL-GAWAD, M. A. M.; AHMED, N. S.; EL-ABD, M. M.; AL-RAFEE, Abd. Effect of homogenization on the properties and microstructure of mozzarella cheese from buffalo milk. **Acta Scientiarum Polonorum**, Poland, v. 11, n. 2, p. 121-135, 2012.

AJINOMOTO. **Propriedades básicas da transglutaminase**. Catálogo, 2013.

ALONSO-SALCES, R. M. *et al.* Chemometric classification of Basque and French ciders based on their total polyphenol contents and CIELab parameters. **Food Chemistry**, England, v. 91, n. 1, p. 91-98, June 2005.

ALVES, A. T. S. *et al.* Development of technology for production of reduced fat processed cheese. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 70, n. 2, p. 64-77, mar./abr. 2015.

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

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO. **Queijos Processados.** São Paulo: ABIQ, 2022.

ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analisys.** 14st ed. Washington: AOAC, 1984. 141 p.

ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis.** AOAC Official Method 967.21, Chapter 45. AOAC, 1995. p. 16.

ATIK, D. S.; HUPPERTZ, T. Melting of natural cheese: A review. **International Dairy Journal**, v. 142, 105648, 2023.

BELSITO, P. C. **Desenvolvimento de requeijão prebiótico com adição de galactooligossacarídeo.** 2016. 46 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2016.

BONISCH, M. P. *et al.* Transglutaminase crosslinking of milk proteins and impact on yoghurt gel properties. **International Dairy Journal,** England, v. 17, n. 11, p. 1360-1371, Nov. 2007.

BORRELLI, G. M.; TRONO, D. Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 16, n. 9, p. 20774-20840, Sept. 2015.

BOURNE, M. C. **Food Texture and Viscosity:** Concept and Measurement. 2nd ed. Academic Press, 2002.

BRASIL. **Instrução normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003.** Brasília, DF: 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Leite e Produtos Lácteos. Portaria n. 359. **Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Requeijão Cremoso ou Requesón.** Brasília, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018. Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. **Diário Oficial da União.** Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. Instrução Normativa n. 68, de 12 de dezembro de 2006. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 14 dez. 2006.

BRITO, M. C. **Efeitos da utilização de enzima fosfolipase na fabricação de Queijo Minas Frescal.** 2019. 78 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia do leite e derivados) - Universidade Federal de Juiz de Fora, 2019.

BUATIG, R.; CLEGG, M. E.; MICHAEL, N.; ORUNA-CONCHA, M.-J. Effect of Processing on Cow's Milk Protein Microstructure and Peptide Profile After In Vitro Gastrointestinal Digestion. **Dairy,** Switzerland, v. 6, n. 2, p. 15, Mar. 2025.

CABRELON, M. D.; BOSCHI, A. O. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) Acoplada a Espectroscopia por Dispersão de Elétrons (EDS): Uma Ferramenta Poderosa para a Eliminação Efetiva de Defeitos em Produtos Cerâmicos. **Cerâmica Industrial**, v. 10, n. 5/6, p. 23-27, 2005.

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

CARIC', M. *et al.* Effects of emulsifiying agents on the microstructure and other characteristics of process cheese. A review. **Food Microstructure**, Chicago, v. 4, n. 2, p. 297-312, Jan. 1985.

CASADO, C. M.; SILVA, F. L.; OLIVEIRA, R. A. **Aplicações de enzimas microbianas na indústria alimentícia.** São Paulo: Editora Acadêmica, 2012.

CAVALCANTE, A. B. D. **Desenvolvimento e padronização de formulação para o processamento de requeijão.** 1971. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1971.

CEREN AKAL, H. Transglutaminase induced whey cheese production: impact of different ratios on yield, texture, and sensory properties. **Mljekarstvo,** Croatia, v. 73, n. 4, p 225-237, Oct./Dec. 2023.

CHEN, C-C.; HSIEH, J-F. Microwave-assisted cross-linking of milk proteins induced by microbial transglutaminase. **Scientific Reports,** United Kingdom, v. 6, p. 39040, Dec. 2016.

CHEN, L. *et al.* Influence of transglutaminase-induced modification of milk protein concentrate (MPC) on yoghurt texture. **International Dairy Journal,** Netherlands, v. 78, p. 65-72, Mar. 2018.

COSTA, M. de R.; JIMÉNEZ-FLORES, R.; GIGANTE, M. L. Propriedades da membrana do glóbulo de gordura do leite. **Alimentos e Nutrição,** Araraquara, v. 20, n. 3, p. 507-514, jul./set. 2009.

COSTA JÚNIOR, J. S. **Análise Química Quantitativa Experimental** (Apostila). Teresina: Instituto Federal de Ensino, Ciência e Tecnologia do Piauí, 2020.

CRUZ, A. G. *et al.* **Processamento de produtos lácteos: queijos, leites fermentados, bebidas lácteas, sorvete, manteiga, creme de leite, doce de leite, soro em pó e lácteos funcionais**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

CUBIDES, Y. T. P.; EKLUND, P. R.; FOEGEDING, E. Allen. Casein as a Modifier of Whey Protein Isolate Gel: Sensory Texture and Rheological Properties. **Journal of Food Science,** v. 84, n. 12, p. 3399-3410, 2019.

CUNHA, C. R.; MENEZES, C. R.; DOMINGUES, A. M. Color and microstructure changes in processed cheese spreads during storage. **LWT - Food Science and Technology**, England, v. 132, p. 109-164, 2020.

CUNHA, C. R.; ALCÂNTARA, M. R.; VIOTTO, W. H. Effect of the type of emulsifying salt on microstructure and rheological properties of "requeijão cremoso" processed cheese spreads. **Journal of Food Science**, United States, v. 77, n. 8, p. E176-81, Aug. 2012.

CUNHA, C. R.; DIAS, A. I.; VIOTTO, Walkiria H. Microstructure, texture, colour and sensory evaluation of a spreadable processed cheese analogue made with vegetable fat. **Food Research International**, United States, v. 43, n. 3, p. 723-729, Apr. 2010.

DAMODARAN, S.; AGYARE, K. K. Effect of microbial transglutaminase treatment on thermal stability and pH-solubility of heat-shocked whey protein isolate. **Food Hydrocolloids**, Denmark, v. 30, n. 1, p. 12-18, Jan. 2013.

DE MARIA, L. *et al.* Phospholipases and their industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Germany, v. 74, n. 2, p. 290-300, Mar. 2007.

DEWETTINCK, K. *et al.* Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. **International Dairy Journal**, England, v. 18, n. 5, p. 436-457, May 2008.

DOMINGOS, E. M O. *et al.* Utilização de fosfolipases em queijos - uma revisão. **Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 7, jul. 2021.

DOMINGOS, E. M. O. **Efeito da fosfolipase na qualidade físico-química e rendimento do queijo Minas Padrão.** 2022. 75 p. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2022.

EL-LOLY, M. M. Composition, properties and nutritional aspects of milk fat globule membrane - a Review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, Poland, v. 61, n. 1, p. 7-32, Mar. 2011.

EREN, L.; AKIN, S.. Phospholipase Applications in Cheese Production. **Journal of Food Science and Engineering**, United Kingdom, v. 7, n. 6, p´. 312-315, June 2017.

ER, B.; SERT, D.; MERCAN, E. Production of skim milk powder by spray-drying from transglutaminase treated milk concentrates: Effects on physicochemical, powder flow, thermal and microstructural characteristics. **International Dairy Journal,** Netherlands, v. 99, p. 104544, Dec. 2019.

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

FARIÑA, L. O. *et al.* Estudos das características físico-químicas, reológicas e sensoriais do requeijão cremoso produzido com a adição de transglutaminase. *In:* CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 21., Juiz de Fora, 2004. **Anais...** Juiz de Fora, 2004. p.163-166.

FAY, D. L. N. **Angewandte Chemie International Edition**. 6th ed. 1967. p. 951-952.

FELLOWS, P. **Food Processing Technology:** Principles and Practice. 4. ed. Cambridge: Woodhead Publishing, 2017.

FERNANDES, A. G. Sais emulsificantes. *In:* MARTINS, J. F.; FERNNDES, A. G. **Processamento de requeijão cremoso e outros queijos fundidos.** Campinas: ITAL, 1981.

FERNANDES, P. Enzymes in food processing: A condensed overview on strategies for better biocatalysts. **Enzyme Research**, [*s.l.*], v. 2010, n. 1, Sept. 2010.

FERREIRA, D. N. **Influência do uso de retentados de baixo fator de concentração no rendimento e na qualidade da mussarela de reduzido teor de gordura feita por acidificação direta**. 2004 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer analysis system to fixed effects split plot type designs. **Brazilian Journal of Biometrics**, Lavras, v. 37, n. 4, p. 529-535, Dec. 2019.

FOX, P. F. *et al.* **Fundamentals of cheese science.** 2nd ed. New York: Springer, 2017.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. Advanced dairy chemistry. *In:* **Proteins:** Applied Aspects. 4th ed. New York: Springer, 2015.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2017.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUINÉE, T. P. **Cheese:** Chemistry, Physics and Microbiology. 4. ed. London: Elsevier, 2017.

GALLINA, D. A. **Influência do tratamento UHT na qualidade do requeijão cremoso tradicional e light.** 2005. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

GARG, G.; SEHRAWAT, N.; YADAV, M. Role of enzymes in food industries frontiers in food biotechnology. *In:* SHARMA, C.; SHARMA A. K.; ANEJA, K. R. **Frontiers in food biotechnology.** 1st ed. New York: Nova Publishers, 2016.

GAUCHE, C.; BARRETO, P. L. M.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Effect of thermal treatment on whey protein polymerization by transglutaminase: Implications for functionality in processed dairy foods. **LWT - Food Science and Technology**, England, v. 43, n. 2, p. 214-219, Mar. 2010.

GERBER, W.; STETTLER, F. **Verfahren zur Herstellung von Schmelzkäse** (Process for producing processed cheese) Schweizerische Milchwirtschaftliche Gesellschaft, 1911.

GIGANTE, M. L. **Requeijão cremoso obtido por ultrafiltração de leite pré-acidificado adicionado de concentrado proteico de soro.** 1998. 122 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

GOLINELLI, D. C. **Avaliação da coagulação e sinérese do leite por RMN-DT**. 2019. Dissertação (Mestrado em Química Analítica e Inorgânica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

GOMES, R. G. **Caracterização de requeijão cremoso modificado***.* 2009. 127 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, 2009.

GOMES, R. G.; PENNA, A. L. B. Caracterização de requeijão cremoso potencialmente prebiótico pela adição de inulina e proteína de soja. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 28, n. 2, p. 289-302, jul./dez. 2010.

GUNASEKARAN, S.; AK, M. M. ***Cheese Rheology and Texture***. CRC Press, 2003.

HAN, M. *et al.* Effect of microbial transglutaminase on NMR relaxometry and microstructure of pork myofibrillar protein gel. **European Food Research and Technology**, Germany, v. 228, n. 4, p. 665-670, Dec. 2008.

HANSEN, C. **Uma opção para aumentar o rendimento do seu queijo.** Ha-la Biotec, 2007.

HINZ, K. *et al.* Influence of enzymatic cross-linking on milk fat globules and emulsifying properties of milk proteins. **International Dairy Journal,** Netherlands, v. 17, n. 4, p. 289-293, Apr. 2007.

HØIER, E. *et al.* Enhancing cheese yield by phospholipase treatment of cheese milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, Australia, v. 61, n. 2, p. 179-182, July 2006.

HOLTORFF, F. *et al.* A study of process cheese emulsifier. **Journal of Dairy Science**, United States, v. 34, n. 6, Jan. 1951.

HUPPERTZ, T.; KRUIF, C. G. de Rennet-induced coagulation of enzymatically cross-linked casein micelles. **International Dairy Journal**, England, v. 17, p. 442-447, Jan. 2007.

JONES, L. V.; PERYAM, D. R.; THURSTONE, L. L. Development of a scale for measuring soldiers'food preferences. **Journal of Food Science**, United States, v. 20, n. 5, p. 512-520, 1955.

KAMAL, S. **Advances in Scanning Electron Microscopy**. 2024. Thesis - Rochester Institute of Technology, New York, 2024.

KARAHAN, L. E.; AKIN, M. S. Phospholipase applications in cheese production. **Journal of Food Science and Engineering**, [*s.l.*], v. 7, n. 6, p. 312-315, Jan. 2017.

KELLY, A. L.; HUPPERTZ, T.; SHEEHAN, J. J. Pre-treatment of cheese milk: Principles and developments. **Dairy Science and Technology**, [*s.l.*], v. 88, n. 4-5, p. 549-572, July 2008.

KOCA, N.; METIN, M. Textural, melting and sensory properties of low-fat fresh Kashar cheeses produced by using fat replacers. **International Dairy Journal**, England, v. 14, n. 4, p. 365-373, Apr. 2004.

KURAISHI, C. *et al.* The usefulness of transglutaminase for food processing. *In:* **Biotechnology for improved foods and flavor**. 1996. Cap. 3. p. 29-38.

LANDIN, T. B. *et al.* Principais propriedades funcionais do queijo muçarela, queijo prato e requeijão culinário – uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 76, n. 2, p. 118-130, abr./jun. 2021.

LEE, W.-J.; LUCEY, J. A. Structure and physical properties of yogurt gels: effect of incubation temperature. **Journal of Dairy Science**, United States, v. 93, p. 327-338, Oct. 2010.

LEE, S. K.; ANEMA, S.; KLOSTERMEYER, H. The influence of moisture content on the rheological properties of processed cheese spreads. **International Journal of Food Science and Technology,** v. 39, p. 763-771, 2004.

LI, H. *et al.* Physicochemical, Functional and Microstructural Changes during the Emulsification Process of Processed Cheese. **Food Science**, *[S.l]*, v. 44, n. 4, p. 78-84, 2023.

LILBÆK, H. M. *et al.* Improving the yield of mozzarella cheese by phospholipase treatment of milk. **Journal of Dairy Science**, United States, v. 89, n. 11, p. 4114-4125, Nov. 2006.

LIMA, K. R. **Perfil físico-químico e sensorial de requeijão cremoso**. 2019. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2019.

LIMA, K. R. **Perfil físico-químico de requeijão cremoso obtido a partir de diferentes coagulantes.** 2021. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Instituto Federal Goiano, Rio Verde, 2021.

LIU, T. *et al.* Changes of physicochemical and functional properties of processed cheese made with natural cheddar and mozzarella cheeses during refrigerated storage. **Scientific Reports**, London, v. 14, n. 1, p. 3714, Feb. 2024.

LOPEZ, C.; MADEC, M.-N.; JIMENEZ-FLORES, R. Lipid rafts in the bovine milk fat globule membrane revealed by the lateral segregation phospholipids and heterogeneous distribution of glycoproteins. **Food Chemistry**, v. 120, n. 1, p. 22-33, 2010.

LORENZEN, P. C.; SCHLIMME, E. Properties of enzymatically cross-linked casein micelles. **International Dairy Journal**, England, v. 8, n. 4, p. 289-293, 1998.

LORENZEN, P. C. *et al.* Effect of enzymatic cross-linking of milk proteins on functional properties of set-style yogurt. **International Journal of Dairy Technology**, England, v. 55, n. 3, p. 152-157, jan. 2002.

LORENZEN, P. C. Techno-functional properties of transglutaminase-treated milk proteins. **Milchwissenschaft**, Germany, v. 55, n. 12, p. 667-670, Jan. 2007.

MACFIE, H. J. *et al.* Designs to balance the effect of order of presentation and first-order carry-over effects in hall tests. **Journal of Sensory Studies**, United States, v. 4, p. 129-148, 1989.

McMAHON, D. J.; OBERG, C. J. **Cheese:** Chemistry, Physics and Microbiology. Amsterdam: Elsevier, 2017.

MALLMANN, S. *et al.* Efeito da correção do pH do requeijão cremoso tipo ovino sobre as características físico químicas e microbiológica. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, Recife, v. 11, n. 2, p. 936-943, 2021.

MASSON, A. P.; VIGANÓ, O. J.; BORDIGNON, S. Requeijão cremoso de copo com teor reduzido de sódio e enriquecido com fibras. **Revista E-Tech:** Tecnologias para Competitividade Industrial, Florianópolis, v. 9, n. 1, p. 123-149, jul. 2016.

MAYTA-HANCCO, J. *et al.* Effect of ultrahigh pressure homogenisation of cream on the physicochemical and sensorial characteristics of fat-reduced starter-free fresh cheeses. **LWT - Food Science and Technology**, England, v. 110, p. 292-298, Apr. 2019.

MCGUIRE, R. G. Reporting of objective color measurements. **HortScience**, United States, v. 27, n. 12, p. 1254-1255, Dec. 1992.

METWALLY, M. M. E.; EL-ZEINI, H. M.; GAZAR, E. F. Impact of using transglutaminase enzyme in manufacturing low and high fat mozzarella cheese. **Journal of Food, Nutrition and Population Health**, [*S.l.*], v. 2, n. 1, p. 5, 2018.

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

MLEKO, S.; FOEGEDING, E. A. Physical properties of rennet casein gels and processed cheese analogs containing casein-whey protein aggregates. **Milchwissenschaft**, Germany, v. 55, n. 2, p. 68-72, Jan. 2000.

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

MONSALVE-ATENCIO, R. *et al.* Interaction between phospholipase and transglutaminase in the production of semi-soft fresh cheese and its effect on the yield, composition, microstructure and textural properties. **LWT – Food Science and Technology**, United States, v.154, p. 112722, Jan. 2022.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista Processos Químicos**, Jundiaí, v. 3, n. 5, p. 9-23, jan. 2009.

NIEUWENHUIZEN, W. F. *et al.* Transglutaminase-mediated modification of glutamine and lysine residues in native bovine β-lactoglobulin. **Biotechnology and Bioengineering,** Germany, v. 85, n. 3, p. 248-258, Dec. 2003.

NINGTYAS, D. W. *et al.* Flavour profiles of functional reduced-fat cream cheese: Effects of β-glucan, phytosterols, and probiotic L. rhamnosus. **LWT-Food Science and Technology**, England, v. 105, n. 1, p. 16-22, May 2019.

NONAKA, M. *et al.* Independent transglutaminase derived from microorganisms. **Agricultural and Biological Chemistry**, [*s.l.*], v. 53, n. 10, p. 2619-2623, Oct. 1989.

NOKATA, M. *et al.* Incorporation of lysine- and lysine dipeptides into α[s1]-casein by Ca[2+]-independent microbial transglutaminase. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, [*s.l.*], v. 60, p. 131-133, Jan. 1996.

OLIVEIRA, J. S. **Queijos:** Fundamentos tecnológicos. 2. ed. Campinas: Icone, 1987.

OLIVEIRA, L. L. **Utilização da transglutaminase na fabricação de queijos frescos empregando diferentes processos de coagulação.** 2003. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

ÖZER, B. *et al.* Simultaneous use of transglutaminase and rennet in white-brined cheese production. **International Dairy Journal**, England, v. 33, n. 2, p. 129-134, Dec. 2013.

PACHEKREPAPOL, U.; HORNE, D. S.; LUCEY, J. A. Interactions between acidified dispersions of milk proteins and dextran or dextran sulfate. **Journal of Dairy Science**, England, v. 97, n. 9, p. 5371-5382, 2014.

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

PAN, Y. *et al.* Addition of Phospholipids Improved the Physical Stability and Fat Globule Structure of Processed Milk. **Foods,** Switzerland, v. 14, n. 3, p. 375, Jan. 2025.

PAULA, M. M. C. **Efeito do uso de proteína concentrada do leite (MPC) nas características físico-químicas, reológicas e sensoriais do Requeijão Culinário.** 2019. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2019. 57 f.

PEREIRA, J. T. *et al.* Influence of storage temperature on the texture profile and color of processed cheese spreads. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 11, n. 4, p. 294-301, 2008.

PICCOLO, K. C. **Avaliação do efeito da enzima transglutaminase no processo de produção de requeijão cremoso.** 2006.102 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.

PINTO, A. B. **Influência da transglutaminase no rendimento e na qualidade de requeijão cremoso.** 2002. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

PRESTES, A. A. *et al.* Development and Chemical, Physical, Functional, and Microbiological Characterization of Cream Cheese Formulations. **Foods,** Switzerland, 2025.

RAPACCI, M. **Estudo comparativo das características físicas e químicas, reológicas e sensoriais do requeijão cremoso obtido por fermentação láctica e acidificação direta.** 1997. 144 p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de

Campinas, Campinas, 1997.

RAZEGHI, F.; YAZDANPANAH, S. Effects of free and encapsulated transglutaminase on the physicochemical, textural, microbial, sensorial, and microstructural properties of white cheese. **Food Science Nutrition**, London, v. 8, n. 7, p. 3750-3758, May 2020.

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

RODRIGUES, F. M. *et al.* Uso de transglutaminase no processamento de queijo minas frescal com teor reduzido de sódio. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 25., Gramado, 2016. **Anais...** Gramado, 2016.

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

SALUNKE, P.; METZGER, L. E. Transglutaminase Crosslinked Milk Protein Concentrate and Micellar Casein Concentrate: Impact on the Functionality of Imitation Mozzarella Cheese Manufactured on a Small Scale Using a Rapid Visco Analyzer. **Foods**, Switzerland, v. 13, n. 17, p. 2720, Aug. 2024.

SAVOCA, M. P.; ATOBATELE, A. G.; VERDERIO, E. A. M. Biocatalysis by Transglutaminases: A Review of Biotechnological Applications. **Micromachines**, Switzerland, v. 9, n. 11, p. 562, Oct. 2018.

SEYED-MOSLEMI, S. A. *et al.* Effect of microbial lipase and transglutaminase on the textural, physicochemical, and microbial parameters of fresh quark cheese. **Journal of Dairy Science,** United States, v. 104, n. 7, p. 7489-7499, July 2021.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. **Chemical Society Reviews,** United Kingdom, v. 39, n. 11, p. 4067-4079, July 2010.

SHIMP, L. A. Process cheese principles. **Food Technology**, Chicago, v. 39, n. 5, p. 63-69, 1985.

SILVA, N. *et al.* **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos.** São Paulo: Varella, 1997. 295 p.

SILVA, R. C. S. N. **Otimização da aceitabilidade sensorial de requeijão cremoso light.** 2012. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

SOBRAL, D. **Otimização do processo de fabricação de análogos de requeijão culinário.** 2007. 102 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

SPADOTI, L. M. *et al.* Avaliação do rendimento do queijo tipo prato obtido por modificações no processo tradicional de fabricação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** Campinas, v. 23, n. 3, p. 492-499, set./dez. 2003.

SPENCE, C.; PIQUERAS-FISZMAN, B. 4 - Oral-Somatosensory Contributions to Flavor Perception and the Appreciation of Food and Drink. In: SPENCE, C.; PIQUERAS-FISZMAN, B. **Multisensory Flavor Perception -** Fundamental Neuroscience Through to the Marketplace. Cambridge: Woodhead Publishing, 2016.

TORRES, F. R. **Estudo das características sensoriais, físicas e químicas em requeijão cremoso tradicional e adicionado de amido e gordura vegetal, obtidos no comércio varejista.** 2015. 80 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2015.

TRANCOSO-REYES, N. *et al.* Assessing the yield, microstructure, and texture properties of miniature Chihuahua-type cheese manufactured with a phospholipase A1 and exopolysaccharide-producing bacteria. **Journal of Dairy Science**, United States, v. 97, n. 2, p. 598-608, Feb. 2014.

TUNICK, M. H.; NOLAN, E. J. Rheology of cheese. *In:* BAIANU, I. C. (ed.). **Physical Chemistry of Food Processes:** Fundamental Aspects. New York: Van Nostrand Reinhold, 1992.

TUNICK, M. H.; VAN HEKKEN, D. Dairy Products and Health: Recent Insights. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 43, p. 9381-9388, 2015.

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

VAN DENDER, A. G. F. Princípios básicos da fabricação de queijos fundidos de requeijão cremoso. **Leite e Derivados**, [*s.l.*], *v.* 1, n. 3, p. 26, jan. 1992.

VAN DENDER, A. G. F. **Requeijão cremoso e outros queijos fundidos:** tecnologia de fabricação, controle do processo e aspectos de mercado. 1. ed. Campinas: Fonte Comunicações e Editora, 2014.

VAN DENDER, A. G. F.; ZACARCHEMO, P. B. **Requeijão:** características dos diferentes tipos e inovações do produto nas versões reduzidas em gordura e sódio. Industria de lácteos. 2016.

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

VELAZQUEZ-DOMINGUEZ, A. *et al.* Influence of enzymatic cross-linking on the apparent viscosity and molecular characteristics of casein micelles at neutral and acidic pH. **Food Hydrocolloids**, United States, v. 139, May 2023.

VERMA, R. C.; GUPTA, R. K. Rheological and sensory characteristics of processed cheese. **Journal of Food Science**, United States, 1981.

VIDAL, A. M. C.; SARAN NETTO, A. Obtenção e processamento do leite e derivados. *In:* **Obtenção e processamento do leite e derivados.** Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP, Pirassununga, 2018.

VIEIRA, M. E. M. **Uso de proteínas do soro do leite microparticuladas a fabricação de requeijão cremoso**. 2024. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2024. 54 f.

VIEIRA, D. C. F.; SILVA, C. A. S. Avaliação do emprego de transglutaminase em bebida láctea elaborada com leite de cabra. **Revista Vértices,** Rio de Janeiro, v. 16, n. 2, p. 143-151, fev. 2015.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy Science and Technology**. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2006.

WARSONO, E. K.; EVLYN, L.; JANICE, M.; RIZFI, F. P. Recent advances in the use of transglutaminase in cheese production. **ASEAN Journal on Science and Technology for Development**, Brunei Darussalam, v. 38, n. 2, Nov. 2021.

YOKOYAMA, K. *et al.* Transglutaminase: Characteristics and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Germany, v. 64, p. 791-798, 2004.

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

ZHAO, P. *et al.* Preparation of milk fat globule membrane ingredients enriched in polar lipids: Composition characterization and digestive properties. **Journal of Dairy Science,** United States, v. 107, n. 7, p. 4320-4332, July 2024.

ZHANG, X. *et al.* Protein crosslinking by microbial transglutaminase: Mechanisms and applications in dairy products. **International Dairy Journal,** Netherlands, v. 95, p. 1-10, 2019.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Modelo da ficha-resposta do teste de aceitação (escala hedônica de nove pontos) para requeijão cremoso.

Ficha de avaliação sensorial

Nome:_____

Idade:_____

Data:_____

1) Quanto você gostou ou desgostou de cada amostra? **De modo geral, por favor indique o quanto você gostou ou desgostou, utilizando a escala hedônica abaixo:**

9 - Gostei extremamente (Adorei)

8 - Gostei muito

7 - Gostei moderadamente

6 - Gostei ligeiramente

5 - Nem gostei/Nem desgostei

4 - Desgostei ligeiramente

3 - Desgostei moderadamente

2 - Desgostei muito

1 - Desgostei extremamente (Detestei)

Amostra	Aparência	Aroma	Sabor	Textura	Impressão Global