



MARIANA SOARES GOUVÊA

**UTILIZAÇÃO DA ENZIMA PAPAÍNA COMO COAGULANTE NA
FABRICAÇÃO DE QUEIJO MINAS FRESCAL**

INCONFIDENTES-MG

2018

MARIANA SOARES GOUVÊA

**UTILIZAÇÃO DA ENZIMA PAPAÍNA COMO COAGULANTE NA
FABRICAÇÃO DE QUEIJO MINAS FRESCAL**

Projeto Final de Curso apresentado como pré-requisito de conclusão do curso de Engenharia de Alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais Campus Inconfidentes para obtenção do título de Engenheira de Alimentos.

Orientadora: DSc. Ana Cristina Ferreira Moreira da Silva

INCONFIDENTES-MG

2018

MARIANA SOARES GOUVÊA

**UTILIZAÇÃO DA ENZIMA PAPAÍNA COMO COAGULANTE NA
FABRICAÇÃO DE QUEIJO MINAS FRESCAL**

Data de aprovação: ____ de _____ de 2018

Ana Cristina Ferreira Moreira da Silva: IFSULDEMINAS

Mariana Borges de Lima Dutra: IFSULDEMINAS

Fernanda Coutinho Pinheiro: IFSULDEMINAS

INCONFIDENTES-MG

2018

RESUMO

As enzimas são de grande importância na indústria alimentícia por possuírem alta atividade catalítica. Atuam em condições mais ou menos moderadas, modificando as matérias-primas, formando compostos tanto desejáveis como indesejáveis, sem influenciar o valor nutricional. Com isso, este trabalho teve como objetivo principal avaliar o poder coagulante da enzima vegetal papaína e sua viabilidade como um coagulante vegetal (CV), substituindo totalmente o coalho animal (CA) na fabricação de queijo Minas Frescal. Através do teste de poder coagulante, obteve-se o volume de 37,5g de papaína para coagular 100L em aproximadamente 40 minutos. Os efeitos das enzimas na coagulação foram avaliados no parâmetro sensorial, custo, rendimento e de composição centesimal, comparando os queijos produzidos com CA e CV. A força coagulante encontrada para o CV é de 1:160.000, que é um valor superior quando comparado ao valor da força coagulante para o CA que é de 1:90.000, conforme descrito no rótulo. O rendimento do queijo fabricado com CV foi 15,6 Kg, e para o CA 13,3 Kg ambos utilizando 100 L de leite; em relação ao custo este foi praticamente o mesmo para ambas formulações, não possuindo diferença estatística significativa. Na composição centesimal, os parâmetros umidade, cinzas e proteínas tanto do queijo produzido com CV quanto do queijo produzido com CA não apresentaram diferença estatística pelo teste t de Student a 5%. Somente o parâmetro % de lipídios apresentou diferença estatística, fato este que pode ser explicado pelo maior tempo de mexedura da massa com CV, perdendo-se assim mais finos no soro. Quanto à análise sensorial, no teste de comparação pareada, o queijo produzido com CV apresentou maior número de marcações quando comparado com CA diferindo estatisticamente. No teste de aceitação, avaliou-se os atributos aparência, aroma, textura, sabor e impressão global, obtendo-se as menores médias para o queijo produzido com CV. No teste do ideal avaliando o parâmetro maciez não houve diferença significativa entre ambas formulações. Quanto ao quesito para intenção de compra, o queijo produzido com CA apresentou maior intenção de compra positiva. O queijo produzido com CV apresentou sabor amargo devido à hidrólise dos peptídeos de alto peso molecular. A produção do queijo Minas Frescal utilizando o CV papaína é possível, porém não viável devido à formação do sabor amargo. Esse tipo de coalho pode ser utilizado junto a outras peptidases ou em queijos que requerem maturação para que ocorra a quebra desses peptídeos de alto peso molecular em outros compostos e possibilite a reversão do defeito.

Palavras-chaves: papaína, enzimas proteolíticas, coagulação, leite, Minas Frescal, coalho animal.

ABSTRACT

The enzymes are of great importance in the food industry because they have high catalytic activity. They act in more or less moderate conditions, modifying the raw materials, forming both desirable and undesirable compounds, without influencing the nutritional value. The objective of this work was to evaluate the coagulant power of the plant enzyme papain and its viability as a vegetable coagulant (CV), totally replacing the animal rennet (CA) in the Minas Frescal cheese production. By the coagulant potency test, the volume of 37.5 g of papain was obtained to coagulate 100 L in approximately 40 minutes. The effects of the enzymes in the coagulation were evaluated in the sensorial parameter, cost, yield and centesimal composition, comparing the cheeses produced with CA and CV. The coagulant force found for the CV is 1: 160,000, which is a higher value when compared to the coagulant force value for the AC which is 1: 90,000, as described on the label. The yield of the cheese made with CV was 15.6 kg, and for the AC 13.3 kg both using 100 L of milk; in relation to the cost this was practically the same for both formulations, not having significant statistical difference. In the centesimal composition, the parameters moisture, ashes and proteins of both cheese produced with CV and of the cheese produced with CA did not present statistical difference by Student's t test at 5%. Only the parameter% of lipids presented statistical difference, a fact that can be explained by the longer time of mixing of the mass with CV, thus losing itself in the serum. As for the sensory analysis, in the paired comparison test, the cheese produced with CV showed a higher number of markings when compared to CA, differing statistically. In the ideal test evaluating the softness parameter there was no significant difference between both formulations at 5% probability. Regarding the item for intention to purchase, the cheese produced with CA had greater positive purchase intention. The cheese produced with CV showed a bitter taste due to the hydrolysis of high molecular weight peptides. The production of the Minas Frescal cheese using the papain CV is possible, but not viable due to the formation of the bitter taste. This type of rennet can be used alongside other peptidases or in cheeses that require maturation to break down these high molecular weight peptides into other compounds and enable reversal of the defect.

Keywords: papain, proteolytic enzymes, coagulation, milk, Minas frescal, animal rennet.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. JUSTIFICATIVA.....	2
1.2. OBJETIVO GERAL.....	2
1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. ENZIMAS	4
2.2. CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS	5
2.3. PEPTIDASES	6
2.4. PEPTIDASES CISTEÍNICAS	6
2.5. PAPAÍNA	7
3. PRODUÇÃO DE QUEIJOS	9
3.1. LEITE	9
3.2. QUEIJOS	11
3.3. QUEIJO MINAS FRESCAL.....	12
3.4. COAGULAÇÃO E MÉTODOS.....	13
3.5. COALHOS.....	14
3.5.1. COALHO ANIMAL	14
3.5.2. COALHO MICROBIANO	15
3.5.3. COALHO VEGETAL.....	15
3.6. PRODUÇÃO DE QUEIJOS.....	15
3.6.1. FABRICAÇÃO DO QUEIJO MINAS FRESCAL.....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1. ORIGEM E PREPARO DA ENZIMA.....	18
4.2. ORIGEM E ANÁLISE DO LEITE	18
4.3. ANÁLISE DO PODER COAGULANTE	19
4.4. FABRICAÇÃO DOS QUEIJOS MINAS FRESCAL E RENDIMENTO	19
4.5. CUSTO	20
4.6. ANÁLISE SENSORIAL.....	20
4.7. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL.....	24
4.7.1 UMIDADE.....	24
4.7.2. CINZAS	24
4.7.3. PROTEÍNAS.....	24
4.7.4. LIPÍDIOS	25
4.7.8. DETERMINAÇÃO DE LIPÍDIOS EM QUEIJO.....	25
5. ANÁLISE DE DADOS	26

5.1. ANÁLISE FÍSICO - QUÍMICA DO LEITE	26
5.2. PODER COAGULANTE.....	26
5.3. RENDIMENTO	27
5.4. CUSTO	28
5.5. ANÁLISES SENSORIAIS	29
5.6. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL.....	31
5.7. TEOR DE LIPÍDIOS NOS QUEIJOS.....	32
6. CONCLUSÃO	34
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	35
9. ANEXOS	41

DEDICO

A Deus por ser essencial em minha vida sempre me dando força, coragem e determinação;

Ao meu pai (in memoriam), quer onde esteja nunca deixou de me amar e confiar em mim;

À minha filha Anna Laura que foi o melhor presente que ganhei durante a graduação;

À minha mãe Claudete e meus irmãos pelo apoio, amor e companheirismo;

Às minhas amigas e familiares que sempre torceram por mim;

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pelo dom da vida, por ter me dado perseverança, saúde e força para superar as dificuldades durante essa caminhada.

À minha mãe Claudete e meus irmãos Luana, Tatiana e Hamilton pelo amor, carinho, compreensão e sermões, pois sem vocês essa etapa não seria concluída. Esta vitória é nossa!

À minha filha Anna Laura, por me mostrar verdadeiramente o sentido da palavra amor.

Às minhas tias Rita, Clotilde e Diva por todo afeto e apoio durante essa caminhada.

À minha professora e orientadora Ana Cristina Ferreira Moreira da Silva, pela excelente orientação, paciência e dedicação na realização deste trabalho e toda a graduação.

À professora Mariana, por seus ensinamentos, dedicação e paciência ao longo das supervisões deste trabalho. É um prazer tê-la na banca examinadora.

À técnica do setor de laticínios, Fernanda Pinheiro Coutinho, pela ajuda, paciência e conhecimentos compartilhados durante a fabricação dos queijos.

Às minhas amigas de pelo companheirismo de décadas e mesmo com a distância do dia-a-dia sempre nos fazemos presentes.

Agradeço ao meu namorado Danilo, que há poucos meses entrou na minha vida, sempre me dando apoio e sendo companheiro em todas as horas.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia do Sul de Minas-Campus Inconfidentes, professores e colegas que tive a oportunidade de conhecer e trocar experiências e aprendizado.

"Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu.
Há tempo de nascer, e tempo de morrer; tempo de plantar, e tempo de arrancar
o que
se plantou;
Tempo de matar, e tempo de curar; tempo de derrubar, e tempo de edificar;
Tempo de chorar, e tempo de rir; tempo de prantear, e tempo de dançar;
Tempo de espalhar pedras, e tempo de ajuntar pedras; tempo de abraçar, e tempo de
afastar-se de abraçar;
Tempo de buscar, e tempo de perder; tempo de guardar, e tempo de lançar
fora; Tempo de rasgar, e tempo de coser; tempo de estar calado, e tempo de falar;
Tempo de amar, e tempo de odiar; tempo de guerra, e tempo de paz."
Eclesiastes 3:1-8

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Modelo de ficha utilizada para o teste de comparação pareada.....	21
Figura 2: Modelo de ficha utilizada para os testes afetivos	23
Figura 3: Intenção de compra em porcentagens para as formulações de queijo produzidas com CA e CV.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características físico-químicas do leite	9
Tabela 2: Principais componentes do leite de vaca	10
Tabela 3: Parâmetros analisados na análise físico química do leite e seus resultados	26
Tabela 4: Período necessário para a formação dos primeiros coágulos em 1L de leite a 35 °C e a quantidade de coalho vegetal utilizada	27
Tabela 5: Ingredientes utilizados para a produção dos queijos com CA e CV e rendimento	28
Tabela 6: Valores médios de atributos do teste de aceitação das amostras de queijos produzidas com CA e CV.....	29
Tabela 7: Valores médios obtidos pelo teste do ideal para maciez das amostras de queijos produzidas com CA e CV.....	30
Tabela 8: Médias encontradas em matéria integral para os queijos produzidos com CA e CV em porcentagem e valores de p ($T \leq t$) bi-caudal encontrados no teste t de Student para os parâmetros avaliados e os respectivos coalhos utilizados	31
Tabela 9: Tempo de coagulação e de mexedura para cada tipo de coalho utilizado na fabricação do queijo	32

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

CA – coelho animal;

CV – coelho vegetal,

1. INTRODUÇÃO

Em nosso cotidiano é comum a utilização de diversos tipos de enzimas tanto de origem animal como vegetal na indústria têxtil, farmacêutica e alimentícia, uma vez que estas são de grande importância para que ocorram determinadas reações vitais no organismo humano (VILLALTA, 2015). De modo geral, define-se enzima como uma proteína capaz de acelerar a velocidade de uma reação química diminuindo sua energia de ativação (LIMA et al., 2008) e/ou substâncias orgânicas catalisadoras formadas no interior da célula, mas que também são ativas no ambiente extracelular (ADITIVOS E INGREDIENTES, 2014).

Entre as diversas classificações que as enzimas possuem define-se enzimas proteolíticas como aquelas capazes de quebrar ligações peptídicas de cadeias proteicas, sendo encontradas tanto em animais como vegetais. Nos animais elas participam em vários processos vitais, como por exemplo, coagulação sanguínea, morte celular e hidrólise de proteínas provenientes da alimentação. Já nos vegetais elas relacionam-se no processo de germinação, defesa, morte celular e também no amadurecimento de frutos como as proteinases ficina (figo), bromelina(abacaxi) e a papaína extraída do mamão (LIMA et al., 2008). Quanto a extração de enzimas nos vegetais, está é apenas econômica, uma vez que a mão de obra e os custos são baixos e a quantidade de extração é limitada pois pouca enzima é extraída de uma grande massa vegetal. Comparando com a produção de enzimas animais esta também é limitada, pois é proveniente de subprodutos da indústria de carnes (glândulas e órgãos), com pouca oferta e alto custo (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009).

As enzimas proteolíticas são de grande importância, uma vez que são responsáveis por 60% da venda internacional de enzimas, possuindo uma imensa aplicação comercial/industrial destacando-se no setor farmacêutico como medicamento com ação antiinflamatória, cicatrizante, antimucolítica e também no setor alimentício, sendo amplamente utilizadas como clarificante de cerveja, amaciadores de carne e na produção de queijos (LIMA et al., 2008).

A papaína é uma enzima com alta atividade proteolítica obtida de uma planta herbácea, o mamoeiro, *Carica papaya*, nativo da América Central e cultivada nos países tropicais. É a partir do látex que se obtém a papaína, uma peptidase cisteínica utilizada industrialmente na produção de cosméticos, têxteis, amaciante de carnes e fármacos (XUE et al., 2010) e também é utilizada como coagulante para produção de queijos (DIOUF et al., 2012).

Na produção de queijos, as enzimas são utilizadas como coagulantes causando modificações físico-químicas nas micelas de caseína, transformando o leite no estado líquido para gel. Qualquer tipo de enzima é capaz de coagular o leite, mas existem alguns critérios além do poder coagulante que devem ser atendidos, como a formação de sabor amargo, rendimento, vida útil e valor obtido do soro (FOOD INGREDIENTS BRASIL,2011).

De acordo com a Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ), em 2015, o Brasil produziu aproximadamente 35 bilhões de litros de leite, sendo Minas Gerais o maior estado produtor, com 9,14 bilhões de litros (IBGE, 2015), deste total 24 bilhões de litros foram industrializados, uma vez que 54% foram embalados como leite fluido, em pó, iogurtes e outros e cerca de 46% , ou seja, 11 bilhões de litros foram transformados em queijos.

Segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a população brasileira consome, em média, 4 quilos de queijo *per capita* por ano. Em uma década, a produção aumentou cerca de 86% no Brasil, algo em torno de 745 mil toneladas foram produzidas em 2010, desse total a maior parte se destinou ao consumo interno (BRASIL,2015). Em relação a produtividade, a variedade mais fabricada é o queijo muçarela representando 28,1% do total da produção, requeijão culinário com 18,7%, queijo prato 18,6% , seguido pelo queijo minas frescal 5,2% e *petit suisse* 4,45(SEBRAE, 2014).

1.1. JUSTIFICATIVA

O presente projeto final de curso teve por finalidade avaliar o poder coagulante da enzima proteolítica papaína e sua utilização como coagulante vegetal na fabricação de queijo Minas Frescal. A principal proposta deste trabalho, foi a substituição do coalho animal (quimosina) pela enzima proteolítica papaína, avaliando e comparando as características físico-químicas, sensoriais, rendimento e custo, ampliando assim as pesquisas que envolvam enzimas proteolíticas na indústria alimentícia.

1.2. OBJETIVO GERAL

Produzir e avaliar as características físico-químicas e sensoriais do queijo tipo Minas Frescal elaborado utilizando-se como coagulante a enzima vegetal papaína e comparando-o com queijo minas frescal produzido com a enzima animal (quimosina).

1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade proteolítica da enzima papaína;
- Determinar a força de coagulação da enzima vegetal (papaína) e compará-la com a força de coagulação da enzima animal (coalho);
- Elaborar duas amostras de queijos tipo Minas Frescal, uma utilizando a enzima vegetal papaína e outra a enzima animal quimosina;
- Avaliar e comparar o rendimento, custo e as características físico-químicas (gordura, umidade, cinzas, lipídios e proteínas) das duas amostras;
- Realizar a análise sensorial das amostras elaboradas através dos testes de comparação pareada, teste do ideal e intenção de compra verificando a viabilidade de substituir a enzima animal (coalho comercial) pela enzima vegetal papaína.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. ENZIMAS

Nos organismos vivos ocorrem reações complexas e contínuas, as quais em suas condições normais de temperatura (37°C) são lentas. Entretanto, essas reações ocorrem rapidamente devido a presença de catalisadores, ou seja, as enzimas formadas no interior celular, as quais também possuem ação extracelular. Existem diversos conceitos e definições para a palavra enzima. De modo geral definem-se enzimas como substâncias orgânicas chamadas proteínas, que são moléculas formadas por aminoácidos unidos covalentemente por ligações peptídicas (KIELING, 2002).

Essas proteínas denominadas de enzimas agem como catalisadores específicos nas reações químicas intra e extracelulares, através da diminuição da energia de ativação e aumento da velocidade da reação sem que, no entanto, essa energia seja consumida durante o processo (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2008). Agem em condições moderadas, sendo muito utilizadas nas tecnologias alimentícias, modificando a matéria-prima sem destruir os nutrientes e compostos de grande importância presentes nos alimentos (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2011).

Em 1878, a denominação “enzima” (do grego *ενζυμων*, que significa “levedar”) foi empregada pela primeira vez por Wilhelm Kühne para descrever este fermento. Acreditava-se que estas só possuíam ação em células vivas, o que só foi descomprovado em 1897 por Eduard Buchner, através de seus estudos provando que os extratos das leveduras obtidos por prensagem ainda tinham atividade de fermentação mesmo fora das células (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008)

Quimicamente, definem-se enzimas como proteínas, também designadas de haloenzimas, por sua estrutura química possuir um centro ativo chamado de apoenzima e em alguns casos, um grupo não proteico, a coenzima (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009). Muitas vezes, algumas enzimas não requerem nenhum outro grupo químico além de seus aminoácidos para serem ativadas. Entretanto, algumas necessitam se ligar a componentes químicos de baixo peso molecular ou íons metálicos, os cofatores que podem ser íons inorgânicos como Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} ou Zn^{2+} , ou ainda moléculas orgânicas denominadas de coenzimas para que suas atividades sejam ativadas (FEDATTO, 2004).

O poder catalítico da enzima é semelhante ao que ocorre com os catalisadores inorgânicos por meio da redução da energia de ativação, aumento da velocidade da reação

sem qualquer alteração do equilíbrio termodinâmico. Além disso, deve-se destacar a alta especificidade da enzima em relação tanto ao tipo de substrato quanto ao tipo de reação (LIMA et al., 2001)

Essas enzimas (proteínas) podem ser sintetizadas tanto no interior celular por meio do rompimento da célula, quanto no exterior celular através de meios de cultivos ou propagação celular, possuindo como fonte primária os tecidos animais (glândulas), tecidos vegetais (frutos, sementes) e culturas de microrganismos. A maior parte das enzimas sintetizadas industrialmente é extracelular por conta do seu isolamento facilitado, porém dispendioso, com diversas aplicações na produção, conservação e modificação de produtos alimentícios de origem animal e/ou vegetal e na produção de medicamentos (KIELING, 2002).

2.2. CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS

Segundo a International Union of Biochemistry as enzimas são classificadas em seis grandes classes de acordo com a reação que catalisam (KIELING, 2002).

- 1) Óxido-redutases: catalisam reações de óxido-redução;
- 2) Transferases: catalisam a transferência de grupos de uma molécula para outra;
- 3) Hidrolases: catalisam reações de hidrólise;
- 4) Liases: catalisam reações de clivagem de ligações ou removendo grupos do substrato formando duplas ligações;
- 5) Isomerases: catalisam reações intramoleculares onde um substrato é transformado em um produto isômero;
- 6) Ligases: catalisam a síntese de novos compostos, onde ocorre uma ligação covalente e simultaneamente a quebra de uma ligação com alta energia (degradação da molécula de ATP).

Entre essas classes, destacam-se as hidrolases que catalisam reações de hidrólise, englobando enzimas de baixa especificidade (esterases e tioesterases) e enzimas de alta especificidade como as enzimas glicosílicas (glicosil-fosfatases) e as peptidases que possuem alta atividade proteolítica (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2008).

2.3. PEPTIDASES

As peptidases também denominadas de enzimas proteolíticas ou proteases exercem papel fundamental nas atividades biológicas de todos os seres vivos, uma vez que estão diretamente relacionadas com a síntese de proteínas, degradação proteica, amadurecimento de frutos, digestão e outros (ANRI; MAMBOYA, 2012). Essas substâncias quebram as ligações peptídicas das proteínas formando grupos amina (NH₂) e carboxila (COOH), formando compostos menores e/ou aminoácidos livres (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009).

De acordo com a Enzyme Commission Of International Union of Biochemistry and Molecular Biology –IUMB, as peptidases são classificadas como hidrolases pertencentes à classe 3 e subclasse EC3.4 (peptídeo-hidrolases ou peptidases).

Ainda podem ser classificadas em endopeptidases e exopeptidases, conforme a posição da ligação peptídica a ser quebrada. As endopeptidases hidrolisam ligações internas à cadeia polipeptídica, e as exopeptidases clivam ligações peptídicas próximas à extremidade N-terminal (porção amino) ou C-terminal (porção carboxi) (SALVADORI, 2006). As endopeptidases são subdivididas em serina (EC 3.4.21.), aspárticas (EC 3.4.23), metalo (EC 3.4.24) , treonina (EC 3.4.25) e cisteína-peptidase (EC 3.4.22) (RESENDE; SOCCOL; FRANÇA, 2016)

Na tecnologia de alimentos é viável classificar as proteases em endopeptidases e exopeptidases, uma vez que a aplicação das endopeptidases no processamento alimentício é mais significativa, porém muitas vezes sua atividade é complementada com as exopeptidases. Diversas são as aplicações neste setor, como por exemplo: Biscoitaria, como substituto de agentes redutores; Bebidas: hidrólise da proteína do malte e prevenção de turbidez em cervejas; Laticínios: hidrólise da proteína caseína na fabricação de queijos, e outros (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009).

2.4. PEPTIDASES CISTEÍNICAS

De acordo com González-Rábade (2011) citado por Alves (p.33, 2015), entre as diversas classificações da endopeptidases, as peptidases cisteínicas merecem destaque por apresentar ação em uma grande faixa de pH e temperatura, sendo amplamente utilizadas nas indústrias alimentícia, farmacêutica e biotecnológica. São formadas por um grupo muito diversificado com mais de 130 enzimas presentes distribuídas entre microrganismos, animais

e plantas. Possuem massa de aproximadamente de 24 - 35 kDa, temperatura máxima entre 60-80°C devido a presença das pontes dissulfeto e pH ótimo entre 6,0 - 7,5 (PARKIN, 2010). Foram isoladas de frutos de mamão (papaína), figo (ficina), sementes de girassol e de abacaxi (bromelaína) (SEGUNDO, 1993).

As peptidases cisteínicas correspondem à família da papaína, por terem sido extraída do látex da *Carica papaya*. Também foi a primeira enzima a ter sua estrutura tridimensional determinada (MONTI et al., 2000).

Segundo Van Der Hoorn (2008); Pace; Weerapana (2013), citado por Leite (p.21,2016), o aminoácido cisteína é escasso em cadeias protéicas e forma pontes dissulfetos auxiliando no dobramento da cadeia polipeptídica. Propriedades físico-químicas como catálise redox, catálise nucleofílica, regulação alostérica e outras são conferidas às proteínas devido ao grupamento tiol presente na cadeia lateral do aminoácido. O nucléofilo utilizado durante a proteólise são os resíduos de cisteína (Cys), os quais estão presentes no sítio ativo e são ativados pelo aminoácido histidina.

2.5. PAPAÍNA

A *Carica papaya* é extraída do látex dos frutos do mamoeiro, uma planta herbácea, membro da família *Caricaceae* com origem na América Central e países tropicais, sendo o látex e os frutos os produtos com valor comercial (DREW, 2003).

A enzima proteolítica papaína é um constituinte do látex do fruto verde do mamão, ou seja, é o látex bruto seco em pó. O látex em sua forma fresca possui alta ação proteolítica podendo ter sua atividade interrompida com a oxidação (LIMA et al.,2001).

Segundo Koblitz (2010) citado por Alves (p.34, 2015), a papaína é comercializada em extrato bruto com diversas proteases, principalmente a papaína e a quimopapaína, as quais são muito parecidas variando de acordo com a variedade, condições climáticas e de manejo, métodos de extração e concentrações. Possui alta atividade proteolítica em pH de 5,0 a 9,0, uma vez que para os substratos caseína e albumina, o pH ótimo se encontra na faixa de 7.

As papaínas possuem massa molar na faixa de 20,7 kDa e uma estabilidade térmica que as confere atividades catalíticas em uma ampla faixa de temperatura variando de 4°C até 70°C, dependendo apenas do pH, o qual é crítico em condições de acidez. Seus sítios apresentam os grupos tióis, que são ativos quando se encontram sob a forma reduzida. Desta maneira, as substâncias como o cianeto, a cisteína e o sulfeto, são agentes ativadores,

enquanto agentes oxidantes e metais pesados como Cd^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} são inibidores desta enzima, assim como reagentes que atuam nos grupos SH. Quanto ao pH, este é ótimo em torno de 5,0 variando de acordo com o substrato. A característica mais relevante da papaína é em relação a sua estabilidade térmica, a qual é melhor quando comparada com as demais enzimas proteolíticas, devido a esta ser pH dependente, isto é, perder sua estabilidade em condições de acidez. Como exemplo, tem-se a perda de apenas 20% da ação coagulante do leite após este ter sido submetido a 70°C por 30 minutos. Outra característica a ser destacada é a elevada atividade hidrolítica, atuando tanto em substratos sintéticos (pepsina, tripsina) quanto em peptídeo de baixo peso molecular (LIMA et al., 2001).

Na indústria alimentícia, a papaína e outras peptidases cisteínicas como bromelina e ficina geralmente são utilizadas em diversos setores, como por exemplo, no setor de carnes como amaciantes, sendo aplicadas às carnes que não se tornam suficientemente macias durante a maturação pós-morte, de modo que estas enzimas hidrolisam as proteínas do tecido conjuntivo (colágeno e elastina) responsável pela rigidez da carne. Apesar de ser uma boa alternativa esta técnica apresenta alguns inconvenientes, uma vez que a concentração utilizada não pode ser muito alta, e o padrão de amaciamento difere muito do que ocorre na carne maturada naturalmente. Outra aplicação para a papaína é no setor de bebidas, como clarificantes de cervejas, devido a um defeito que ocorre durante o armazenamento prolongado causado pela associação de proteínas a taninos, denominado de turvação por resfriamento. Neste caso, adiciona-se as endopeptidases após a fermentação e antes da última filtragem, pois estas devem ser destruídas pela pasteurização para não agir excessivamente causando a perda de estabilidade da espuma (PARKIN, 2010).

Com o aumento da produção mundial de queijos, a procura por substituintes do coalho animal aumentou devido ao seu elevado custo de extração e pela redução de animais disponíveis (ADITIVOS E INGREDIENTES, 2011). As enzimas, independente do seu tipo, são uma alternativa viável empregada como um destes substituintes coagulantes do leite na produção de queijos, por serem facilmente aceitas pelos consumidores e aprovados para comercialização, porém possuem pouca utilização industrial e relatos literários (PEREIRA et.al, 2010). As enzimas são extraídas de diversos tipos de vegetais, como por exemplo, bromelina, alcachofra, figos, abacaxi e outros. Logo, para serem utilizadas como coagulantes estas devem se adequar a alguns critérios como: rendimento da fabricação, formação de sabor amargo, valor obtido no soro, vida útil e outros (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2011).

3. PRODUÇÃO DE QUEIJOS

3.1. LEITE

Segundo a Instrução Normativa nº 62 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), leite é o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições higiênicas, de vacas saudáveis, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2011).

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite Cru Refrigerado contido na Instrução Normativa n. 51 (BRASIL, 2002), o leite cru refrigerado deverá atender os requisitos físico-químicos de gordura (mínimo de 3g/100g), densidade relativa a 15 °C (1,028 a 1,034 g / 100 mL), acidez titulável (0,14 a 0,18 g de ácido láctico / 100 mL), extrato seco desengordurado (mínimo de 8,4g /100 g), índice crioscópico (máximo de -0,530 °H) e proteína (mínimo de 2 g/100 g) e demais características conforme a tabela 1.

O leite de vaca deve possuir as seguintes características físico-químicas, em média:

Tabela 1: Características físico-químicas do leite

pH	6,6 - 6,9
Acidez	10 - 17°D
Densidade	1,023- 1,040 g/mL
Pressão Osmótica	700kPa
Ponto de Congelamento	-0,530°H
Calor específico	100°C
Tensão Superficial	55,3mN/m
Viscosidade	1,631mPa
Força iônica	0,08 M
Atividade de Água	0,993

O leite é formado por diversos compostos sólidos em água, sendo os principais os lipídios, vitaminas, carboidratos, sais minerais e proteínas os quais representam cerca de 12-13% e a água 87%, mas sua composição pode variar devido a diversos fatores como estágio de lactação, raça das vacas, ambiente, forma de manejo, alimentação, intervalo entre as ordenhas e outros (BRITO et al., 2018).

Tabela 2: Principais componentes do leite de vaca

Componente	Percentual no leite
Água	86,0 a 88,0
Sólidos Totais	12,0 a 14,0
Gordura	3,5 a 4,5
Proteína	3,2 a 3,5
Lactose	4,6 a 5,2
Minerais	0,7 a 0,8

Fonte: Noro (2001)

A água é o constituinte presente em maior quantidade, e que possui maior importância, pois nela encontram-se dissolvidos os demais componentes. Encontra-se tanto na forma de água livre como na forma ligada a outras substâncias como proteínas, minerais, lactose e outros (SILVA, 1997).

A gordura do leite ocorre em pequenos glóbulos formados principalmente de triacilgliceróis envolvidos por fosfolípidios que mantêm a gordura do leite na forma de suspensão, evitando que os glóbulos se unam. É a fração constituinte do leite que mais sofre variação (3,5-3,3%) em razão da alimentação, raça, estágio de lactação e outros (BRITO et al., 2018).

A lactose é o carboidrato principal do leite com uma concentração em torno de 4,6-4,9%. É um dissacarídeo composto pelos monossacarídeos D-glicose e D-galactose, ligados por ponte glicosídica β -1,4. É o componente que tem menor variação em sua quantidade em função de fatores ambientais devido a relação entre a síntese de lactose e a quantidade de água drenada para. Outros glicídios podem ser encontrados no leite, porém em concentrações baixas, tais como galactose, amino-açúcares, açúcar-fosfatos, oligossacarídeos e açúcares nucleotídicos. O cálcio e o fósforo são os principais minerais encontrados no leite e estão associados com a estrutura das micelas de caseína (GONZÁLEZ, 2001).

A concentração das proteínas no leite variam de 3 a 4%, relacionando diretamente com a quantidade de gordura, isto é, quanto maior o teor de gordura no leite, mais alta será a quantidade de proteína (WATTIAUX,1998). Com o aumento do teor protéico, tem-se também aumento da produção total do leite (e isso não é válido quando se tem o aumento do teor de gordura). A concentração de proteínas vai depender, além das características físicas do

animal, da fase de lactação em que ele se encontra, sendo menor no início e aumentado após três meses (CARVALHO et al., 2002).

Separa-se as proteínas do leite em dois grupos: as caseínas (alfa, beta, gama e kappa) que representam cerca de 75-85% e as proteínas do soro como β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, soroalbumina bovina e imunoglobulinas que constituem aproximadamente 15 a 22% das proteínas totais do leite (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2014).

A caseína é a proteína que sofre a ação do coalho na fabricação de queijos, estando presente no leite em suspensão, na forma de micelas, a qual precipita-se, formando-se os coágulos. O teor de proteínas é de fundamental importância na indústria queijeira, principalmente o teor de caseínas, pois quanto maior for o teor desta, maior será a quantidade de queijo produzido para cada litro de leite (MILKPOINT, 2013).

3.2. QUEIJOS

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Queijos, define-se queijo como um produto fresco ou maturado obtido por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactéria específica, de ácido orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes (BRASIL, 2000).

A história do queijo teve seu início em um passado remoto da civilização antiga, há cerca de 6000-7000 anos antes de Cristo, na região entre os rios Eufrates e Tigre. Diversos são os relatos encontrados sobre a fabricação de queijos em murais e tumbas egípcias com cenas da produção e imagens de cabras transportando sacos de pele pendurados, nos quais se armazenava leite, e ali mesmo tinha-se a ocorrência da fermentação dos açúcares e seu contato com as enzimas presentes no couro resultando em uma coalhada. Com a agitação causada durante o transporte, tinha-se o rompimento da coalhada e a separação do soro, denominado queijo primitivo. Posteriormente, salgava-se essa coalhada servindo-a como alimento protéico e o soro como uma bebida (CHALITA et al., 2009).

Diversas são as citações do queijo em passagens bíblicas do Velho Testamento, porém a descoberta do queijo é atribuída aos gregos, especificamente à Aristeu, rei da Arcádia filho de Cirene e Apolo (PERRY, 2004). Os gregos são também considerados os pioneiros de

produzir queijos utilizando leite de cabras e ovelhas, introduzindo-os em seu cardápio. Quanto à difusão do queijo, os romanos que a fizeram através da expansão do seu império, comercializando-o através de rotas marítimas, fazendo que o imperador estabelecesse um preço máximo para o produto, o qual era servido tanto nas refeições dos nobres quanto dos soldados e atletas. O nome “queijo”, de *formatium* que significa “queijo colocado na forma” surgiu na Idade Média quando mosteiros transformaram a fabricação de queijo em uma arte utilizando altos padrões de higiene. Com a grande difusão pelos países e as diferenças de clima e terreno surgiram novas técnicas de produção e diferentes variedades de queijos que se alastraram ainda mais com o surgimento das feiras e mercado nos séculos XIV e XV (CHALITA et al., 2009).

Segundo Fox et al. (2000) citado por Paula et al. (p.34, 2009) a arte de produzir queijos foi realmente colocada em prática com o advento dos feudos e monastérios que possuíam a “receita” de fabricação que era passada para as próximas gerações. Novas variedades de queijo surgiam, apresentando características específicas e originadas da mesma matéria-prima, fato este que pode ser explicado pela auto-suficiência e pouca troca de informações das comunidades produtoras. Geralmente, o surgimento das diversas variedades de queijo é decorrente de acidentes causados por determinados fatores como composição do leite, raça do animal, microbiota endógena, ou ainda, por fatores relacionados à produção ou armazenamento.

A ampla diversidade dos tipos de queijos se deve aos diferentes tipos de climas, variações no leite, métodos de processamento e tempo de maturação, embora o processamento básico de fabricação seja comum a quase todos. Existem cerca de 1.000 tipos de queijos, sendo que só na França fabricam-se 400 deles (PERRY, 2004).

3.3. QUEIJO MINAS FRESCAL

O queijo Minas Frescal é regulamentado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) pela Portaria nº 352 de 04 de setembro de 1997 e complementado pela Instrução Normativa nº 4, de 01 de março de 2004.

Define-se este tipo de queijo, como um produto fresco “obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas”, sendo classificado como um queijo

semigordo (apresentando entre 25-44,9% de gordura na matéria seca) e como de muita alta umidade (com o mínimo de 55%) pela Portaria nº 352/97 (BRASIL, 1997).

De acordo com a Associação Brasileira da Indústria de Queijos (ABIQ), o queijo Minas Frescal é o terceiro tipo de queijo mais produzido no Brasil, atrás apenas dos tipos mussarela e prato (ABIQ, 2014).

3.4. COAGULAÇÃO E MÉTODOS

A principal etapa para a produção de queijos é a coagulação do leite, que transforma o leite no estado líquido em gel, por meio de modificações nas micelas de caseínas por meio de enzimas ou acidificações (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2011).

Os queijos podem ser obtidos por coagulação ácida, enzimática ou mista. A coagulação ácida é obtida por acidificação com ácido orgânico, ou por adição de culturas produtoras de ácido lático, diminuindo o pH do leite, determinando a solubilização dos sais cálcio e fosfato das micelas de caseínas para a fase aquosa, com desmineralização das caseínas que é total no seu ponto isoelétrico, pH 4,6 (ORDÓÑEZ, 2005).

A coagulação enzimática é o processo mais utilizado na fabricação de queijos, devido ao seu maior rendimento, ocorrendo próximo ao pH do leite. Ao adicionar uma enzima proteolítica ao leite, como por exemplo, a quimosina, esta cliva a k- caseína expondo as demais caseínas, que na presença do cálcio coagulam (AQUARONE, 2001).

Ao comparar a atividade da enzima quimosina com outras enzimas de origem vegetal, animal ou microbiana constata-se que estas possuem maior ação proteolítica causando diminuição do rendimento, formação de sabor amargo e amolecimento do queijo no período de armazenamento (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2011).

Divide-se a coagulação em três fases (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2011):

- 1ª fase: A enzima coagulante ataca a camada externa da caseína, denominada de k- caseína, liberando uma fração protéica (caseína macropeptídeo) solúvel que se perde no soro, afetando assim o rendimento.

Quando se utiliza outras enzimas diferentes da quimosina, obtém-se uma proteólise muito elevada nesta fase, com a quebra de várias ligações peptídicas e uma alta solubilização das proteínas que serão perdidas no soro, resultando em coágulos com ligações muito fracas, ocorrendo perdas de sólidos para o soro da fabricação, reduzindo o rendimento da produção.

- 2ª fase: formação do gel de coalhada onde todos os componentes (proteínas, gordura, lactose e sais minerais) são aprisionados em uma estrutura de gel, a qual após o processo de corte e demais tratamentos dão origem aos queijos.

- 3ª fase: a enzima participa da etapa de maturação do queijo, e sua elevada ação proteolítica pode levar à formação do sabor amargo.

3.5. COALHOS

Existe uma diferença na definição de coalhos e coagulantes. Define-se como coalho as enzimas de origem animal (quimosina e pepsina), ricas em proteinases ácidas obtidas do quarto estômago de ruminantes e como coagulantes toda e qualquer tipo de enzima com capacidade de coagular o leite obtida de meios diferentes do coalho, como por exemplo, de meios microbianos e vegetais (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2011).

O tipo de coagulante utilizado na produção de queijo é um fator determinante, pois juntamente com as enzimas produzidas por bactérias (láticas ou não), as enzimas com ação coagulante influenciam na degradação protéica, uma vez que algumas possuem maior ação proteolítica que a outra (VIEIRA, 2010).

O coalho exerce ação proteolítica principalmente sobre a caseína e em outras proteínas, mas em menor extensão. Possui duas ações fundamentais, a primeira é desestabilizar as micelas de caseína, rompendo a fração k, ligando os aminoácidos fenilalanina e metionina. A outra função é a hidrólise dessas ligações em uma ordem específica, logo depois da coagulação, mas também atuam durante a etapa de maturação podendo causar o desenvolvimento do sabor amargo (ADITIVOS E INGREDIENTES, 2011).

3.5.1. COALHO ANIMAL

De acordo com Rogelj et.al (2001) citado por Camisa (p.8, 2011), o coalho obtido do estômago de ruminantes (abomaso), o qual constitui-se das enzimas proteolíticas quimosina e pepsina é o mais utilizado para a fabricação de queijos. A proporção destas enzimas varia de acordo com idade do animal, sendo que a quimosina é o principal constituinte do vitelo e em animais adultos o maior constituinte é a pepsina.

3.5.2. COALHO MICROBIANO

As enzimas microbianas fúngicas *Rhizomucor pusillus*, *Rhizomucor miehei* e *Cryphonectria parasitica* são uma alternativa como substitutos de renina, devido à escassa produção de coagulantes de origem animal e o grande crescimento da produção leiteira (AUGUSTO, 2003).

Todos os coagulantes microbianos utilizados na fabricação de queijos são de origem “fúngica”. Os tipos de proteases que constituem o grupo de coalhos microbianos, são as proteases aspárticas, que possuem uma elevada ação proteolítica e baixa especificidade sendo muitas vezes inadequadas para a fabricação de alguns tipos de queijo (ANTUNES et al., 2004).

3.5.3. COALHO VEGETAL COMPLETAR

O primeiro coagulante de origem vegetal foi o látex da figueira (*Ficus carica*) pois há relatos da existência desta árvore desde a antiguidade. Muitos extratos vegetais são capazes de coagular o leite, entretanto existem alguns que são excessivamente proteolíticos como a papaína da *Carica papaya* e a bromelina do *Ananas sativa*. (BASSO; SEOLIN, s/d).

Várias enzimas de origem vegetal já foram testadas como coagulantes de leite, sendo o extrato de *Cyanara cardunculus*, composto pela enzima cinarase denominado de “cardo” o mais conhecido e utilizado em Portugal, porém não disponível e pouco conhecido no Brasil (ANTUNES et al., 2004).

Esses tipos de coagulantes são excessivamente proteolíticos ocasionando problemas de rendimento no queijo, perda de gordura no soro e defeitos indesejáveis de sabor no produto final (DORNELLAS, 1997)

3.6. PRODUÇÃO DE QUEIJOS

A fabricação de queijos é um processo de concentração dos componentes sólidos (proteína e gordura) do leite na coalhada, e expulsão de lactose, sólidos solúveis, vitaminas, sais minerais e proteínas no soro. O soro resulta aproximadamente de 85 a 90% do volume de leite utilizado na fabricação de queijos, o qual corresponde a porção aquosa que separa-se da massa (PAULA, et.al, 2009).

A tecnologia básica de produção de queijos consiste em (PERRY, 2004):

1. Coagulação do leite: por meio de adição de coalhos ou pela flora microbiana natural do leite. Após um tempo, o leite transforma-se em um gel, a coalhada;
2. Corte da coalhada: liberação do soro;
3. Enformagem da massa, e prensagem, dependendo do tipo de queijo;
4. Salga e, em seguida, embalagem.

3.6.1. FABRICAÇÃO DO QUEIJO MINAS FRESCAL

Pasteurização do leite e aquecimento a 35°C



Adição de cloreto de cálcio e ácido lático



Adição do coalho



Coagulação



Corte da Coalhada



Repouso – 3 minutos



Mexedura



Dessoragem



Enformagem



Viragem



Salga



Embalagem

Fonte: Adaptado de Monteiro, Pires e Araújo (2012)

Fatores como tipo do coalho utilizado e a qualidade da matéria-prima são determinantes para as características do produto final. O coalho tem ação sobre as proteínas, hidrolisando-as e formando as redes protéicas, uma vez que quando essas ocorrem excessivamente podem afetar o rendimento da produção, diminuindo-o, apresentando sabor amargo, o que não é desejável e diminuindo a vida útil do produto, sendo que no caso do Minas Frescal que é um produto com cerca de 10 dias de validade quando não se tem conservantes adicionados, isso se torna um problema (FOX, LAW, 1991; FOX, 1997).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no setor de Laticínios e no Laboratório de Bromatologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – *Campus* Inconfidentes-MG, no período de outubro a dezembro de 2017.

4.1. ORIGEM E PREPARO DA ENZIMA

A enzima papaína foi obtida mediante compra em comércio Online (www.mercadolivre.com.br), sendo da Marca PROQUÍMIOS. Foram comprados 3 frascos contendo 100g de papaína cada, a qual possui seguinte especificações de acordo com o rótulo:

Aspecto: pó fino branco-amarelado

Odor: característico

Solubilidade: solúvel em água formando solução mais ou menos opalescente, praticamente insolúvel em álcool, em clorofórmio, em éter

Cor da solução (5%, 440 nm): 0,055-0,125

pH (sol 2% a 25°C): 5,0-6,6

Perda por dessecação: máx 7,0%

Potência: 332 a 367

O extrato da papaína foi preparado adicionando-se água (em média 1mL/1g) destilada até total homogeneização, dissolvendo todos os grumos formados.

4.2. ORIGEM E ANÁLISE DO LEITE

O leite utilizado tanto para os testes de coagulação quanto para a fabricação dos queijos Minas Frescal foi proveniente do setor de bovinocultura de leite e disponibilizado pelo setor de Laticínios do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – *Campus* Inconfidentes.

As características físico-químicas do leite foram analisadas com o auxílio do aparelho Milk Analyzer Master. Foram realizadas análise de: temperatura, gordura, sólidos não-gordurosos (SNG), densidade, proteína, lactose, sais, água adicionada, ponto de congelamento, condutividade e pH.

4.3. ANÁLISE DO PODER COAGULANTE

O teste da força do coalho baseia-se na determinação do tempo de coagulação de um volume de leite à 35°C, por uma quantidade de coalho conhecida.

O tempo de coagulação dos queijos fabricados no Laticínio do IFSULDEMINAS-Campus Inconfidentes é de aproximadamente 40 minutos. Logo, utilizou-se esse tempo de coagulação como referência para o queijo produzido com coalho vegetal.

A análise de poder coagulante foi realizada testando-se determinadas quantidades da enzima papaína (0,2g;0,4g;0,6g; 0,8g e 1,0 g) necessários para coagular 1000 mL de leite.

Previamente, aqueceu-se o leite a 35°C em banho maria e adicionou-se as quantidades determinadas da enzima, diluindo-a em água destilada (quantidade suficiente somente para solubilização). Logo, marcou-se com cronômetro o tempo em que o coalho foi adicionado ao leite, até que aparecessem pequenos flocos de leite coagulado. Anotando este tempo para efeitos de cálculo.

4.4. FABRICAÇÃO DOS QUEIJOS MINAS FRESCAL E RENDIMENTO

As duas formulações de queijo utilizando coalho vegetal (CV) e coalho animal (CA) foram produzidas no mesmo dia, utilizando o mesmo leite e as mesmas quantidades de cloreto de cálcio e ácido láctico, diferenciando-se apenas no tipo de coalho utilizado. Utilizou-se como coalho animal, o coalho em pó da Marca Bela Vista com poder coagulante de 1:90:000, e como coalho vegetal o extrato coagulante papaína.

Para cada tipo de coalho foram utilizados 100 L de leite. Primeiramente, pasteurizou-se o leite a 72°C por 15 segundos com objetivo de eliminar os microrganismos patogênicos e parte dos deteriorantes.

Após a pasteurização, o leite foi aquecido com vapor indireto, a 35°C, em tanque de aço inox de camisa dupla, com capacidade para 500L. Ao atingir os 35°C, foram adicionados 40mL de cloreto de cálcio e 25mL de ácido láctico diluído em 25mL de água, agitando-se o leite para total homogeneização dos ingredientes. Em seguida, para o queijo tradicional, feito com coalho de origem animal, adicionou-se 2g do coalho diluído em 200mL de água conforme recomendação do fabricante e, para o queijo fabricado com coalho vegetal, foram adicionados 37,5g do coagulante papaína (quantidade estabelecida pelo teste de poder coagulante) diluído em 100mL de água destilada. Agitou-se rapidamente para a

homogeneização. Após a coagulação, as massas foram cortadas com o auxílio de uma lira em cubos grandes com 1,5-2,0 cm de aresta, permanecendo em repouso por 3 minutos. Logo, iniciou-se a mexedura com o objetivo de retirar parte do soro da massa (sinérese). Parte do soro foi descartado, e as massas foram colocadas em formas plásticas próprias para queijo Minas Frescal. Após 10 minutos os queijos foram virados e colocados em câmara fria até o dia seguinte, sendo então colocados na salmoura com concentração de 22% de sal por 30 minutos. Após esse procedimento, os queijos foram pesados para obtenção do rendimento da produção de cada coalho, e posteriormente embalados à vácuo em embalagens plásticas adequadas.

4.5. CUSTO

O custo da produção foi determinado em R\$/Kg somando-se os valores de todos ingredientes e embalagens utilizados nas duas formulações, acrescentando-se o valor de 30% o qual corresponde a mão de obra, energia e água, dividindo-se o valor obtido pelo rendimento. Para determinar o valor de venda do queijo, baseou-se na diferença entre o valor da fabricação e o valor que é vendido o quilo do produto para a Cooperativa do Instituto.

4.6. ANÁLISE SENSORIAL

A avaliação sensorial foi realizada no IFSULDEMINAS- Campus Inconfidentes, em cabines individuais, com 60 consumidores no teste comparação pareada e 80 consumidores nos demais testes, sendo estes 47 mulheres e 33 homens não treinados com idade entre 15 e 60 anos.

Os consumidores foram instruídos a analisar as amostras da esquerda para a direita, enxaguando a boca com água entre cada avaliação

Em todos os testes realizados, as amostras foram apresentadas alterando a ordem entre elas, nas permutações AB e BA (IAL, 2008). Também foram codificadas com códigos aleatórios de 3 dígitos e servidos em bandejas brancas de isopor.

A avaliação sensorial das amostras foi realizada no dia seguinte após a produção. Para a análise as amostras de queijos foram cortadas em cubos de 1,5 cm de aresta e mantidas resfriadas até o momento da análise.

Foi realizado o teste de comparação pareada que possui caráter discriminativo, sendo utilizado quando se quer detectar pequenas diferenças entre amostras quanto a um atributo específico ou estabelecendo a existência de uma preferência. As duas amostras foram apresentadas no mesmo momento com a intenção que o julgador identificasse a amostra codificada que apresenta o atributo específico diferente ou a amostra preferida, sendo a probabilidade de acertos de 50% ($p = 1/2$) (IAL,2008). Neste caso, o provador devia identificar a amostra que apresentasse maior amargor.

COMPARAÇÃO PAREADA	
Nome:	Idade:
Por favor, prove as amostras da esquerda para a direita e circule o código da amostra que você julgar como sendo a de maior gosto amargo. Tome água entre as avaliações e aguarde 30 segundos.	
_____	_____

Figura 1: Modelo de ficha utilizada para o teste de comparação pareada

Fonte: (ABNT, NBR 13088, 1994)

Também foram realizados testes de aceitação com o objetivo de medir a opinião dos provadores em relação as suas preferências e gostos..

No teste de aceitação utilizando escala hedônica o provador relata o grau de gostar ou de desgostar de um determinado produto, de modo geral ou em relação a um fator específico. Para a determinação da aceitabilidade de cada amostra, avaliou-se aparência, aroma, sabor, textura e impressão global em escala hedônica de 9 pontos com os extremos de “desgostei muitíssimo” a “gostei muitíssimo” (STONE & SIDEL, 2004).

Quanto ao teste do ideal, o consumidor expõe quão ideal o produto está em relação à intensidade de uma característica específica, neste caso a maciez. O teste de escala de intenção tem como objetivo saber do provador sua vontade de consumir, comprar ou adquirir o que está sendo ofertado. A intenção de compra foi avaliada utilizando-se escala de cinco pontos variando de “certamente não compraria” a “certamente compraria” (MEILGAARD et al., 1999). Os dados referentes a aceitação e teste do ideal de cada amostra

foram submetidos ao teste de t de Student a nível de 5% de probabilidade. Gerou-se um histograma de distribuição de frequência para os dados de Intenção de compra.

Os resultados das análises sensoriais, teste de escala hedônica e ideal foram avaliados estatisticamente no programa Sensomaker, pelo teste t de Student a nível de 5% de probabilidade. No teste de comparação pareada os resultados obtidos foram analisados a 5% de probabilidade, comparando-se o número de acertos com o valor tabelado referente à 60 provadores, e no do teste de aceitação avaliou-se a intenção dos julgadores pela frequência através de gráficos.

Nome:	Idade:
<p>Por favor, avalie as amostras de queijo minas frescal da esquerda para a direita, utilizando a escala abaixo, e responda o quanto você gostou ou desgostou do produto. Marque a posição que melhor reflita seu julgamento. Tome água entre as avaliações.</p>	
Código: _____	
_____ Aparência	9 - Gostei extremamente
_____ Aroma	8 - Gostei muito
_____ Sabor	7 - Gostei moderadamente
_____ Textura	6 - Gostei ligeiramente
_____ Impressão Global	5 - Indiferente
	4 - Desgostei ligeiramente
	3 - Desgostei moderadamente
	2 - Desgostei muito
	1 - Desgostei extremamente
<p>Indique a sua intenção de compra em relação ao produto avaliado.</p>	
<input type="checkbox"/> Certamente compraria <input type="checkbox"/> Provavelmente compraria <input type="checkbox"/> Talvez compraria <input type="checkbox"/> Provavelmente não compraria <input type="checkbox"/> Certamente não compraria	
<p>Indique o quão próximo do ideal encontra-se a maciez do queijo:</p>	
<input type="checkbox"/> extremamente mais macio que o ideal	<input type="checkbox"/> muito mais macio que o ideal
<input type="checkbox"/> moderadamente mais macio que o ideal	<input type="checkbox"/> ligeiramente mais macio que o ideal
<input type="checkbox"/> Maciez ideal	
<input type="checkbox"/> ligeiramente menos macio que o ideal	<input type="checkbox"/> moderadamente menos macio que o ideal
<input type="checkbox"/> muito menos macio que o ideal	<input type="checkbox"/> extremamente menos macio que o ideal

Figura 2: Modelo de ficha utilizada para os testes afetivos

Fonte: (ABNT, NBR 14141, 1998)

4.7. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

As análises centesimais foram realizadas com o objetivo de comparar o queijo produzido com coalho vegetal (papaína) com o queijo produzido com o coalho animal.

Os cálculos das análises centesimais dos queijos produzidos com CA e CV foram realizados com o software Microsoft Office[®] Excel 2007 e comparados entre eles pelo teste t de *Student* a 5% de probabilidade. Verificou-se também se os dados obtidos estão de acordo com o previsto pela legislação, comparando-os.

4.7.1 UMIDADE

Para determinar a umidade utilizou-se o método gravimétrico 31.1.02 da AOAC (2005), com o uso de calor, onde perde-se água pelo aquecimento da amostra, a 105 °C, até a matéria atingir peso constante.

4.7.2. CINZAS

A determinação das cinzas (resíduo mineral fixo) foi realizada pelo método 31.1.04 da AOAC (2005), utilizando a mufla com temperatura de 550 °C, até peso constante.

4.7.3. PROTEÍNAS

A proteína bruta foi obtida pelo método de Kjeldahl, de acordo com método 31.1.08 da AOAC (2005). Primeiramente realiza-se a etapa de digestão da amostra com a mistura catalítica e ácido sulfúrico, em seguida a etapa de destilação e titulação com solução de ácido clorídrico (0,02 M). O fator de conversão de nitrogênio em proteína utilizado foi de 6,38 que é o valor determinado para leite e derivados (CARVALHO et al., 2002; IAL,2008).

4.7.4. LIPÍDIOS

Para a determinação dos lipídios (extrato etéreo), foi utilizado o método 31.4.02 de Soxhlet (gravimétrico), que implica na perda parcial de peso da amostra submetido à extração com éter de petróleo (AOAC, 2005).

4.7.8. DETERMINAÇÃO DE LIPÍDIOS EM QUEIJO

O teor de lipídios de cada amostra de queijo produzida com CA e CV foi determinado de acordo com a metodologia do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Instrução Normativa nº68 (BRASIL,2006).

A análise dos resultados obtidos do teor de lipídios dos queijos produzidos com CA e CV foram realizados com o software Microsoft Office[®] Excel 2007 e comparados entre eles pelo teste t de *Student* a 5% de probabilidade

5. ANÁLISE DE DADOS

5.1. ANÁLISE FÍSICO - QUÍMICA DO LEITE

Tabela 3: Parâmetros analisados na análise físico química do leite e seus resultados

Parâmetros	Resultados
Temperatura	22,9°C
Gordura	6,82%
SNG	8,39%
Densidade	27,71
Proteína	2,93%
Lactose	4,65%
Sais	0,74%
Água Adicionada	0,00%
Ponto de Congelamento	-0,564
Condutividade	5,4
pH	6,53

O leite analisado está de acordo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite Cru Refrigerado contido na Instrução Normativa n. 51, estando apto a ser utilizado (BRASIL, 2000).

5.2. PODER COAGULANTE

Por meio do método de determinação do poder coagulante, foi possível estabelecer o tempo necessário para coagular 1 litro de leite utilizando 1mL de coagulante.

Nos testes 0, 1 e 2 utilizando-se 0,2; 0,4 e 0,6 gramas do CV não ocorreu coagulação. No teste utilizando-se 0,8g de CV o processo de coagulação ocorreu, mas num período de tempo muito maior se comparado com a coagulação utilizando CA que ocorre em aproximadamente 40 minutos.

No teste 4, foi utilizado 1,0g do CV e a coagulação do leite ocorreu em aproximadamente 15 minutos, sendo possível determinar a quantidade de coalho utilizada e a força do coalho.

Tabela 4: Período necessário para a formação dos primeiros coágulos em 1L de leite a 35 °C e a quantidade de coalho vegetal utilizada

Teste	Quantidade de coalho (g)	Período para coagulação (minutos)
0	0,2	-
1	0,4	-
2	0,6	-
3	0,8	Maior que 80
4	1,0	15

Fonte: próprio autor, 2018

Cálculo Poder Coagulante

$$V = C \times T \times 2,5$$

Cálculo da Força do Coalho

$$F = 40.000 / C \times T$$

Onde:

V- mL ou g de coalho utilizado para coagular 100 L de leite ml ou g de coalho a em 40 min, a 35 graus °C

C – quantidade de coalho utilizado

T- tempo de coagulação (minutos)

De acordo com os cálculos realizados utilizando-se 1g do CV (teste 4), obteve-se o volume de 37,5g de papaína para coagular 100 L em aproximadamente 40 minutos. Determinou-se também, a força do coalho para o CV obtendo-se 1:160.000; enquanto a proporção para o CA utilizado é de 1:90.000 conforme o rótulo.

5.3. RENDIMENTO

Utilizou-se aproximadamente 7,5L de leite para cada quilo de queijo com CA, enquanto para o queijo com CV foram necessários 6,4L para cada quilo, apresentando assim menor rendimento o queijo preparado com CA.

Tabela 5: Ingredientes utilizados para a produção dos queijos com CA e CV e rendimento

Tipo de coalho	Quantidade de leite (L)	Quantidade de ácido láctico (mL)	Quantidade de cloreto de cálcio(mL)	Quantidade de coalho (g)	Rendimento (Kg)
CA	100	25	40	2	13,3
CV	100	25	40	37,5	15,6

Fonte: Próprio autor, 2018

De acordo com o valor de p ($T \leq t$) para o rendimento, que é 0,028, consta-se que houve diferença estatística através do teste t de *Student* (para duas amostras presumindo variâncias diferentes) ao nível de 5% de probabilidade, pois o valor de p é menor que 0,05.

A diferença observada no rendimento pode estar relacionada com o maior poder coagulante apresentado por CV (1:160.000) quando comparado com o poder coagulante de CA (1:90.000). Uma vez que o CA apresenta menor poder coagulante, a rede tridimensional protéica formada durante a etapa de coagulação é menor, formando menos massa, implicando assim em um menor rendimento.

5.4. CUSTO

O preço do quilo do Minas Frescal já produzido com CA é vendido na COOPEAFI por R\$ 17,25. O custo de fabricação do quilo do queijo Minas Frescal produzido com CA é de R\$ 15,50, onde a soma do preço dos ingredientes e da embalagem utilizados foi de R\$ 13,00 para cada quilo.

Para o queijo produzido com CV, o preço dos ingredientes e da embalagem utilizados foi de R\$ 13,05 para cada quilo. A este valor foi acrescentado o valor de custo encontrado para a fabricação do queijo com CA.

O valor de venda para o queijo produzido com CV será o mesmo que o do queijo produzido com CA.

5.5. ANÁLISES SENSORIAIS

Dos 60 julgamentos obtidos pelo teste de comparação pareada obteve-se 54 números de maior marcação e apenas 6 números de menor marcação. Como o número de maior marcação é maior que 39 (o número mínimo tabelado para que as amostras sejam ditas diferentes), conclui-se que as amostras diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade, apresentando maior amargor a formulação produzida com CV.

As médias das notas atribuídas pelos consumidores para os atributos avaliados no teste de escala hedônica estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Valores médios de atributos do teste de aceitação das amostras de queijos produzidas com CA e CV

Amostra	Aparência	Aroma	Textura	Sabor	Impressão Global
CA	8,08 a	7,38 a	7,94 a	7,81 a	8,01 a
CV	7,48 b	6,02 b	5,93 b	3,60 b	5,22 b

As médias seguidas pela mesma letra, numa mesma coluna, não diferem entre si $p \leq 0,05$ pelo teste t de Student.

Observa-se que para todos os atributos avaliados a amostra produzida com CA obteve a maior média, possuindo diferença significativa entre as amostras produzidas com CA e CV em todos atributos analisados.

Em relação ao atributo sabor, pode ser observado uma maior diferença entre os valores, devido a presença do sabor amargo do queijo produzido com CV.

O sabor amargo pode ser causado por diversos fatores como qualidade do leite, qualidade do coalho (presença de impurezas), temperatura de pasteurização (maior que 73°C, maior teor de coalho retido na massa), acidez do leite (maior acidez, retenção maior do coalho na massa), tipo e dose de coalho, além do acúmulo dos peptídeos hidrofóbicos que podem ser decompostos, em determinadas condições, em outros compostos de menor peso molecular, como por exemplo, os aminoácidos que não possuem gosto amargo (CIÊNCIA DO LEITE, 2008).

As amostras de queijos produzidas com CA e CV foram avaliadas em relação à maciez em escala do ideal.

Tabela 7: Valores médios obtidos pelo teste do ideal para maciez das amostras de queijos produzidas com CA e CV.

Amostra	Média
CA	0,12 a
CV	0,09 a

No atributo maciez, as amostras não diferiram estatisticamente entre si.

A intenção de compra para cada amostra de queijo foi analisada levando-se em conta os parâmetros certamente compraria, provavelmente compraria, talvez compraria, certamente não compraria e provavelmente não compraria, os resultados em porcentagem são apresentados na Figura 3.

Os resultados de intenção de compra demonstraram que a amostra de queijo produzida com CA obteve a maior frequência de intenção de compra positiva, correspondendo as respostas “certamente compraria” e “provavelmente compraria”, totalizando 51,25% e 36,25%, respectivamente. A indecisão na intenção e compra, representada pelo termo “talvez compraria, apresentou resultados bem próximos, 11,25% para CA e 12,50% para o CV. Quanto a intenção de compra negativa correspondendo às atitudes de compra “certamente não compraria” e “provavelmente não compraria, o queijo produzido com CV obteve a maior intenção de compra negativa, totalizando 45% e 32,50 % respectivamente.

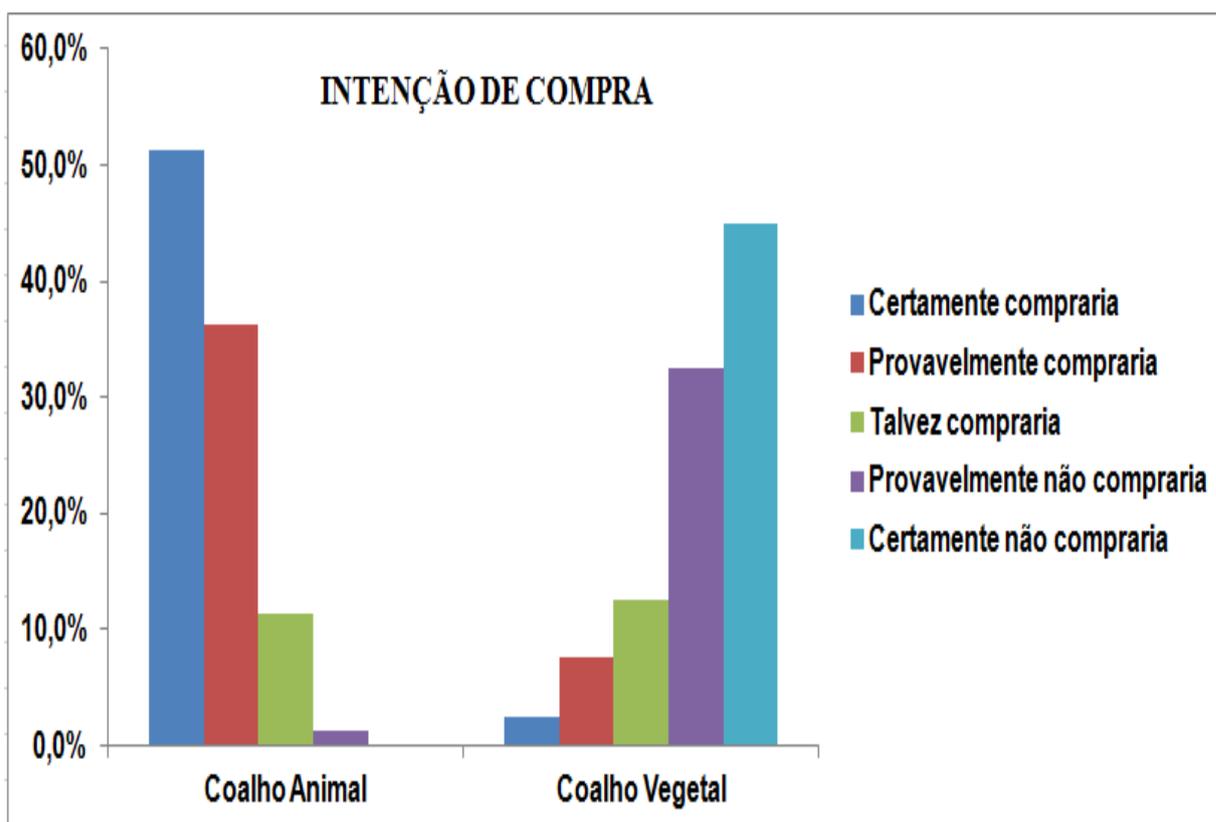


Figura 3: Intenção de compra em porcentagens para as formulações de queijo produzidas com CA e CV.

5.6. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

Tabela 8: Médias encontradas em matéria integral para os queijos produzidos com CA e CV em porcentagem e valores de p ($T \leq t$) bi-caudal encontrados no teste t de Student para os parâmetros avaliados e os respectivos coalhos utilizados

Parâmetros	Matéria integral		Valores de p ($T \leq t$) bi-caudal
	CA	CV	
Umidade	57,3	59,60	0,177960336
Cinzas	3,50	3,30	0,074651672
Proteínas	14,90	12,70	0,065674144
Lipídios	48,20	27,20	0,032141288

Fonte: Próprio autor, 2018.

Para avaliar se as médias encontradas nos parâmetros umidade, cinzas, proteínas e lipídios diferem estatisticamente foi utilizado o teste t de *Student* para duas amostras

presumindo variâncias equivalentes. De acordo com esse teste, se o valor de p for menor ou igual a 0,05, as médias analisadas diferem entre si, ou seja, são significativas estatisticamente. Se o valor de p for maior que 0,05, as médias analisadas não diferem entre si, ou seja, não são estatisticamente significativas.

O teor de umidade do queijo Minas Frescal produzido com CV foi maior que o produzido com CA. O menor poder coagulante do CA faz com que a rede proteica formada na coagulação também seja menor, e quanto menor for a quantidade da massa formada na coagulação maior será a umidade encontrada no produto final.

O queijo preparado com CV apresentou diferença estatística, apresentando valor de umidade superior a 55% e valor médio de lipídios entre 25 e 44,9% na matéria seca, sendo então classificado como um queijo de muita alta umidade e semi-gordo, estando de acordo com padrões definidos pela legislação brasileira.

Verificando os valores de p ($T \leq t$), houve diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade apenas para o parâmetro lipídios.

Em relação ao parâmetro lipídios, o queijo produzido com CA apresentou teor de lipídios superior ao limite estabelecido pela legislação, se enquadrando na classificação de queijo gordo, que contém entre 45,0 e 59,9% de gordura. O menor teor de lipídios para o queijo fabricado com CV pode ser explicado pelo maior tempo de mexedura (tabela y), no qual se tem maior perda de finos do soro, ou seja, de gordura e outros compostos como proteínas e cinzas, como pode ser visto na tabela 9.

Tabela 9: Tempo de coagulação e de mexedura para cada tipo de coalho utilizado na fabricação do queijo

Tipo de coalho	Tempo de coagulação (min)	Tempo de mexedura (min)
CA	40	15
CV	45	25

5.7. TEOR DE LIPÍDIOS NOS QUEIJOS

Para avaliar se as médias encontradas no parâmetro teor de lipídios nos queijos diferem estatisticamente, também foi utilizado o teste t de *Student* para duas amostras

presumindo variâncias equivalentes. Verificando os valores de p ($T \leq t$), houve diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade para o parâmetro teor de lipídios nos queijos.

O maior teor de gordura apresentado pelo queijo produzido com CA pode ser explicado pelo menor tempo de mexedura, no qual perde-se menos finos do soro, influenciando também na textura (maciez) do queijo, parâmetro o qual também obteve uma média melhor na análise sensorial (teste de escala hedônica de 9 pontos e ideal) quando comparado com o queijo produzido com CV, que obteve um menor teor de gordura pois foi preciso um maior tempo de mexedura para obtenção do ponto da massa.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, a enzima vegetal papaína possui maior poder coagulante 1:160.000 quando comparada com o coalho animal (1:90.000), apresentando também maior rendimento. Em relação ao custo este foi praticamente o mesmo.

O queijo produzido com CV apresentou as características físico-químicas umidade, cinzas e proteínas semelhantes às características do queijo produzido com CA, diferindo apenas no teor de lipídios e no teor de gordura final do queijo devido à maior perda de finos no soro na etapa de mexedura.

Por ter apresentado diferença estatística nos testes sensoriais pelo teste de comparação pareada, teste de escala hedônica de 9 pontos e teste de aceitação, a substituição total do CA pelo CV não é viável para o queijo Minas Frescal uma vez que ocorreu a formação do sabor amargo devido ao acúmulo de peptídeos de alto peso molecular.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A solução para eliminar o sabor amargo é o uso de exopeptidases, as quais são provenientes de fungos, bactérias, plantas e animais. Geralmente são específicas e requerem a ação anterior de endopeptidases específicas como garantia de que os peptídeos sejam degradados. Uma das melhores e bem caracterizadas das exopeptidases com essa finalidade, são as exopeptidases de bactérias lácticas, como por exemplo, *Lactobacillus helveticus* que permitem o uso de culturas fermentadoras ou *starters* para controlar o amargor em alimentos fermentados.

Esse tipo de coagulante vegetal é viável para queijos que requerem maturação, pois durante este período ocorrerá a quebra dos peptídeos de alto peso molecular em compostos de baixo peso molecular (aminoácidos), eliminando-se assim o sabor amargo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. ADITIVOS E INGREDIENTES. Enzimas função e aplicação das enzimas na Indústria Alimentícia; n° 105, 2014. Disponível em: <http://aditivosingredientes.com.br/edicoes/105/fevereiro-2014>
2. ADITIVOS E INGREDIENTES.2011. As enzimas na fabricação de produtos lácteos n° 78, 2011
3. ALVES, Gisele Kirchner. **Uso de papaína e bromelina para obtenção de hidrolisados protéicos**. 2015. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.
4. AMRI E.; MAMBOYA F. Papain, a plant enzyme of biological importance: A Review. American Journal of Biochemistry and Biotechnology, volume 8 (2), p. 99-104 2012
5. ANTUNES, L. A. F.; Vilela S. C.; Campos, S.; Dutra, E. R. P.; Munck, A. V., 2004. Critérios para escolha de um coagulante. Ha-la biotec: Chr Hansen. Valinhos, n. 82, 4
6. AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. 2005. Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists. 18.ed. Gaithersburg, Maryland, 2005.
7. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13088**: Teste de comparação pareada em análise sensorial de alimentos e bebidas. Rio de Janeiro, 1994.
8. BARRET, A.J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F. **Handbook of proteolytic enzymes**.Elsevier Academic Press.2004.
9. BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Projeto de Melhoria da Competitividade do Setor Lácteo Brasileiro**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2015.
10. BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Instrução Normativa n° 62 de 29 de dezembro de 2011, Diário Oficial da União, Brasília, 29 de dezembro de 2011**, seção 1, página 6. Disponível em: <http://www.jusbrasil.com.br>
11. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n. 51, de 20 de setembro de 2002**. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, p. 13, Seção 1, 21 set. 2002. Acesso em: 22 fev. 2018.
12. BRASIL. **Portaria no 146 de 7 de março de 1996**. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade dos queijos. Diário Oficial da União, Brasília, 11 de março de 1996.
13. BRITO, Maria Aparecida de et al. **Agronegócio do Leite: Composição**. 2018. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_128_21720039243.html. Acesso em: 22 fev. 2018

14. BASSO, A., SEOLIN, R., s/d. **Produção de queijos**. Universidade de Santa Catarina: Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos. Disponível em: http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_ng_bioq/trabalhos_grad2004/queijos/default.htm. Acesso em: 12/02/2018.
15. CAMISA, Jaqueline. **Influência do uso de um substituto de renina no rendimento, proteólise e características sensoriais do queijo Minas**. 2011. 36 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia do Leite, Universidade Norte do Paraná - Unopar, Londrina, 2011.] **Chemical Biology**. Volume 8, p. 283–296. 2013
16. CIÊNCIA DO LEITE. **O Gosto Amargo nos queijos**. 2008. Disponível em: <http://ciencialeite.com.br/noticia/2787/o-gosto-amargo-nos-queijos>. Acesso em: 26 mar. 2018.
17. COELHO, Maria Alice Zarur; SALGADO, Andrea Medeiros; RIBEIRO, Bernardo Dias. **Tecnologia Enzimática**. Rio de Janeiro: Epub, 2008. 288 p
18. COELHO, Maria Alice Zarur; SALGADO, Andrea Medeiros; RIBEIRO, Bernardo Dias. **Tecnologia Enzimática**. Petrópolis: Epub, 2008. 288 p
19. CORNISH-BOWDEN A. Current IUBMB recommendations on enzyme nomenclature and kinetics. *Perspectives in Science*. Volume 1, p. 74–87. 2014
20. DIOUF, L.; MALLAYE, A.; MBENGUE, M.; KANE, A.; DIOP, A. Carica papaya leaves: a substitute for animal rennet in cheese-making tradition. **Journal of Natural Product & Plant Resources**, Volume 2(4), p. 517-523. 2012. Disponível em http://aditivosingredientes.com.br/upload_arquivos/201604/2016040406203001460594408.pdf
21. DORNELAS, J. R. F. **Efeito do tipo de coagulante e acidificante no rendimento, proteólise e “Shelf life” do queijo minas frescal**. 1997. 126p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.
22. DOSSIE Enzimas. A evolução das enzimas coagulantes. *Food Ingredientes Brasil*, nº 16, 2011.
23. FEDATTO, Luciana Maria. **Caracterização de proteases extracelulares produzidas por Xylella fastidiosa de Citros e Videira**. 2004. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Interunidades: Ecologia de Agroecossistemas, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.
24. FOOD INGREDIENTS BRASIL. 2008. As enzimas nos alimentos; nº 58, 2008. Disponível em: <http://aditivosingredientes.com.br/edicoes/58/setembrooutubro> Acesso em: 01/02/2018
25. FOOD INGREDIENTS BRASIL. 2009. DOSSIE Enzimas; nº 10, 2009. Disponível em: Acesso em: 01/02/2018

26. FOOD INGREDIENTS BRASIL. 2014. As proteínas lácteas e a saúde; nº 114, 2014. Disponível em: <http://aditivosingredientes.com.br/edicoes/114/guia-funcionais-20142015>. Acesso em: 01/02/2018
27. FOOD INGREDIENTS BRASIL. 2014. Enzimas função e aplicação das enzimas na Indústria Alimentícia; nº 105, 2014. Disponível em: <http://aditivosingredientes.com.br/edicoes/105/fevereiro-2014>
28. FOOD INGREDIENTS BRASIL. 2011. A evolução das enzimas coagulantes; nº 16, 2011. Disponível em: http://revista-fi.com.br/upload_arquivos/201606/2016060316052001465318797.pdf
29. FOX, P. F. 1997. Advanced dairy chemistry: proteins. London: Blackie Academic & Professional, v. 1.
30. FOX, P. F.; LAW, J. 1991. Enzimology of cheese ripening. Food Biotech. , v. 5, n. 3, p. 239-262.
31. GAMBÔA, Adriane Guimarães. **Utilização do inibidor de papaína extraído de sementes de *Adenantha pavonina* L. na purificação de proteases cisteínicas.** 2010. 62 f. Monografia (Especialização) - Curso de Biologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.
32. GONZÁLEZ, F.H.D.; NORO, G. Variações na composição do leite no subtropical brasileiro. In: GONZÁLEZ, F.H.D.; PINTO, A.T.; ZANELLA, M.B.; FISCHER, V.; BONDAN, C. Qualidade do leite bovino: variações no trópico e no subtropical, Passo Fundo: UPF Editora, 2011, cap.2, p.28-53.
33. GONZÁLEZ, F.H.D. Composição bioquímica do leite e hormônios da lactação. In: **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2001.
34. GONZÁLEZ-RÁBADE, N et al. Production of plants proteases in vivo and in vitro - A review. Biotechnology Advances, México, p. 983-996. ago. 2011. Disponível em: . Acesso em: 03 mar. 2013.
35. IBGE- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Indicadores IBGE- Estatística da Produção Pecuária. Rio de Janeiro: IBGE. Acesso em: 02/02/2017
36. INSTITUTO ADOLF LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea -- São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008 p. 1020
37. KIELING, Dirlei Diedrich. **Enzimas: Aspectos Gerais.** 2002. 13 f. - Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

38. LEITE, Hugo de Brito. **Aplicação de peptidases laticíferas para produção de queijo coalho vegetariano**. 2016. 86 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016
39. LIMA, Silvio Luís Toledo de et al. Estudo da atividade proteolítica de enzimas presentes em frutos. **Química Nova na Escola**, São Paulo, v. 28, p.47-49, maio 2008
40. LIMA, Urgel de Almeida et al. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2001. 593 p
41. MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory evaluation techniques**. 3a ed. Boca Raton: CRC Press. 354p. 1999.
42. MONTEIRO, Adenilson Abranches; PIRES, Ana Clarissa dos Santos; ARAËJO, Emiliane Andrade. **Tecnologia de Produção de Derivados do Leite: Série Didática**. Viçosa: UFV, 2012.
43. MONTI, R.; BASILIO C.A.; TREVISAN, H. C; CONTIERO, J. Purification of papain from fresh latex of *Carica papaya*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.43, n. 5, p. 501-507.2000.
44. NORO, G. Síntese e secreção do leite, 2001. Disponível em: https://www.ufrgs.br/lacvet/restrito/pdf/sintese_leite.pdf. Acesso em: 18/02/2018
45. PACE N. J.; WEERAPANA, E. Diverse Functional Roles of Reactive Cysteines. **ACS**
46. PARKIN, K.L. Enzimas. In: FENNEMA, O R; PARKIN, K L; DAMODARAN, S. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. Cap. 6, p. 263-342.
47. PAULA, Junio César Jacinto de; CARVALHO, Antônio Fernandes de; FURTADO, Mauro Mansur. PRINCÍPIOS BÁSICOS DE FABRICAÇÃO DE QUEIJO: DO HISTÓRICO À SALGA. **Rev. Inst. Latic. “cândido Tostes”**, Juiz de Fora, v. 367/368, p.19-25, 2009. Março/junho.
48. PEREIRA, Suelene Carlos et al. **Utilização de proteases vegetais na fabricação de queijo coalho com leite de cabra**. In: SIMPÓSIO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 2.; CONGRESSO DO INSTITUTO NACIONAL DE FRUTOS TROPICAIS, 1.; 2010, Aracaju. Avanços em tecnologia de alimentos: anais. Aracaju: Universidade Federal de Sergipe, 2010. p. 1572-1575. 1 CD-ROM.
49. PERRY, Katia S. P. QUEIJS: ASPECTOS QUÍMICOS, BIOQUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS. **Química Nova**, Belo Horizonte, v. 27, n. 2, p.293-300, 2004
50. RESENDE, Rodrigo Ribeiro; SOCCOL, Carlos Ricardo; FRANÇA, Luiz Renato de. **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria: Fundamentos e Aplicações**. 4. ed. São Paulo: Blusher, 2016. 1068 p.
51. SALVADORI, Juliana de Marco. **Purificação parcial e caracterização das proteínases digestivas de *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera- Pyrrhocoridae): papel na hidrólise**

da urease de *Canavalia ensiformis*. 2006. 87 f. Dissertação (Pós-graduação) - Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

52. SEBRAE- SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. Técnicas e Boas Práticas na produção de queijo,2014. Disponível em: http://www.sebraemercados.com.br/wp-content/uploads/2015/12/2014_02_27_RT_Agron_QueijoIN30_pdf.pdf. Acesso em: 15/02/2018
53. SILVA, Paulo Henrique Fonseca da. Leite: Aspectos de composição e propriedades. **Química Nova na Escola**, São Paulo, v. 6, p.3-5, nov. 1997.
54. STONE, H.; SIDEL, J. **Sensory evaluation practices**. 3a ed. New York: Academic Press, 408 p. 2004
55. VAN DER HOORN, R. A. L.; Plant Proteases: From Phenotypes to Molecular Mechanisms. **Annual Review of Plant Biology**. Volume 59, p. 191–223. 2008.
56. VIEIRA, V.F. **Características físico-químicas e sensoriais de queijo mussarela elaborados a partir de leites com diferentes contagens de células somáticas**. Itapetinga, BA: 2010,71 p. Dissertação – Mestrado em Engenharia de Alimentos – UESB.
57. VILLALTA, Diana Noemí Juca. **Estudio de factibilidad de la utilización de enzimas vegetales en la elaboración de queso tipo fresco**. 2015. 83 f. TCC (Graduação) - Curso de Ingeniería En Alimentos, Facultad de Ciencia y Tecnología Escuela de Ingeniería En Alimentos, Cuenca- Ecuador, 2015.
58. XUE, Y.; NIE, H.; ZHU L.; LI S.; ZHANG H. Immobilization of Modified Papain with Anhydride Groups on Activated Cotton Fabric. **Applied Biochemistry Biotechnology**. Volume 160, p. 109-121. 2010.

9. ANEXO

ANEXO A- Tabela teste de comparação pareada. Número mínimo de julgamentos corretos para estabelecer significância em vários níveis de probabilidade.

n° total de julgamentos	Níveis de probabilidade (α)					
	Bilateral ($p=1/2$), preferência			Unilateral ($p=1/2$), diferença		
	5%	1%	0,1%	5%	1%	0,1%
5	-	-	-	5	-	-
6	6	-	-	6	-	-
7	7	-	-	7	7	-
8	8	8	-	7	8	-
9	8	9	-	8	9	-
10	9	10	-	9	10	10
11	10	11	11	9	10	11
12	10	11	12	10	11	12
13	11	12	13	10	12	13
14	12	13	14	11	12	13
15	12	13	14	12	13	14
16	13	14	15	12	14	15
17	13	15	16	13	14	16
18	14	15	17	13	15	16
19	15	16	17	14	15	17
20	15	17	18	15	16	18
21	16	17	19	15	17	18
22	17	18	19	16	17	19
23	17	19	20	16	18	20
24	18	19	21	17	19	20
25	18	20	21	18	19	21
26	19	20	22	18	20	22
27	20	21	23	19	20	22
28	20	22	23	19	21	23
29	21	22	24	20	22	24
30	21	23	25	20	22	24
31	22	24	25	21	23	25
32	23	24	26	22	24	26
33	23	25	27	22	24	26
34	24	25	27	23	25	27
35	24	26	28	23	25	27
36	25	27	29	24	26	28
37	25	27	29	24	26	29
38	26	28	30	25	27	29
39	27	28	31	26	28	30
40	27	29	31	26	28	30
41	28	30	32	27	29	31
42	28	30	32	27	29	32
43	29	31	33	28	30	32
44	29	31	34	28	31	33
45	30	32	34	29	31	34
46	31	33	35	30	32	34
47	31	33	36	30	32	35
48	32	34	36	31	33	36
49	32	34	37	31	34	36
50	33	35	37	32	34	37
60	39	41	44	37	40	43
70	44	47	50	43	46	49
80	50	52	56	48	51	55
90	55	58	61	54	57	61
100	61	64	67	59	63	66

Fonte: ABNT, NBR 13088, 1994