



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos

**PRODUÇÃO DE MANTEIGA NA PRESENÇA DE LÍPASE
MICROBIANA VISANDO A INTENSIFICAÇÃO DO AROMA**

MARCIA ALVES CHAVES

Maringá

2012

MARCIA ALVES CHAVES

**PRODUÇÃO DE MANTEIGA NA PRESENÇA DE LÍPASE
MICROBIANA VISANDO A INTENSIFICAÇÃO DO AROMA**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós Graduação em Ciência
de Alimentos da Universidade Estadual de
Maringá, como parte dos requisitos para
obtenção do título de mestre em Ciência
de Alimentos.

Maringá
2012

Orientador

Flávio Faria de Moraes

Co-orientador (a)

Eliane Colla

BIOGRAFIA

MARCIA ALVES CHAVES nasceu em 11 de outubro de 1985, na cidade de Matelândia – PR. Possui graduação em Tecnologia de Laticínios e Formação Pedagógica com Licenciatura em Biologia pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *campus* Medianeira – PR e Especialista em Ciência de Alimentos na modalidade de Frutas e Hortaliças pela Universidade Federal de Pelotas – UFPel. Tem experiência profissional na Indústria de Alimentos, tendo atuado por dois anos nos processos industriais e documentação do setor de Controle de Qualidade da Cooperativa Agroindustrial Lar, Matelândia-PR. Foi professora do ensino técnico e tecnológico na Universidade Tecnológica Federal do Paraná-UTFPR, *campus* Medianeira. Os segmentos de atuação incluem a área de laticínios e frutas e hortaliças no que compete o desenvolvimento de novos produtos alimentícios e as subseqüentes análises físico-químicas e sensorial.

Dedico

A minha família, em especial ao meu filho Pedro Henrique Alves Chaves, aos meus amigos e aos mestres que se que assim como eu engajaram-se neste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Existem muitas pessoas as quais gostaria de compartilhar meus sinceros agradecimentos, embora algumas não se façam mais presentes neste mundo.

A Deus eu agradeço pelo dom da vida e por ser meu refugio ao qual sempre procurei quando rodeavam-me as incertezas. A minha força foi a tua confiança depositada e as minhas vitórias são frutos da minha convicção em tua existência.

Aos meus pais, Amadeus Alves Chaves (*in memorian*) e Ana Zaniolo Chaves (*in memorian*) que por estarem ao lado de Deus sabem da minha gratidão para com eles. Tenho a certeza de que, cometendo erros e acertos eu sempre busquei ouvir suas palavras de ensinamento. A minha vida é feita de lembranças dos dias mais felizes que existiram nelas, dias em que comemorávamos a vida da nossa família.

Ao meu filho, meus sinceros pedidos de desculpa pela ausência durante o desenvolvimento deste trabalho e também o meu obrigado por tua compreensão, sobretudo por ser ainda uma criança. O meu desejo de prosperar se fortaleceu no dia em que você chegou neste mundo.

As minhas irmãs, Tereza, Rosane e Ivone pelo incentivo e motivação incessantes. Eu não teria conseguido tornar-me esta pessoa edificada sem vocês na base, sustentando as estruturas.

Ao professor Flávio Faria de Moraes pela confiança, por suas sugestões e críticas. Tenho certeza de que sua brilhante carreira permitiu-me ser uma pessoa mais experiente e que mesmo distante não perdeu a essência de ser orientador.

A professora e co-orientadora Eliane Colla, pela mão amiga e auxílio neste período de pesquisa. Obrigada por teus ensinamentos e por teu brilhante conhecimento.

Aos meus amigos, em especial a companheira de longa data, Grasielle Mônica Matté (com toda certeza de que anos se passaram, mas muitos ainda hão de vir na tua companhia) e as amigas encontradas durante esta jornada, Juliane Maria Flores Bernardo (amizade que certamente permanecerá). Vocês brilham e fazem-se iluminar em minha vida. Aos demais que contribuíram de alguma maneira para que a minha vida profissional e pessoal estivesse sendo lapidada.

“Quanto mais me elevo, menor fico aos olhos de quem não sabe voar”
(Nietzsche).

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação de mestrado está apresentada na forma de um artigo científico

Autores: Marcia Alves Chaves, Flavio Faria de Moraes, Eliane Colla, Makotto Matsushita, Aloísio Henrique Pereira, Aline Kirie Gohara

Título: Produção de Manteiga na Presença de Lípase Microbiana Visando a Intensificação do Aroma

Revista: Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos - CEPPA

ABSTRACT

The use of enzymes in biotechnological processes is of great importance in the production of aromatic compounds, and the lipases are able to act on lipid substrate and catalyze hydrolysis reactions giving greater aroma intensity to dairy products. Considering this activity, the objective of this study was to develop butter formulations with the addition of microbial lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizopus oryzae* and to check the effect of the hydrolysis of short chain fatty acids (up to 10 carbons) on aroma intensification. A 2² full factorial design was used for each lipase in order to determine enzyme concentration and time of hydrolysis. The cream was cooled to (5 ± 1) °C for a period of 6 h and subjected to the churning process until phase inversion and formation of butter grains, which went through the steps of washing, pressing, weighing, salting, and division. The enzyme solution was added to the butter samples according to the proposed concentration for each microbial lipase. The product was subsequently packed in sterile packaging and incubated at 20 °C with enzymatic hydrolysis according to the time set in the factorial design. The formulations were sent for gas chromatography analysis and the effect of the variables on the hydrolysis process was analyzed. Statistical analysis was used to check the concentration of short chain fatty acids (mg/g of lipids) obtained in the butter formulations. Based on these results a hydrolyzed butter sample and the standard test were chosen to perform the physicochemical, instrumental, microbiological, and sensory analyses, and for comparison purposes, a commercial matured butter sample was also evaluated. Lipases were tested for hydrolytic activity and protein content. Cream, buttermilk, and butter formulations, called standard/control, hydrolyzed/lipolyzed and matured/commercial were subjected to physicochemical analyzes of total titratable acidity, pH, moisture and volatile solids, total solids, non-fat solids, ash, density, protein, free fatty acids, total lipid content, chloride, peroxide value, saponification number, iodine index, diacetyl, and water activity. Instrumental analysis of fatty acids, texture, and color and microbiological analysis were performed to certify the quality of the produced butter. For sensory analysis, the three samples were evaluated by Hedonic Scale and Multiple Comparison tests by untrained and selected judges, respectively. Data was submitted to analysis of variance and Tukey studentized range test at 5 % probability. The results showed that cream and buttermilk had suitable composition for butter processing. As for the factorial design for *Rhizopus oryzae* lipase, the treatment using concentration of 45 mg/mL with 8 h of hydrolysis was the only one capable of reproducing the expected effects, differing from the standard sample in the sum of short-chain fatty acids. Enzyme concentration had a positive effect on the release of volatile fatty acids, indicating that the passage from the lower to the upper level resulted in an increase of 9.78 mg/g lipid. For the time factor, a negative effect on triacylglycerol hydrolysis was observed (-2.53 mg/g), which influenced the interaction of variables, with a decrease of 7.02 mg/g lipid during lipolysis. The prolonged incubation time also led to lower hydrolytic activity in preliminary tests with olive oil, showing values of 344 00 U/g in the first 5 min. As for butyric and caproic acids, no significant difference between treatments was observed. However, different results were obtained for caprylic and capric acids. For the lipase from *Thermomyces lanuginosus*, there was no significant increase in the amount of short chain fatty acids. However, the treated samples presented a strong smell of cheese, probably due to the significant amounts of hydrolyzed lauric acid. The analysis of effects

showed that the increase in enzyme concentration led to a decrease in triacylglycerol hydrolysis, preventing the increase in the concentration of volatile fatty acids in the butter samples with this lipase. Therefore, the test with concentration of 45 mg/mL and incubation time of 8 h using *Rhizopus oryzae* lipase was selected. As for the physicochemical analyses, the highest averages for acidity (4.30 ± 0.03 %), free fatty acids (1.71 ± 0.01 %), and protein (0.58 ± 0.01 %) were observed for the lipolysed butter sample. Moisture content (16.55 ± 1.08 %) and chloride values (1.61 ± 0.01 %) were higher and pH (5.58 ± 0.03) was lower for the matured sample. Regarding lipids (83.88 ± 0.37 %), total solids (83.88 ± 0.60 %), non-fat solids (1.46 ± 0.24 %), and ash (2.09 ± 0.09 %), the standard formulation presented the highest values. As for iodine index the samples did not differ, but concerning saponification number the commercial sample presented the best values (161.05 ± 0.85). Peroxide and diacetyl were not detected in any of the evaluated formulations. Concerning water activity and consistency the commercial sample was statistically different from the others, with values of 0.93 ± 0.01 and 3281 gf/cm^2 , respectively. This sample also presented a more yellowish color ($b^* = 34.69 \pm 0.41$). Considering fatty acids, the formulation with lipase showed higher amounts of short chain fatty acids (77.68 ± 2.71 mg/g), saturated fatty acids (618.76 ± 5.20 mg/g), and polyunsaturated fatty acids (10.36 ± 0.32 mg/g). Matured butter presented higher average values of monounsaturated fatty acids (341.41 ± 5.54 mg/g), which may have influenced the consistency results of this formulation. The samples submitted to microbiological analysis proved to be in accordance with legislation requirements and were sent for sensory evaluation. In the Hedonic Scale test, performed with untrained judges, the formulation with added *Rhizopus oryzae* lipase attained the highest scores for taste (7.58 ± 1.12), aroma (7.35 ± 1.26), and color (7.52 ± 1.13), while in the evaluation with selected judges this same sample had higher scores for all attributes when compared with the standard formulation. These results are a good indicative of the importance of short chain fatty acids hydrolysis in enhancing butter aroma. In conclusion, the butter sample with added *Rhizopus oryzae* lipase at enzyme concentration of 45 mg/mL and hydrolysis time of 8 h presented higher amounts of short chain fatty acids than the standard and matured formulations, with higher scores in the sensory evaluation. Physicochemical analyses revealed good stability of the formulations and instrumental assessments indicated that matured butter was darker and with softened consistency, in accordance with the levels of monounsaturated fatty acids found in this formulation.

Keywords: Lipases, Aroma, Fatty acids, Hydrolysis

RESUMO GERAL

O uso de enzimas em processos biotecnológicos tem grande importância na produção de compostos aromáticos, sendo as lipases capazes de atuar em substrato lipídico e catalisar as reações de hidrólise conferindo maior intensidade de aroma em produtos lácteos. Considerando este campo de atuação, o objetivo deste trabalho foi desenvolver formulações de manteiga adicionadas de lipases microbianas de *Thermomyces lanuginosus* e *Rhizopus oryzae* e verificar a hidrólise de ácidos graxos de cadeia curta (com até 10 carbonos) na intensificação do aroma. Utilizou-se um Planejamento Fatorial Completo (2^2) para cada lipase a fim de determinar as variáveis, concentração enzimática e tempo de hidrólise na manteiga. O creme de leite foi refrigerado a 5 ± 1 °C por um período de 6 horas, sendo submetido ao processo de bateção até a inversão de fases e formação dos grãos de manteiga a qual passou pelas etapas de lavagem, malaxagem, pesagem, salga e divisão da massa. Os tratamentos de manteiga foram adicionados da solução enzimática de acordo com a concentração proposta para cada lipase microbiana, sendo o produto posteriormente acondicionado em embalagens estéreis e incubado a temperatura de 20 °C com hidrólise enzimática de acordo com o tempo estipulado no planejamento fatorial. Os tratamentos foram encaminhados à análise de cromatografia a gás sendo posteriormente submetidos à análise de efeitos das variáveis sobre a hidrólise enzimática e análise estatística para verificar a concentração de ácidos graxos de cadeia curta (mg/g de lipídios) obtidos nos tratamentos de manteiga. Com base nesses resultados selecionou-se o tratamento de manteiga hidrolisada e o ensaio padrão para serem realizadas as análises físico-químicas, instrumental, microbiológica, sensorial e para fins de comparação, realizaram-se as avaliações em uma amostra de manteiga maturada de marca comercial. As lipases foram analisadas quanto à atividade hidrolítica e concentração de proteínas, o creme de leite, o leiteiro e as formulações de manteiga, denominadas de padrão/controle, hidrolisada/lipolisada e maturada/comercial foram submetidas às análises físico-químicas de acidez total titulável, pH, umidade e voláteis, sólidos totais, sólidos não gordurosos, resíduo mineral fixo, densidade, proteínas, ácidos graxos livres, teor de lipídios totais, cloretos, índice de peróxidos, índice de saponificação, índice de iodo, diacetil e atividade de água. Procederam-se as análises instrumentais de ácidos graxos, textura e cor e análises microbiológicas para atestar a qualidade da manteiga elaborada. Para avaliação sensorial, as três amostras foram avaliadas pelos testes de Escala Hedônica e Comparação Múltipla por julgadores não-treinados e selecionados, respectivamente. Os dados foram submetidos à análise de variância e ao Teste de *Tukey studentized* ao nível de 5 % de probabilidade. Os resultados demonstraram que, o creme de leite e o leiteiro apresentavam composição satisfatória para o processamento da manteiga. Com relação ao planejamento fatorial da lipase de *Rhizopus oryzae*, o tratamento utilizando concentração de 45 mg/ml durante 8 horas de hidrólise foi o único capaz de reproduzir os efeitos esperados, diferindo da amostra padrão na somatória dos ácidos graxos de cadeia curta. A concentração enzimática apresentou efeito positivo sobre a liberação de ácidos graxos voláteis, indicando que a passagem do nível inferior para o nível superior resultou em um aumento de 9,78 mg/g lipídio. Para o fator tempo, observou-se um efeito negativo (-2,53 mg/g) sobre hidrólise do triacilglicerol, o qual influenciou na interação das variáveis, com diminuição de 7,02 mg/g de lipídio durante a lipólise. O tempo prolongado de incubação também

promoveu menor atividade hidrolítica nos ensaios preliminares em azeite de oliva, observando-se valores de 344 00 U/g nos 5 minutos iniciais de reação. Quanto aos ácidos butírico e capríco, não houve diferença significativa entre os tratamentos, entretanto, observaram-se resultados distintos para os ácidos caprílico e cáprico. Para a lipase de *Thermomyces lanuginosus*, não foi verificado aumento significativo na quantidade de ácidos graxos de cadeia curta, porém, os tratamentos apresentaram forte odor de queijo, provavelmente pelas quantidades significativas de ácido graxo láurico hidrolisado. A análise de efeitos demonstrou que o aumento da concentração enzimática promoveu declínio na hidrólise do triacilglicerol, impedindo o aumento na concentração de ácidos graxos voláteis nos tratamentos de manteiga adicionados desta lipase. Portanto, o único ensaio selecionado foi o que apresentou concentração de 45 mg/ml e tempo de incubação de 8 horas utilizando a lipase de *Rhizopus oryzae*. Quanto às análises físico-químicas, as maiores médias para acidez ($4,30 \pm 0,03$ %), ácidos graxos livres ($1,71 \pm 0,01$ %) e proteínas ($0,58 \pm 0,01$ %) foram observadas na amostra de manteiga lipolisada. Enquanto isso, os dados de umidade ($16,55 \pm 1,08$ %) e cloretos ($1,61 \pm 0,01$ %) foram superiores e o pH ($5,58 \pm 0,03$) inferior para a amostra maturada. Já para os lipídios ($83,88 \pm 0,37$ %), sólidos totais ($83,88 \pm 0,60$ %), sólidos não gordurosos ($1,46 \pm 0,24$ %) e cinzas ($2,09 \pm 0,09$ %), os valores apresentaram-se mais elevados para a formulação padrão. Quanto ao índice de iodo, as amostras não diferiram e para o índice de saponificação a amostra comercial ($161,05 \pm 0,85$), apresentou dados superiores às demais. Não foi possível detectar a presença de peróxido e diacetil nas três formulações avaliadas. Com relação aos dados de atividade de água e consistência a amostra comercial foi estatisticamente diferente das demais com valores de $0,93 \pm 0,01$ e 3.281 gf/cm^2 respectivamente, enquanto para cor, a mesma formulação apresentou tonalidade mais amarela ($b^* = 34,69 \pm 0,41$). Para os ácidos graxos, a formulação adicionada de lipase apresentou quantidades superiores de ácidos graxos de cadeia curta ($77,68 \pm 2,71 \text{ mg/g}$), ácidos graxos saturados ($618,76 \pm 5,20 \text{ mg/g}$) e ácidos graxos poliinsaturados ($10,36 \pm 0,32 \text{ mg/g}$) e a formulação de manteiga maturada apresentou maior média para ácido graxo monoinsaturado ($341,41 \pm 5,54 \text{ mg/g}$), que pode ter influenciado os dados de consistência nesta mesma formulação. As amostras submetidas à análise microbiológica mostraram-se de acordo com o preconizado em lei sendo encaminhadas para a avaliação sensorial. No teste de Escala Hedônica, realizada com os julgadores não-treinados a formulação adicionada de lipase de *Rhizopus oryzae* apresentou as melhores notas para sabor ($7,58 \pm 1,12$), aroma ($7,35 \pm 1,26$) e cor ($7,52 \pm 1,13$), enquanto na avaliação com julgadores selecionados este mesmo tratamento apresentou notas superiores em todos os atributos quando comparado a formulação padrão, sendo estes dados um bom representativo da hidrólise dos ácidos graxos de cadeia curta na intensificação do aroma de manteiga. Concluí-se que o tratamento de manteiga adicionado de lipase de *Rhizopus oryzae* na concentração enzimática de 45 mg/ml e 8 horas de hidrólise, apresentou quantidade de ácidos graxos de cadeia curta superior aos da formulação padrão e maturada com maior valor atribuído a manteiga lipolisada durante a avaliação sensorial. As análises físico-químicas demonstraram boa estabilidade das formulações e as avaliações instrumentais indicaram que a manteiga maturada apresentou-se mais escura e com consistência mais amolecida, corroborando com os dados de ácidos graxos monoinsaturados desta formulação.

Palavras-chave: Lípases, Aroma, Ácidos Graxos, Hidrólise

PRODUÇÃO DE MANTEIGA NA PRESENÇA DE LÍPASE MICROBIANA VISANDO A INTENSIFICAÇÃO DO AROMA

* MARCIA ALVES CHAVES¹
FLAVIO FARIA DE MORAES²
ELIANE COLLA³
RITA DE CASSIA BERGAMASCO⁴
MAKOTTO MATSUSHITA⁵
ALOÍSIO HENRIQUE PEREIRA⁶
ALINE KIRIE GOHARA⁷

Um Planejamento Fatorial Completo foi aplicado à lipólise de manteiga para determinar a influência do tempo de hidrólise e concentração de lipase sobre a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). As enzimas de *Rhizopus oryzae* e *Thermomyces lanuginosus* foram utilizadas. O tratamento que apresentou maior quantidade de AGCC foi escolhido para preparação de uma formulação de manteiga utilizada posteriormente para análise sensorial, e comparação com as manteigas padrão e maturada comercial. Análises foram realizadas para caracterização das lipases, creme de leite, leite e manteiga. Para manteiga, os testes incluíram a determinação de cor, textura, análises cromatográficas, atividade de água e ensaios microbiológicos. A análise sensorial foi realizada com julgadores não treinados, e o índice de aceitabilidade dos atributos foi calculado. Testes com lipase de *Thermomyces* não foram significativos para a produção de AGCC, nas condições testadas de tempo e concentração de enzima. A lipase de *Rhizopus* produziu maior quantidade de AGCC na condição de 90 mg de enzima/100 g de manteiga e período de hidrólise de 8 h. A adição da solução de enzima à manteiga alterou o seu teor de umidade e acidez, enquanto os outros parâmetros foram mantidos em conformidade com a legislação. A formulação de manteiga maturada apresentou coloração amarela, maior consistência e menor atividade de água, enquanto a formulação com adição de lipase de *Rhizopus* recebeu na avaliação sensorial, notas mais altas de sabor, aroma e cor, e maior índice de aceitação para todos os atributos sensoriais, demonstrando a contribuição dos AGCC para a aceitação de manteiga.

PALAVRAS-CHAVE: ÁCIDOS GRAXOS; AROMA; HIDRÓLISE ENZIMÁTICA;

¹ Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. Centro de Ciências Agrárias, Bloco J-45, sala 16-A, UEM, CEP 87.020-900, Maringá/PR/Brasil (e-mail: marcia_alves_chaves@hotmail.com).

² PhD em Engenharia Química. Departamento de Engenharia Química, Bloco D-90, Zona 01, Centro, UEM, CEP 87.020-900, Maringá/PR/Brasil (e-mail: flaviofmoraes@uol.com.br).

³ Doutora em Engenharia de Alimentos. Secretaria de Educação Profissional e Graduação Tecnológica, Curso de Engenharia de Alimentos, UTFPR, Campus Medianeira, CEP 85884-000, Medianeira/PR/Brasil (e-mail: ecolla@utfpr.edu.br).

⁴ Doutora em Engenharia Química. Departamento de Engenharia de Alimentos, Bloco 13, Zona 07, UEM, CEP 87.020-900, Maringá/PR/Brasil (e-mail: ritabergamasco@bol.com.br).

⁵ Doutor em Ciências. Centro de Ciências Exatas, Departamento de Química, Bloco 17, UEM, CEP 87.020-900, Maringá/PR/Brasil (e-mail: mmakoto@uem.br).

⁶ Mestre em Ciência de Alimentos. Centro de Ciências Agrárias, Bloco J-45, sala 16-A, UEM, CEP 87.020-900, Maringá/PR/Brasil (e-mail: aloisio_rick17@yahoo.com.br).

⁷ Mestranda em Ciência de Alimentos. Centro de Ciências Agrárias, Bloco J-45, sala 16-A, UEM, CEP 87.020-900, Maringá/PR/Brasil (e-mail: alinekgohara@hotmail.com).

1 INTRODUÇÃO

Segundo Gonçalves (2007), Soares (2004) e Franco (2003), o uso de aromas naturais produzidos por fermentação ou processos enzimáticos tem motivado as indústrias no desenvolvimento de novas metodologias para melhorias dos compostos aromáticos, sendo que as lípases microbianas apresentam a função de catalisar a hidrólise de triglicerídeos a fim de gerar ácidos graxos livres, mono, diacilgliceróis e glicerol.

As lípases apresentam especificidades de reação, exercendo sua atividade em diferentes classes de compostos, ou tipos de ligação. As lípases específicas hidrolisam a cadeia do triacilglicerol ou triglicerídeo nas posições 1 e 3, atuando sobre os ácidos graxos de cadeia curta como o ácido butanóico e outros ácidos de cadeia média que estão localizados principalmente na posição *sn*-3. Entre as lípases microbianas que apresentam atividade específica, podem ser citadas a *Thermomyces lanuginosus* e a *Rhizopus oryzae* (RAMPIN, 2007; SAXENA et al., 1999; WILLIS e MARAGONI, 1999; COSTA e AMORIM, 1999).

Durante a lipólise da gordura do leite, os ácidos graxos voláteis (até 10 carbonos) são liberados do triacilglicerol, resultando em diferentes tipos de *flavor*, e sendo uma alternativa para a produção de aromas lácteos em produtos como manteiga, queijo, margarina e bebidas fermentadas, que alcançam maior aceitação desses alimentos tratados enzimaticamente (BUTTER BUDS, 2010; WANG e XU, 2009; HASAN, SHAH e HAMED, 2006; SANTOS et al., 2001; SAXENA et al., 1999; JAEGER e REETZ, 1998; GANDHI, 1997).

Para Castro, Mendes e Santos (2004), a adição desses hidrolisados aos alimentos confere amplos efeitos sensoriais, que são dependentes da quantidade empregada. Em níveis baixos, é pouco detectável a presença de aroma lácteo, entretanto, se for aumentada a concentração desses hidrolisados, um aroma semelhante à manteiga começa a ser detectado.

A gordura do leite é uma das mais complexas, sendo composta por uma mistura de mais de 100.000 tipos de triglicerídeos (95 a 98 % do total dos lipídios), nos quais estão distribuídos aproximadamente 400 ácidos graxos, proporcionando distintas propriedades de cor, reologia e estabilidade química nos produtos lácteos (SIMIONATO, 2008; MARANGONI e ROSSEAU, 1998).

Segundo a Portaria nº 146 de 1996, a manteiga é o produto gorduroso obtido exclusivamente pela bateção e malaxagem, com ou sem adição biológica de creme maturado, derivado exclusivamente do leite de vaca (BRASIL, 1996).

A manteiga é composta basicamente por gordura, compreendendo 80 a 85 % de lipídios sendo muito apreciada em sistemas alimentares devido às características peculiares de sabor. Em sua composição contém aproximadamente 52 % de gordura saturada, tendo como principal ácido graxo o palmítico, 25 % é composta de gordura monoinsaturada prevalecendo o ácido oléico e 3 % de gordura poliinsaturada (COSTA, 2011; HETTINGA, 2005).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver formulações de manteiga adicionadas de lípases microbianas de *Thermomyces lanuginosus* e *Rhizopus oryzae* e verificar o efeito da concentração enzimática e tempo de hidrólise sobre a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) com intensificação no atributo sensorial de aroma no produto. Realizaram-se também as análises físico-química, microbiológica e instrumental para caracterizar as formulações.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

A lipase de *Rhizopus oryzae* foi fornecida pela empresa *DSM Foods Specialtes®* (Phalempin, França) enquanto a lipase de *Thermomyces lanuginosus* foi adquirida da empresa *Sigma-Aldrich®* (São Paulo, Brasil). O creme de leite foi cedido pelo Laticínio Lactomil® (Serranópolis do Iguaçu, Paraná, Brasil); o sal e as torradas foram adquiridos no comércio local. Para fins de comparação, foi realizada a aquisição de uma manteiga comercial maturada produzida em Minas Gerais, Brasil e disponibilizada no comércio de Maringá, Paraná, Brasil.

2.2 PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO

Utilizou-se para cada lipase microbiana, um Planejamento Fatorial Completo (2^2) com três (3) pontos centrais, totalizando sete (7) ensaios, para avaliar os efeitos da concentração enzimática e tempo de hidrólise sobre a resposta de liberação dos ácidos graxos de cadeia curta (ácidos graxos voláteis). Os valores reais e codificados das variáveis estudadas (Tabela 1) foram definidos com base nos trabalhos de OLIVEIRA (2010), WANG e XU (2009), PAULA (2008), REGADO et al. (2007), e nos testes preliminares da atividade hidrolítica das lipases.

TABELA 1- MATRIZ DOS TRATAMENTOS UTILIZADA NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO (2^2) PARA OS TESTES COM AS LÍPASES DE *RHIZOPUS ORYZAE* E *THERMOMYCES LANUGINOSUS*, APRESENTANDO OS VALORES REAIS E CODIFICADOS (ENTRE PARENTESSES) DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS

Lípase	Tratamentos*	Concentração enzimática (c=mg/mL)	Tempo de hidrólise (t=h)
<i>Rhizopus oryzae</i>	MP	---	---
	MR1	5 (-1)	8 (-1)
	MR 2	45 (+1)	8 (-1)
	MR 3	5 (-1)	48 (+1)
	MR 4	45 (+1)	48 (+1)
	MR 5	25 (0)	28 (0)
	MR 6	25 (0)	28 (0)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	MR 7	25 (0)	28 (0)
	MT1	0,01 (-1)	8 (-1)
	MT 2	1 (+1)	8 (-1)
	MT 3	0,01(-1)	48 (+1)
	MT 4	1 (+1)	48 (+1)
	MT 5	0,5 (0)	28 (0)
	MT 6	0,5 (0)	28 (0)
MT 7	0,5 (0)	28 (0)	

*MP: manteiga padrão; MR1:c=5 t= 8 h; MR2: c=45 t=8 h; MR3:c=5 t= 48 h; MR4:c=45 t= 48 h; MR5:c=25 t= 28 h; MR6:c=25 t= 28 h; MR7:c=25 t= 28 h; ; MT1:c=0,01 t= 8 h; MT2: c=1,00 t=8 h; MT3:c=0,01 t= 48 h; MT4:c=1,00 t= 48 h; MT5:c=0,5 t= 28 h; MT6:c=0,5 t= 28 h; MT7:c=0,5 t= 28 h; Todos os tratamentos enzimáticos das amostras de manteiga foram realizados a 20 °C e pH natural da manteiga.

A manteiga foi elaborada de acordo com o item 2.3, sendo que os tratamentos de manteiga preparados no laboratório e a manteiga de marca comercial foram submetidos à análise de cromatografia a gás. Os dados foram posteriormente avaliados pela análise de efeitos e os tratamentos adicionados de lipase foram comparados com o ensaio padrão quanto à concentração de ácidos graxos de cadeia curta (C 4:0-C 10:0). Os valores referentes ao ácido láurico (C 12:0) foram avaliados apenas para fins de comparação entre os tratamentos enzimáticos, porém não foram considerados na somatória dos ácidos graxos de cadeia curta, pois há divergência entre os autores sobre a classificação de sua cadeia carbônica (AKIN et al., 2003; REGADO et al., 2007; WANG e XU, 2009)

2.3 ELABORAÇÃO DA MANTEIGA

Para elaboração da manteiga, seguiu-se a metodologia proposta por Ordóñez (2005) com algumas modificações, sendo selecionada a matéria-prima do mesmo lote de fabricação, utilizando-se creme de leite com teor aproximado de 35 % de lipídios, o qual permaneceu refrigerado a 5 ± 1 °C /6 h para a cristalização da gordura. Após, foi submetido à bateção em mantegueira manual modelo Coquim® marca, Inox Aliança (São Paulo, Brasil) até a inversão de fases e liberação do leitelho, o qual foi coletado para as análises físico-químicas. Foi verificada a quantidade de leitelho eliminado e sob esta quantidade adicionou-se água mineral a temperatura de 6 ± 1 °C, realizado a lavagem dos grânulos de manteiga por 3 vezes. Posteriormente, o produto foi submetido à etapa de malaxagem, sendo pesado e adicionado de 2 % de sal (m/m).

A manteiga foi fracionada em porções de 100 g e os 14 tratamentos foram adicionados de 2 mL de solução enzimática. As soluções foram preparadas diluindo-se as lipases microbianas em água destilada de acordo com as concentrações estudadas no planejamento fatorial completo. As formulações foram acondicionadas em embalagens estéreis as quais foram colocadas em um banho-maria à temperatura de 20 °C com tempo de incubação específico para cada tratamento conforme demonstrado na Tabela 1. A temperatura de 20 °C foi escolhida para se evitar contaminação microbiana. Tendo transcorrido o período de hidrólise, as formulações de manteiga foram armazenadas a -18 ± 1 °C até a realização da análise por cromatografia a gás. A formulação padrão não foi adicionada da solução enzimática, sendo esta submetida ao congelamento logo após sua elaboração. O pH dos tratamentos não foi controlado, sendo o natural das amostras de manteiga ($6,37 \pm 0,07$) e determinado juntamente com as análises físico-químicas.

A análise dos ácidos graxos permitiu identificar as diferenças significativas entre os tratamentos de manteiga hidrolisada e o tratamento padrão, possibilitando a elaboração de um produto final. O ensaio selecionado para elaboração do produto final foi preparado nas mesmas condições que os tratamentos do planejamento fatorial completo, sendo a manteiga dividida em 2 porções de 1000 g e a uma delas adicionada de 20 mL de lipase de *Rhizopus oryzae* na concentração de 45 mg/mL e tempo de hidrólise de 8 h. Do mesmo modo, a amostra comercial de manteiga maturada foi retirada de sua embalagem de origem, acondicionada em recipiente estéril e submetida ao congelamento. As amostras foram armazenadas em freezer vertical e permaneceram sob a temperatura de -18 ± 1 °C até a realização das análises físico-químicas, instrumentais, microbiológicas e sensorial.

2.4 ANÁLISES DE CARACTERIZAÇÃO DAS LÍPASES MICROBIANAS

Para as lípases de *Rhizopus oryzae* e *Thermomyces lanuginosus* foram realizadas as análises de atividade hidrolítica conforme a metodologia proposta por Soares et al. (1999), utilizando como substrato azeite de oliva. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio.

2.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO CREME DE LEITE, LEITELHO E DAS FORMULAÇÕES DE MANTEIGA

Avaliaram-se os parâmetros de acidez total titulável, pH, umidade e voláteis, sólidos totais (ST), sólidos não gordurosos (SNG), resíduo mineral fixo e proteínas, sendo que para o leiteiro realizou-se adicionalmente a determinação da densidade a 15 °C. (BRASIL, 2006). O teor de lipídios totais foi determinado pela técnica de Bligh e Dyer (1959) com clorofórmio e metanol e a esterificação de acordo com Hartman e Lago (1973) utilizando-se KOH/metanol e n-heptano.

Para a manteiga, também foram realizadas as análises de cloretos pelo método argentométrico, diacetil pelo método qualitativo de *Voges-Proskauer*, índice de peróxidos e índice de saponificação pelo método de Koellstorges. O percentual de ácidos graxos livres - AGL (% ácido oléico) e o índice de iodo pelo método de Wijs seguiram a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (1985). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados comparados com a Portaria nº 146 (BRASIL, 1996) e Decreto-Lei nº 30.691 (BRASIL, 1952).

2.6 ANÁLISES DE ATIVIDADE ÁGUA E INSTRUMENTAL DAS FORMULAÇÕES DE MANTEIGA

Para expressar os resultados de textura, ácidos graxos, cor e atividade de água foi utilizada a média das triplicatas de cada análise.

As amostras de manteiga foram submetidas à análise de textura em texturômetro (modelo Stable Micro Systems, marca TA.HDplus®, Surrey, Inglaterra). Foi utilizado cone de acrílico com ponta não truncada e ângulo de 45°. Os testes foram operados nas seguintes condições: retorno ao início, distância = 10,0 mm; velocidade = 2,0 mm/s; tempo = 5 s; determinação da força de compressão (gf); triplicata: 3 compressões em pontos diferentes para cada amostra de acordo com Ract e Gioielli (2008).

Para análise dos ácidos graxos, as amostras foram derivatizadas e os ésteres metílicos foram separados em Cromatógrafo a Gás (modelo 3380 marca Varian®, Estados Unidos), equipado com coluna capilar de sílica fundida, CP-Select CB-FAME (100 % biscianopropil ligado, dimensões: 100 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura da fase estacionária). Os fluxos dos gases foram de 1,4 mL/min para o gás de arraste (H_2), 30 mL/min para o gás auxiliar (N_2); 30 e 300 mL/min para os gases da chama de hidrogênio e ar sintético, respectivamente. A temperatura inicial da coluna foi estabelecida em 65 °C, mantida

por 4 min chegando à temperatura final de 235 °C, sendo elevada a uma taxa de 10 °C/min. Os ácidos graxos foram calculados com base na área do pico (mg/g de lipídio) e para identificar os ácidos graxos em 100 g de manteiga (g/100 g), os valores foram expressos multiplicando-se a quantidade de ácido graxo pelo teor de lipídio avaliado em cada uma das formulações de manteiga.

A cor foi avaliada em equipamento modelo Chroma Metter CR-400 marca Konica Minolta®, (Tóquio, Japão) nas coordenadas, “L” (luminosidade) “a” (tonalidades de vermelho a verde) e “b” (tonalidades de amarelo a azul). A atividade de água foi avaliada pelo equipamento modelo AquaLab 4TE®, marca Decagon Devices (Pullman, Estados Unidos) à temperatura de 15 °C.

2.7 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DAS FORMULAÇÕES DE MANTEIGA

As formulações de manteiga foram avaliadas quanto à contagem de Coliformes a 35 °C e a 45 °C, *Estafilococcus coagulase positiva* e pesquisa de *Salmonella sp* em 25 g de acordo com a Instrução Normativa nº62 (BRASIL, 2003). Os resultados foram expressos pela média da triplicata e comparados com a RDC nº 12 (BRASIL, 2001).

2.8 ANÁLISE SENSORIAL DAS FORMULAÇÕES DE MANTEIGA

A avaliação sensorial foi realizada posterior à aprovação do Comitê de Ética, CAAE nº 02186412.2.0000.0104, utilizando-se de três (3) amostras, sendo: (1ª) manteiga adicionada de lipase de *Rhizopus oryzae* (c = 45 mg/ml e 8 h de hidrólise a 20 °C), denominada de manteiga lipolisada; (2ª) manteiga padrão ou controle (sem adição de enzima) e (3ª) manteiga maturada (marca comercial). As formulações foram codificadas aleatoriamente e servidas em quantidade aproximada de 25 g com torradas neutras. Entre uma amostra e outra foi solicitado ao julgador que realizasse a limpeza do palato com água mineral à temperatura de 10 ±1 °C. Aos 140 julgadores não treinados, solicitou-se a avaliação dos atributos sabor, odor, aroma, cor e textura por intermédio da Escala Hedônica de 9 pontos, onde 01 correspondeu a “desgostei muitíssimo” e 09 a “gostei muitíssimo”. Para fins de esclarecimento, foi fixado junto ao teste de Escala Hedônica, uma descrição a respeito dos atributos odor e aroma. A avaliação sensorial foi conduzida em cabines individuais sob luz fluorescente, sendo posteriormente realizado o cálculo do Índice de Aceitabilidade de acordo com Monteiro (1984).

2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os resultados obtidos para as propriedades físico-químicas, instrumental e sensorial das formulações foram submetidos à análise de variância e, quando detectada diferença significativa ao nível de 5 % de probabilidade, foi aplicado o Teste de *Tukey studentized*, utilizando o programa *STATISTICA*, versão 7.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ANÁLISES DE CARACTERIZAÇÃO DAS LÍPASES MICROBIANAS

Os resultados da atividade hidrolítica em azeite de oliva, utilizando *Rhizopus oryzae* na concentração de 0,5 mg/mL a 37 °C demonstraram alta atividade de hidrólise, observando-se que, aos 5 minutos iniciais o valor encontrado para atividade hidrolítica foi de 34400 U/g. Segundo Paula (2008) a lipase de *Rhizopus oryzae* apresenta boa estabilidade na faixa entre 3 e 8, estando em condições propícias para atuação no substrato utilizado com pH 7,0.

Para a atividade hidrolítica da lipase de *Thermomyces lanuginosus* avaliada em substrato de azeite de oliva na concentração de 0,01 mg/mL a 37 °C, os resultados indicaram atividade média de 4693 $\mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{min})$. Saxena et al. (1999) e Li, Zong e Ma (2009), relatam que esta lipase apresenta alta atividade em pH alcalino, entre 11-12. Outro fator importante é a temperatura de hidrólise, sendo esta lipase estável entre 60 e 70 °C. No entanto, não foi possível utilizar estas condições de temperatura e pH durante esta análise.

3.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO CREME DE LEITE E LEITELHO

Para o creme de leite, os valores de acidez ($0,10 \pm 0,00$ g de ácido láctico) e lipídios ($35,69 \pm 0,61$ % de gordura) apresentaram-se em conformidade com a Portaria nº 146 de 1996, que estipula limites de 0,20 g de ácido láctico e teor de lipídios entre 20,00 e 49,90 %. As análises do leiteiro também demonstraram valores condizentes com o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) para os parâmetros de acidez ($0,11 \pm 0,00$ g de ácido láctico) com limite de 0,63 g de ácido láctico e lipídios ($1,10 \pm 0,07$ % de gordura) sendo preconizado o valor máximo de 2 % (BRASIL, 1996; BRASIL, 1952).

O conteúdo protéico para o creme de leite ($0,52 \pm 0,02$ %) foi menor que o citado por Stephani *et al.* (2011), enquanto o efeito contrário foi observado para o leiteiro que é constituído por pequena fração lipídica e elevada concentração de sólidos não gordurosos ($9,12 \pm 1,51$ %), proteínas ($3,19 \pm 0,06$ %) e umidade ($89,60 \pm 1,31$ %). O teor de cinzas do creme ($0,33 \pm 0,03$ %) foi inferior ao encontrado no leiteiro ($0,50 \pm 0,01$ %), sendo que este subproduto pode contribuir para a elaboração de novas formulações alimentícias, como proposto por Neto (2009).

3.3 ANÁLISE DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO – PFC (2²)

Os resultados dos ácidos graxos de cadeia curta, a citar: butírico (C 4:0), capríco (C 6:0), caprílico (C 8:0) e cáprico (C 10:0), a somatória destes ácidos graxos (C 4:0 a C 10:0) e adicionalmente, os dados para o ácido láurico (C 12:0) podem ser visualizados nas Tabelas 2 e 3.

TABELA 2: CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA (mg/g LIPÍDIO) E MÉDIA OBTIDA PARA OS TRATAMENTOS ENZIMÁTICOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO COM LÍPASE DE *Rhizopus oryzae*

Tratamentos*	Ácidos Graxos de Cadeia Curta e Média**					
	C 4:0	C 6:0	C 8:0	C 10:0	C 12:0	C 4:0 – C 10:0
MP	9,99 ± 0,42 ^a	13,13 ± 0,61 ^a	11,21 ± 0,50 ^b	28,04 ± 1,01 ^b	2,84 ± 0,20 ^a	62,38 ± 2,52 ^b
MR1	10,08 ± 0,92 ^a	13,24 ± 1,62 ^a	11,04 ± 1,03 ^b	26,50 ± 2,13 ^b	2,85 ± 0,15 ^a	60,86 ± 5,69 ^b
MR2	12,28 ± 0,47 ^a	16,29 ± 0,57 ^a	14,05 ± 0,49 ^a	35,04 ± 1,22 ^a	2,89 ± 0,14 ^a	77,68 ± 2,71 ^a
MR3	10,50 ± 0,13 ^a	13,93 ± 0,23 ^a	11,82 ± 0,23 ^b	29,09 ± 0,76 ^b	2,92 ± 0,22 ^a	65,35 ± 1,33 ^b
MR4	11,54 ± 1,67 ^a	13,91 ± 0,79 ^a	12,14 ± 0,83 ^b	30,53 ± 2,15 ^{bc}	2,94 ± 0,14 ^a	68,11 ± 2,63 ^b
MR5	10,16 ± 0,13 ^a	13,45 ± 0,13 ^a	10,98 ± 0,52 ^{bc}	28,41 ± 0,34 ^{bd}	2,87 ± 0,03 ^a	62,99 ± 0,47 ^{bc}
MR6	10,81 ± 1,01 ^a	14,79 ± 1,17 ^a	12,94 ± 0,97 ^b	28,72 ± 1,06 ^{be}	2,90 ± 0,17 ^a	67,26 ± 3,58 ^b
MR7	10,69 ± 2,04 ^a	14,59 ± 2,19 ^a	12,66 ± 1,58 ^b	31,42 ± 3,49 ^b	2,86 ± 0,04 ^a	69,35 ± 9,29 ^b

*MP: manteiga padrão; MR1:c=5 t= 8 h; MR2: c=45 t=8 h; MR3:c=5 t= 48 h; MR4:c=45 t= 48 h; MR5:c=25 t= 28 h; MR6:c=25 t= 28 h; MR7:c=25 t= 28 h;

** Os ácidos Graxos de Cadeia Curta são representados por mg/g de lipídio. c é mg/mL de enzima
Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey (P≤0,05).

TABELA 3: CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA (mg/g LIPÍDIO) E MÉDIA OBTIDA PARA OS TRATAMENTOS ENZIMÁTICOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO COM LÍPASE DE *Thermomyces lanuginosus*

Tratamentos*	Ácidos Graxos de Cadeia Curta e Média **					
	C 4:0	C 6:0	C 8:0	C 10:0	C 12:0	C 4:0 - C 10:0
MP	9,99 ± 0,42 ^a	13,13 ± 0,61 ^a	11,21 ± 0,50 ^a	28,04 ± 1,01 ^a	2,84 ± 0,20 ^b	62,38 ± 2,52 ^a
MT1	10,05 ± 0,35 ^a	13,63 ± 1,10 ^a	11,59 ± 0,53 ^a	28,53 ± 0,61 ^a	3,29 ± 0,24 ^a	63,80 ± 2,58 ^a
MT2	10,10 ± 0,60 ^a	12,45 ± 0,43 ^a	11,62 ± 0,72 ^a	29,14 ± 1,98 ^a	3,50 ± 0,10 ^a	63,31 ± 3,73 ^a
MT3	10,04 ± 0,74 ^a	13,18 ± 0,76 ^a	11,71 ± 0,67 ^a	29,44 ± 1,31 ^a	3,41 ± 0,10 ^a	64,38 ± 3,47 ^a
MT4	10,03 ± 1,24 ^a	12,93 ± 0,17 ^a	12,20 ± 0,03 ^a	28,70 ± 0,40 ^a	3,65 ± 0,02 ^a	63,86 ± 1,50 ^a
MT5	10,00 ± 2,10 ^a	12,92 ± 0,24 ^a	11,66 ± 0,36 ^a	28,45 ± 0,51 ^a	3,47 ± 0,04 ^a	63,03 ± 1,00 ^a
MT6	10,10 ± 1,90 ^a	12,96 ± 0,13 ^a	11,45 ± 0,11 ^a	28,58 ± 0,34 ^a	3,45 ± 0,11 ^a	63,09 ± 2,48 ^a
MT7	10,15 ± 1,75 ^a	12,42 ± 0,03 ^a	11,38 ± 0,03 ^a	28,56 ± 0,02 ^a	3,44 ± 0,11 ^a	62,50 ± 1,83 ^a

*MP: manteiga padrão; MT1:c=0,01 t= 8h; MT2: c=1,00 t=8 h; MT3:c=0,01 t= 48 h; MT4:c=1,00 t= 48 h; MT5:c=0,5 t= 28 h; MT6:c=0,5 t= 28 h; MT7:c=0,5 t= 28 h;

** Os ácidos Graxos de Cadeia Curta são representados por mg/g de lipídio. c é mg/mL de enzima
Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey (P≤0,05).

Observou-se que, para lipase de *Rhizopus oryzae*, o tratamento utilizando 2 mL de solução enzimática na concentração de 45 mg/mL/100 g de manteiga, ou seja, 90 mg de enzima/100 g de manteiga, durante 8 h de hidrólise (MR2), foi o único capaz de promover os efeitos esperados, produzindo maior concentração de ácidos graxos de cadeia curta ($77,66 \pm 2,75$ mg/g), que difere da amostra padrão ($62,38 \pm 1,94$ mg/g), e indica que a enzima apresentou maior lipólise nestas condições.

Wang e Xu (2009), detectaram valores médios de $3,73 \pm 3,87$ mg/g em amostras de gordura do leite hidrolisadas com lipase de *Rhizopus oryzae* na concentração de 10 mg/mL e incubadas a 28 °C/4 h, sendo portanto, inferior aos resultados deste trabalho ($77,68 \pm 2,71$ mg/g) utilizando concentração enzimática de 45 mg/mL, tempo de hidrólise de 8 h e temperatura de 20 °C. Com relação à concentração de ácidos graxos voláteis em 100 g do produto, os dados encontrados para o tratamento MR2 de $6,38 \pm 0,29$ mg em 100 g de manteiga (Tabela 9), foram superiores aos de Akin *et al.*, (2003) em 100 g de queijo de massa branca ($1,8 \pm 0,05$ mg) após 24 h de maturação, utilizando lipase pregástrica.

Analisando os resultados da Tabela 2, foi possível calcular os efeitos das duas variáveis estudadas sobre as respostas de concentração de ácidos graxos de cadeia curta para os ensaios utilizando a lipase de *Rhizopus oryzae*, os quais estão apresentados na Tabela 4.

TABELA 4: EFEITO DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO (2^2) SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA (mg/g) NOS TRATAMENTOS COM LÍPASE DE *Rhizopus oryzae*

Fatores	Efeito^a	Erro Padrão	t (3)	p-valor*
Média	67,37	1,08	62,14	0,000009
Concentração enzimática (mg/mL)	9,78	2,87	3,41	0,042156
Tempo (h)	-2,53	2,87	-0,88	0,442682
Concentração enzimática (mg/mL) x Tempo (h)	-7,02	2,87	-2,45	0,091880

^a Os efeitos são apresentados em mg/g de lipídio; * Valor significativo quando $p \leq 0,05$

Observando a Tabela 4, nota-se que a concentração enzimática apresentou efeito positivo sobre a liberação de ácidos graxos de cadeia curta, indicando que a passagem do nível inferior para o nível superior da faixa estudada resultou em um acréscimo de 9,78 mg/g lipídio.

Para o fator tempo, observa-se um efeito negativo (-2,53 mg/g) sobre hidrólise do triacilglicerol, embora não significativo na faixa estudada, o qual também influenciou na interação das variáveis, pois, mesmo com a concentração enzimática no nível superior, o efeito negativo do tempo de hidrólise predominou, demonstrando uma diminuição de 7,02 mg/g de lipídio (efeito de interação entre concentração e tempo de hidrólise) durante a lipólise.

Avaliando individualmente os ácidos graxos, nota-se que não houve diferença para o ácido butírico (C 4:0) e capróico (C 6:0), dado que corrobora os resultados de Oba e Wilthol (1994). Para Wang e Xu (2009), esses ácidos graxos são considerados os principais responsáveis pelo aroma, os quais são encontrados quase que exclusivamente nas posições *sn-1* e *sn-3*, sendo a lipase de *Rhizopus*

oryzae citada por Paula (2008), como altamente seletiva nesta posição da cadeia carbônica. Entretanto, Saxena et al. (1999), informam que as lípases da espécie *Rhizopus* apresentam atividade máxima para os ácidos graxos caprílico (C 8:0) e cáprico (C 10:0), o que pode ser constatado neste trabalho para o tratamento (MR2), que diferiu da manteiga padrão quanto a esses ácidos graxos.

Tendo-se em vista a enorme complexidade dos lipídios presentes no leite com relação à composição dos ácidos graxos e suas posições no triacilglicerol, acredita-se que a hidrólise pode ser distinta, dependendo das propriedades químicas da gordura.

Esses dados levam a postular que, o aroma em produtos lácteos não pode ser mensurado apenas pela quantidade de ácidos graxos expressos individualmente, sendo necessário atribuir-se a devida importância à somatória total dos ácidos graxos de cadeia curta após a hidrólise do triacilglicerol. O propósito deste trabalho foi verificar a hidrólise dos ácidos graxos de cadeia curta pela ação de lípases microbianas, entretanto, é sabido que estes ácidos graxos voláteis podem atuar como precursores na formação de produtos secundários do processo de lipólise, como formação de cetonas e lactonas que contribuem para o sabor final da gordura do leite (FEITOSA, 2009; JAEGER e REETZ, 1998).

O tempo de incubação superior a 8 h promoveu menor produção dos ácidos graxos de cadeia curta nos tratamentos adicionados de lípase de *Rhizopus oryzae* sendo constatada a mesma tendência nos ensaios preliminares da atividade hidrolítica em azeite de oliva. Segundo Regado et al. (2007), a hidrólise da gordura do leite prosseguiu durante as primeiras duas h, sendo as lípases provavelmente inibidas pelo produto formado durante a reação ou ainda devido ao baixo pH do substrato.

Inicialmente parece ser contra intuitivo o fato de que o maior tempo de reação produza menor quantidade de ácidos graxos livres, mas conclui-se que estes ácidos graxos mesmo que continuem a ser produzidos com maior tempo de reação, podem estar participando de outras reações paralelas e sendo consumidos e, por isso, sua concentração não aumenta.

Com relação à hidrólise enzimática dos tratamentos utilizando a lípase de *Thermomyces lanuginosus* (Tabela 3), pode-se observar que esta enzima não produziu diferenças significativas na concentração de ácidos graxos de cadeia curta na manteiga lipolisada nas condições testadas de concentração enzimática, tempo de hidrólise, e temperatura de 20 °C, quando comparada à manteiga padrão (MP).

Com base na análise estatística dos tratamentos enzimáticos foi realizada a análise de efeitos das duas variáveis estudadas, para a enzima *Thermomyces lanuginosus*, e os resultados são apresentados na Tabela 5.

Pode-se verificar que a variável concentração enzimática apresentou efeito negativo sobre a liberação de ácidos graxos de cadeia curta, indicando que a passagem do nível inferior para o superior resultou em uma diminuição de 0,50 mg/g de lipídio nos tratamentos de manteiga.

Para o fator tempo, observa-se um efeito positivo sobre a hidrólise do triacilglicerol, embora não significativo na faixa estudada, demonstrando um aumento de 0,56 mg de ácidos graxos de cadeia curta por g de lipídio durante a passagem do nível inferior para o nível superior.

TABELA 5: EFEITO DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO (2²) SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA (mg/g) NOS TRATAMENTOS COM LÍPASE DE *Thermomyces lanuginosus*

Fatores	Efeito^a	Erro Padrão	t (3)	p-valor*
Média	63,42	0,29	216,37	0,000000
Concentração enzimática (mg/mL)	-0,50	0,78	-0,65	0,561385
Tempo (h)	0,56	0,78	0,73	0,519022
Concentração enzimática (mg/mL) x Tempo (h)	-0,02	0,78	-0,02	0,985784

^a Os efeitos são apresentados em mg/g de lipídio; * Valor significativo quando $p \leq 0,05$

Com relação à hidrólise dos ácidos graxos, houve diferença significativa para o ácido láurico (C 12:0) em comparação a amostra padrão (Tabela 3), sendo condizente com os dados apresentados por Regado et al. (2007). Neste sentido, Saxena et al. (1999), relatam a importância de substratos ricos neste ácido graxo para a alta atividade hidrolítica da *Thermomyces lanuginosus*. Foi observado de forma qualitativa, que os tratamentos de manteiga adicionados desta lipase apresentaram um odor similar a queijo, o que pode ter relação com a hidrólise do ácido graxo de cadeia média (C 12:0).

Realizando uma análise prévia do teor de umidade nos tratamentos de manteiga adicionada desta lipase (dados não visualizados), observou-se menor percentual, $10,13 \pm 0,75$ % (média dos tratamentos), quando comparada às amostras de manteiga adicionada da lipase de *Rhizopus oryzae* ($15,58 \pm 0,18$ %). A umidade nas amostras de manteiga pode ter influenciado a atividade enzimática da lipase de *Thermomyces lanuginosus* expostas a um longo período de incubação, indicando um possível deslocamento do equilíbrio da reação, no sentido da síntese de ésteres.

Tendo em vista a análise dos efeitos dos fatores estudados e a comparação dos ácidos graxos de cadeia curta liberados durante a hidrólise, nota-se que os tratamentos utilizando *Thermomyces lanuginosus* não produziram respostas significativas na hidrólise da manteiga.

A lipase de *Thermomyces lanuginosus* foi considerada inadequada para elaboração da manteiga lipolisada nas condições de concentração enzimática e tempo de hidrólise utilizados, uma vez que os tratamentos não apresentaram resposta significativa na liberação dos ácidos graxos de cadeia curta, quando comparados com a amostra padrão.

3.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DAS FORMULAÇÕES DE MANTEIGA

Os resultados das análises físico-químicas de pH, acidez, umidade, lipídios, sólidos totais e sólidos não gordurosos, cinzas, cloretos e proteínas das formulações de manteiga são apresentados na Tabela 6.

Quanto ao pH, as amostras apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey e o menor valor encontrado foi para a formulação maturada ($5,58 \pm 0,03$) devido ao processo de fermentação com culturas lácticas.

Quanto à acidez, as amostras apresentaram diferenças entre si, com dados superiores ao estipulado pela legislação vigente, sendo ($4,30 \pm 0,03$ %) para a formulação lipolisada e ($3,70 \pm 0,18$ %) para a maturada. A amostra de manteiga lipolisada, também obteve maior média para ácidos graxos livres ($1,71 \pm 0,01$ %), o que pode estar associado à hidrólise enzimática e conseqüente aumento no teor de ácidos graxos de cadeia curta, contribuindo para a elevação da acidez nesta formulação.

Com relação à umidade, a amostra de manteiga maturada diferiu significativamente das demais e, do mesmo modo que aquela tratada com enzima ($16,55 \pm 1,08$ %), pois estas apresentaram-se com teor de umidade acima do permitido pela legislação. Para a formulação lipolisada, o aumento no teor de umidade pode ser explicado pela adição de 2 % da solução enzimática sobre a manteiga.

Para o teor de lipídios, sólidos totais e sólidos não gordurosos, houve diferença significativa entre os resultados das amostras controle e lipolisada. Porém, todas as amostras apresentaram valores condizentes com a legislação quanto ao teor mínimo de lipídios e conteúdo máximo de extrato seco desengordurado, indicando boas condições de processamento da manteiga e representando pequenas perdas de gordura no leiteiro.

Quanto aos valores de cinzas, a formulação padrão diferiu das demais e apresentou maior média ($2,09 \pm 0,09$ %), o que pode ser relacionado ao menor percentual de umidade encontrado. Entretanto, quando observado o nível de cloretos, a amostra comercial mostrou quantidade superior às demais ($1,61 \pm 0,01$ %). Contudo, todas as formulações mostraram-se em conformidade com a legislação vigente (BRASIL, 1996).

Houve diferença quanto ao teor protéico e observou-se que a formulação lipolisada obteve maior percentual para este parâmetro ($0,58 \pm 0,01$ %), o que pode ter sido influenciado pela adição de solução enzimática na concentração de 45 mg/mL na manteiga.

Para as análises de ácidos graxos livres, índice de iodo, índice de saponificação, índice de peróxidos e diacetil, os resultados estão apresentados na Tabela 7.

Observou-se que, para os ácidos graxos livres, as amostras de manteiga diferiram entre si. Entretanto, não foram verificadas diferenças entre as formulações quanto ao índice de iodo, as quais apresentaram valores em conformidade com o estipulado pela legislação que permite 28 a 38 g de iodo em 100g de gordura láctea (BRASIL, 1996). Estes dados também são similares aos encontrados por Augusta e Santana (1998) e Nassu e Lima (2004).

Para o índice de saponificação, a faixa estipulada pela Portaria nº 146 de 1996 (BRASIL, 1996) é de 218 a 235 g. Observando-se os dados encontrados neste trabalho, nota-se que todas as amostras de manteiga apresentaram-se abaixo do valor preconizado pela legislação de gordura láctea.

Como os tratamentos de manteiga padrão e lipolisada foram avaliados uma semana após o seu preparo, não foi possível detectar a presença de peróxidos. Do mesmo modo, este parâmetro não foi identificado na amostra comercial, a qual foi avaliada no 3º mês de fabricação, sendo similar às amostras analisadas por Krause et al. (2008), que identificaram a formação de peróxidos após 6 meses de vida útil.

Não foi observada entre as amostras, a formação do composto aromático diacetil. Na manteiga maturada, pode ter ocorrido à conversão do diacetil a 2-3 *butanodiol*, um composto desprovido de aroma que resulta da baixa vida útil do

diacetil, após 24 h da elaboração da manteiga (CARVALHO, 1999). Krause, Lopetcharat e Drake (2007) também observaram a ausência deste composto durante a avaliação sensorial em manteiga maturada. Entretanto, como a técnica de medida do diacetil utilizada determina apenas a ausência ou presença do diacetil pela formação de um composto de coloração vermelha, o composto poderia estar presente em níveis abaixo do limite da determinação qualitativa realizada.

3.5 ANÁLISES INSTRUMENTAIS E DE ATIVIDADE DE ÁGUA DAS FORMULAÇÕES DE MANTEIGA

Os resultados das análises de cor, textura e atividade de água estão apresentados na Tabela 8. Para as características de cor, a amostra padrão diferiu quanto à luminosidade (L) com $80,62 \pm 0,29$, enquanto o valor de “ a ” mostrou-se diferente para a amostra lipolisada ($-8,22 \pm 0,04$). Krause et al. (2008), obteve uma manteiga de coloração mais escura, que pode ter sido influenciada pelos diferentes aspectos químicos da gordura quando produzida em regiões que utilizam sistema distintos de alimentação do gado leiteiro. O valor de “ b ” foi diferente para a manteiga comercial maturada ($34,69 \pm 0,41$), que apresentou tonalidade mais amarela.

Nota-se que, a formulação maturada diferiu significativamente das demais, apresentando menor valor para consistência (3281 gf/cm^2). Esse dado pode estar relacionado ao processamento e a composição química da gordura utilizada no preparo deste produto, tendo em vista que a concentração de ácidos graxos monoinsaturados (mg/g de lipídio), foi superior às demais formulações de manteiga, ($341,41 \pm 5,54 \text{ mg/g}$). Observou-se que as formulações de manteiga padrão e hidrolisada, as quais apresentaram aumento na consistência (gf/cm^2), também apresentaram maiores notas para o atributo textura durante a avaliação sensorial com julgadores não treinados.

Com relação à atividade de água, a amostra comercial foi estatisticamente diferente das demais ($0,93 \pm 0,01$), a qual pode ter influência do processo de malaxagem e conseqüente expulsão da água remanescente da lavagem dos grãos de manteiga.

Quanto os resultados da análise cromatográfica, não foram observados diferenças significativas para aos ácidos graxos totais, os quais apresentaram concentrações que variaram de $77,26 \pm 0,76 \text{ g}$ (MR) a $78,29 \pm 0,14 \text{ g}$ (MP) em 100 g de manteiga conforme demonstrado na Tabela 9.

Para os ácidos graxos de cadeia curta, a formulação adicionada de lípase microbiana diferiu das demais, uma vez que a hidrólise enzimática nos lipídios ocorreu nos ácidos graxos com até 10 carbonos. A formulação lipolisada ($77,68 \pm 2,71 \text{ mg/g}$) apresentou média superior às amostras padrão e maturada, o que pode ter influenciado os julgadores durante a avaliação sensorial para os atributos de sabor e aroma.

TABELA 6: PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE pH, ACIDEZ, UMIDADE, CINZAS, LIPÍDIOS, EXTRATO SECO TOTAL, EXTRATO SECO DESENGORDURADO, PROTEÍNAS E CLORETOS DAS FORMULAÇÕES DE MANTEIGA

Formulações*	pH	Acidez (% SAN***)	Umidade (%)	Cinzas (%)	Lipídios (%)	EST (%)	ESD (%)	Proteína (%)	Cloretos (%)
MP	6,37 ± 0,07 ^a	2,03 ± 0,09 ^c	14,67 ± 0,60 ^b	2,09 ± 0,09 ^a	83,88 ± 0,37 ^a	85,33 ± 0,60 ^a	1,46 ± 0,24 ^a	0,42 ± 0,01 ^b	1,55 ± 0,01 ^b
MR	5,90 ± 0,02 ^b	4,30 ± 0,03 ^a	16,55 ± 1,08 ^b	1,62 ± 0,23 ^b	82,17 ± 0,96 ^b	83,45 ± 1,08 ^a	1,22 ± 0,08 ^a	0,58 ± 0,01 ^a	1,50 ± 0,01 ^c
MM	5,58 ± 0,03 ^c	3,70 ± 0,18 ^b	16,64 ± 0,44 ^a	1,58 ± 0,10 ^b	82,37 ± 0,46 ^a	83,36 ± 0,44 ^b	0,99 ± 0,06 ^b	0,38 ± 0,02 ^c	1,61 ± 0,01 ^a
Legislação**	---	Max.3,00 %	Max.16,00 %	---	Mín.80,00 %	----	Max.2,00 %	---	Max.2,00 %

* MP: Manteiga Padrão (sem adição de lipase); MR: Manteiga Lipolisada (adicionada de lipase de *Rhizopus oryzae*); MM: Manteiga Maturada (Comercial)

** Portaria nº146 de1996 (BRASIL, 1996) ***Solutio Alcalino Normal

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey (p≤0,05).

TABELA 7: PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES, ÍNDICE DE SAPONIFICAÇÃO, ÍNDICE DE IODO, ÍNDICE DE PERÓXIDOS E DIACETIL DAS FORMULAÇÕES DE MANTEIGA

Formulações*	% de AGL	Índice de Saponificação (g/100g)	Índice de Iodo (g/100g)	Índice de Peróxido (meq/kg)	Diacetil
MP	0,80 ± 0,04 ^c	181,21 ± 1,28 ^a	35,31 ± 1,19 ^a	N.d***	N.d***
MR	1,71 ± 0,01 ^a	182,95 ± 1,61 ^a	35,11 ± 0,41 ^a	N.d***	N.d***
MM	1,48 ± 0,08 ^b	161,05 ± 0,85 ^b	34,47 ± 1,11 ^a	N.d***	N.d***
Legislação**	---	218 a 235	28 a 38	Máx 1	---

* MP: Manteiga Padrão (sem adição de lipase); MR: Manteiga Lipolisada (adicionada de lipase de *Rhizopus oryzae*); MM: Manteiga Maturada (Comercial);

** Portaria nº146 de1996 (BRASIL, 1996) ***N.d: Não Detectado

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey (p≤0,05).

TABELA 8: ANÁLISE DE COR, TEXTURA E DE ATIVIDADE DE ÁGUA DAS FORMULAÇÕES DE MANTEIGA

Formulações*	Cor			Textura Consistência (gf/cm ²)	Atividade Água (Aw)
	L		b		
MP	80,62 ± 0,29 ^a	-8,67 ± 0,20 ^b	37,72 ± 1,12 ^a	8584 ± 103,25	0,88 ± 0,01 ^b
MR	85,25 ± 1,39 ^b	-8,22 ± 0,04 ^{ab}	37,27 ± 0,54 ^{ab}	94523 ± 113,24	0,89 ± 0,01 ^b
MM	85,18 ± 0,50 ^b	-8,50 ± 0,03 ^b	34,69 ± 0,41 ^b	3281 ± 100,60	0,93 ± 0,01 ^a

* MP: Manteiga Padrão (sem adição de lipase); MR: Manteiga Lipolisada (adicionada de lipase de *Rhizopus oryzae*); MM: Manteiga Maturada (Comercial)

L : luminosidade; a: tonalidades de vermelho a verde; b: tonalidades de amarelo a azul.

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey (p≤0,05).

Quanto aos ácidos graxos saturados, a amostra lipolisada apresentou maior média ($618,76 \pm 5,20$ mg/g), diferindo das demais amostras ao nível de 5 % de significância. Entre os ácidos graxos saturados, nota-se que o ácido palmítico prevaleceu em todas as formulações, sendo observado em 100 g de manteiga concentrações que variaram de $24,11 \pm 0,43$ g (31,21 % dos ácidos graxos totais) a $28,81 \pm 0,40$ g (37,08 % dos ácidos graxos totais) na amostra maturada e hidrolisada, respectivamente. Tais resultados corroboram os dados de Jensen (2002), Ract e Gioielli (2008) e Nunes, Paula e Castro (2010), que citam este ácido graxo como majoritário na gordura do leite.

Para os ácidos graxos monoinsaturados, observou-se média estatisticamente superior para a formulação de manteiga maturada ($341,41$ mg/g \pm 5,54). Quanto aos ácidos graxos poliinsaturados, as formulações apresentaram diferenças entre si, com resultado superior para a formulação hidrolisada ($10,36$ mg/g \pm 0,32). Observando os ácidos graxos insaturados, nota-se que ácido oléico apresentou concentrações elevadas em todas as formulações, com quantidades equivalentes a $16,72$ g \pm 0,21 (21,52 % dos ácidos graxos totais), $20,28$ g \pm 0,26 (25,90 % dos ácidos graxos totais) e $22,47$ g \pm 0,59 (29,08 % dos ácidos graxos totais) nas formulações, hidrolisada, padrão e maturada respectivamente, considerando 100 g de manteiga.

A formulação maturada (marca comercial) apresentou menor média para ácidos graxos *trans* ($23,97 \pm 0,71$ mg/g) e com relação ao ácido linoléico conjugado (CLA), as formulações não diferiram entre si, ao nível de 5 % de significância.

3.6 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS E SENSORIAL DAS FORMULAÇÕES DE MANTEIGA

As amostras submetidas à análise microbiológica estavam de acordo com a RDC nº12 de 2001, com valores inferiores ao limite preconizado de 10 NMP/g para Coliformes a 45 °C e 10^2 UFC/g para *Estafilococcus coagulase positiva*. Para Coliformes a 35 °C não há limites preconizados, sendo que os valores encontrados foram < 10 NMP/g. Já para a pesquisa de *Salmonella* em 25 g, as amostras apresentaram ausência deste micro-organismo, procedendo-se com a análise sensorial das formulações.

Na Tabela 10, estão apresentadas as médias das notas atribuídas pelos julgadores não treinados, por intermédio do teste de Escala Hedônica de 9 pontos, e o Índice de Aceitabilidade calculado para a amostra de manteiga lipolisada.

Para o atributo sabor, avaliado, houve diferença significativa para todas as amostras e a maior média foi concedida à formulação adicionada de lipase microbiana ($7,58 \pm 1,12$). Este dado ressalta que a hidrólise dos ácidos graxos de cadeia curta repercutiu no sabor do produto, sendo perceptível esta diferença quando comparada à amostra controle no teste sensorial aplicado.

TABELA 9- ANÁLISE DE ÁCIDOS GRAXOS NAS FORMULAÇÕES DE MANTEIGA

Ácidos Graxos	Formulações*					
	MP		MR		MM	
	mg/g	g/100 g	mg/g	g/100 g	mg/g	g/100 g
C 4:0	9,99 ± 0,41	0,84 ± 0,03	12,30 ± 0,43	1,01 ± 0,05	9,65 ± 0,40	0,80 ± 0,04
C 6:0	13,14 ± 0,60	1,10 ± 0,05	16,29 ± 0,57	1,34 ± 0,05	13,04 ± 0,31	1,07 ± 0,03
C 8:0	11,21 ± 0,50	0,94 ± 0,04	14,05 ± 0,49	1,15 ± 0,06	10,69 ± 0,21	0,88 ± 0,02
C 10:0	28,04 ± 1,01	2,35 ± 0,08	35,04 ± 1,22	2,88 ± 0,13	25,63 ± 0,64	2,11 ± 0,06
C 12:0	2,84 ± 0,20	0,24 ± 0,02	2,89 ± 0,14	0,24 ± 0,01	31,26 ± 0,92	2,58 ± 0,09
C 14:0	32,88 ± 0,57	2,76 ± 0,04	40,83 ± 0,98	3,35 ± 0,11	47,93 ± 7,43	3,95 ± 0,61
C 14:1n-9	0,79 ± 0,01	0,07 ± 0,00	0,95 ± 0,03	0,08 ± 0,00	6,45 ± 1,49	0,53 ± 0,12
C 14:1n-7	0,13 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,62 ± 0,29	0,05 ± 0,02	13,61 ± 1,56	1,12 ± 0,13
C 14:1n-5	0,73 ± 0,01	0,06 ± 0,00	1,11 ± 0,04	0,09 ± 0,00	9,46 ± 1,57	0,78 ± 0,13
C 15:0	0,81 ± 0,01	0,07 ± 0,00	1,07 ± 0,03	0,09 ± 0,00	11,91 ± 0,24	0,98 ± 0,02
C 15:1n-5	1,48 ± 0,01	0,12 ± 0,00	1,87 ± 0,07	0,15 ± 0,01	5,46 ± 1,56	0,45 ± 0,13
C 16:0	363,62 ± 3,29	26,03 ± 0,39	350,64 ± 1,48	28,81 ± 0,40	292,55 ± 4,42	24,11 ± 0,43
C 16:1n-9	12,80 ± 0,03	1,07 ± 0,00	15,59 ± 0,29	1,28 ± 0,02	6,11 ± 1,61	0,50 ± 0,13
C 16:1n-7	5,81 ± 0,05	0,49 ± 0,01	6,78 ± 0,15	0,56 ± 0,02	5,13 ± 1,59	0,42 ± 0,13
C 16:1n-5	10,60 ± 0,09	0,89 ± 0,01	13,44 ± 0,29	1,10 ± 0,03	18,88 ± 0,36	1,56 ± 0,03
C 17:0	2,74 ± 0,03	0,23 ± 0,00	3,10 ± 0,08	0,25 ± 0,00	6,52 ± 0,16	0,54 ± 0,01
C 18:0	117,96 ± 0,14	9,89 ± 0,05	142,17 ± 1,05	11,68 ± 0,14	110,88 ± 3,37	9,14 ± 0,25
C 18:1n-9t	47,07 ± 0,12	8,14 ± 0,05	48,77 ± 1,70	4,01 ± 0,18	20,55 ± 0,57	1,69 ± 0,04
C 18:1n-9	241,80 ± 2,16	20,28 ± 0,26	203,55 ± 0,69	16,72 ± 0,21	272,70 ± 5,65	22,47 ± 0,59
C 18:1n-7	15,73 ± 0,11	1,32 ± 0,01	19,15 ± 0,67	1,57 ± 0,07	3,61 ± 0,07	0,30 ± 0,01
C 18:2 t	2,84 ± 0,02	0,24 ± 0,00	3,47 ± 0,06	0,29 ± 0,01	3,42 ± 0,13	0,28 ± 0,01
C 18:2n-6	8,80 ± 0,04	0,74 ± 0,00	10,36 ± 0,32	0,85 ± 0,02	6,89 ± 0,75	0,57 ± 0,06
C 20:0	0,51 ± 0,06	0,04 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,03 ± 0,00	4,08 ± 0,14	0,34 ± 0,01
C 18:2c9t11-CLA	1,08 ± 0,03	0,09 ± 0,00	1,03 ± 0,04	0,08 ± 0,00	1,09 ± 0,01	0,09 ± 0,00
TOTAL	933,41 ± 3,62 ^a	78,29 ± 0,14	945,46 ± 7,19 ^a	77,69 ± 1,36	937,51 ± 6,92 ^a	77,26 ± 0,76
AGCC ¹	62,38 ± 2,52 ^b	5,23 ± 0,19	77,68 ± 2,71 ^a	6,38 ± 0,29	59,00 ± 1,26 ^b	4,86 ± 0,13
AGS ²	583,74 ± 4,47 ^b	48,96 ± 0,24	618,76 ± 5,20 ^a	50,84 ± 0,89	564,14 ± 1,18 ^c	46,49 ± 0,38
AGMI ³	289,87 ± 1,92 ^b	24,31 ± 0,30	263,06 ± 0,65 ^c	21,61 ± 0,31	341,41 ± 5,54 ^a	28,13 ± 0,50
AGPI ⁴	8,80 ± 0,03 ^b	0,74 ± 0,00	10,36 ± 0,32 ^a	0,85 ± 0,02	6,89 ± 0,75 ^c	0,57 ± 0,06
TOTAL <i>trans</i> ⁵	49,92 ± 0,11 ^a	4,19 ± 0,03	52,24 ± 1,72 ^a	4,29 ± 0,19	23,97 ± 0,71 ^b	1,98 ± 0,05
TOTAL CLA ⁶	1,08 ± 0,02 ^a	0,09 ± 0,00	1,03 ± 0,04 ^a	0,08 ± 0,00	1,09 ± 0,01 ^a	0,09 ± 0,00

*MP: Manteiga Padrão (sem adição de lipase); MR: Manteiga Lipolisada (adicionada de lipase de *Rhizopus oryzae*); MM: Manteiga Maturada (Comercial);

¹ Ácidos Graxos de Cadeia Curta; ² Ácidos Graxos Saturados; ³ Ácidos Graxos Monoinsaturados; ⁴ Ácidos Graxos Poliinsaturados; ⁵ Ácidos Graxos Trans; ⁶ Ácido Linoléico Conjugado (CLA)
Médias marcadas com letras iguais na mesma linha não diferem entre si, pelo Teste de Tukey (p≤0,05).

TABELA 10 - AVALIAÇÃO DOS ATRIBUTOS SENSORIAIS DAS FORMULAÇÕES DE MANTEIGA

Formulações*	Atributos Sensoriais				
	Sabor	Odor	Aroma	Cor	Textura
MP	7,16 ± 1,23 ^b	6,92 ± 1,38 ^a	6,91 ± 1,19 ^b	7,16 ± 1,55 ^b	7,27 ± 1,31 ^a
MR	7,58 ± 1,12 ^a	7,13 ± 1,28 ^a	7,35 ± 1,26 ^a	7,52 ± 1,13 ^a	7,35 ± 1,42 ^a
MM	5,91 ± 1,91 ^c	6,52 ± 1,54 ^b	6,12 ± 1,78 ^c	7,10 ± 1,70 ^b	6,71 ± 1,82 ^b
IA** (%)	84,25	79,22	81,61	83,53	81,69

* MP: Manteiga Padrão (sem adição de lipase); MR: Manteiga Lipolisada (adicionada de lipase de *Rhizopus oryzae*); MM: Manteiga Maturada (Comercial)

**Índice de Aceitabilidade da Formulação lipolisada (MR)

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey (p≤0,05).

Quanto ao odor, a manteiga maturada diferiu das demais, sendo observado menor média entre todas as formulações (6,52 ± 1,54). Wang e Xu (2009) observaram que, os ácidos graxos butírico (C 4:0) e capríco (C 6:0) são responsáveis pelo odor de nata em gordura de leite lipolisada, os quais foram relatados por alguns julgadores na amostra adicionada de lipase microbiana, o que pode indicar a ação da lipase na hidrólise da manteiga.

O aroma da manteiga adicionada de lipase de *Rhizopus oryzae* também diferiu das demais formulações, com média superior para este atributo (7,35 ± 1,26). Esses dados são condizentes com os encontrados por Akin et al. (2003), quando identificou relação positiva entre a adição de lipase pregástrica em queijos de massa branca e maior nota para o atributo aroma. Do mesmo modo, Oliveira (2010), mencionou bons resultados no uso de lipase de *Penicillium roqueforti* na produção de aroma em queijos.

A cor da formulação de manteiga hidrolisada (7,52 ± 1,13) diferiu significativamente das demais, contudo, não foi verificada diferença significativa entre as amostras maturada e padrão, durante o teste de Escala Hedônica. Estes dados confrontam-se com os obtidos na análise instrumental de cor, tendo o grupo de julgadores não treinados observado diferença entre as amostras lipolisada e comercial, porém esta diferença não foi percebida entre a formulação maturada e padrão.

Quanto ao atributo textura, a manteiga maturada apresentou diferença significativa (6,71 ± 1,82), a qual foi mencionada com aspecto de margarina por alguns participantes. A textura da manteiga apresenta relação com a nutrição do gado leiteiro, sendo que vários estudos já foram propostos para melhoria deste atributo, a citar os de Bobe et al. (2007), Hurtaud e Peyraud (2007) e Hurtaud et al. (2010). Todos estes trabalhos têm demonstrado um menor nível de dureza da manteiga, no caso de haver enriquecimento da alimentação animal com ácidos graxos insaturados.

Quando calculado o índice de aceitabilidade, das formulações, a amostra lipolisada, apresentou resultados superiores às demais em todos os atributos avaliados, principalmente para o aroma com 81,61 % de aceitação, conforme demonstrado na Tabela 10. Esses resultados postulam que a lipase microbiana de *Rhizopus oryzae* nas condições de concentração enzimática e tempo de hidrólise estudado favoreceu as características sensoriais da manteiga, representando um atrativo para maior aquisição deste produto.

4 CONCLUSÃO

A adição de solução de lipase à manteiga elevou o seu teor de umidade e acidez, mas não alterou os demais parâmetros físico-químicos e instrumentais. Os tratamentos de manteiga adicionados da lipase de *Thermomyces lanuginosus* não permitiram a produção dos ácidos graxos de cadeia curta nas condições de tempo e concentração enzimática testados, entretanto, esta enzima apresentou maior produção de ácido láurico. Para a lipase de *Rhizopus oryzae*, o tratamento que apresentou maior concentração de ácidos graxos de cadeia curta foi aquele utilizando 2 mL de solução enzimática na concentração de 45 mg/mL/100 g de manteiga e 8 h de hidrólise a 20 °C. Foram obtidos resultados satisfatórios para a hidrólise dos triacilgliceróis que levaram à intensificação dos atributos sensoriais, com ênfase para o aroma de manteiga.

ABSTRACT

BUTTER PRODUCTION IN THE PRESENCE OF MICROBIAL LIPASE FOR AROMA ENHANCEMENT

A Full Factorial Design was applied to the lipolysis of butter to determine the influence of hydrolysis time and concentration of lipases on the production of short chain fatty acids (SCFA). The enzymes from *Rhizopus oryzae* and *Thermomyces lanuginosus* were used. The treatment that gave higher amounts of SCFA was chosen for preparing a butter formulation used latter for sensory analysis and comparison with standard and matured commercial butter. Analyzes were performed for characterization of lipases, cream, buttermilk and butter. For butter, tests included determination of color, texture, gas chromatography analyses, water activity, and microbiological assays. Sensory analysis was performed with untrained judges, and the rate of acceptability of attributes was calculated. Tests with lipase from *Thermomyces* were not significant for production of SCFA in the conditions of time and enzyme concentration tested. The lipase of *Rhizopus* gave higher amount of SCFA in the condition of 90 mg of enzyme/100 g of butter and hydrolysis period of 8 h. The addition of the enzyme solution to butter altered its moisture content and acidity, while the other parameters were maintained in accordance with the law. The matured butter formulation presented yellow coloration, greater consistency and lower water activity while the formulation with added *Rhizopus* lipase received grades higher than the other samples at the sensory evaluation for flavor, aroma and color, and greater acceptability index for all sensory attributes, demonstrating the contribution of SCFA for the acceptance of butter.

KEYWORDS: FATTY ACIDS, AROMA, RHIZOPUS ORYZAE

REFERÊNCIAS

1. AKIN, N.; AYDEMIR, S.; KOÇAK, C.; YILDIZ, M.A. Changes of free fatty acid contents and sensory properties of white pickled cheese during ripening. **Food Chemistry**, v.80, p.77-83, 2003.
2. AUGUSTA, I.M.; SANTANA, D.M.N. Avaliação da Qualidade de Manteigas Tipo Extra Comercializadas no Estado do Rio de Janeiro. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n. 4, p.379-381, Out./Dez, 1998.
3. BABICZ, I. **Produção de Diacilgliceróis Via Hidrólise Enzimática do Óleo de Palma**. Rio de Janeiro, 2009. 92f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Universidade Federal do Rio de Janeiro-Escola de Química.
4. BLIGH EG, DYER WJ. A rapid method of total lipid. Extraction and purification. **Canadian Journal Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.
5. BOBE, G.; ZIMMERMAN, S.; HAMMOND, E.G.; FREEMAN, A.E.; PORTER, P.A.; LUHMAN, C.M.; BEITZ, D.C. Butter Composition and Texture from Cows with Different Milk Fatty Acid Compositions Fed Fish Oil or Roasted Soybeans. **Journal Dairy Science**, v.90, p.2596–2603, 2007.
6. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto-Lei nº 30.691, de 29 de março de 1952. Aprova novo regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 07 de julho de 1952.
7. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 2 de julho de 1998.
8. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 68, de 12 de dezembro de 2006. Dispõe dos Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 14 de dezembro de 2006.
9. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 62 de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 18 de agosto de 2003.
10. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria N° 146 de 07 de março de 1996. Dispõe de Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade da Manteiga e Gordura Láctea. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 11 de março de 1996.

11. BUTTER BUDS. **Aromas Lácteos Naturais para Indústria de Alimentos**. Disponível em: <
www.globalfood.com.br/./ButterBuds_Texto_completo_final_05_06.pdf> Acesso
em:19/05/2010.
12. CARVALHO, J.C.de. **Produção de diacetil e acetoína**: Desenvolvimento de um meio de cultivo e avaliação de fatores que alteram o crescimento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *Diacetylactis*. Florianópolis, 1999.111f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina - Centro Tecnológico.
13. CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; Modificação de Óleos e Gorduras por Biotransformação. **Química Nova**, v.27, n.1, p.146-156, 2004.
14. COSTA, E.N. **Influência do Tratamento Térmico Sobre os Ácidos Graxos em Leite Bovino**. Itapetinga, 2011. 47f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Área de Concentração em Engenharia de Processos de Alimentos Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.
15. COSTA, V. E. U.; AMORIM, H. L. N. O Emprego de Lípases como Agentes de Resolução Cinética de Enantiômeros em Síntese Orgânica: Aspectos Gerais sobre a Influência do Solvente. **Química Nova**, v. 22, p. 863-873, 1999.
16. FEITOSA, I.C. **Produção de Enzimas Lipolíticas Utilizando Bactéria Isolada de Solo com Histórico de Contato com Petróleo em Fermentação Submersa**. Aracaju-SE, 2009. 103f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos), Universidade de Tiradentes.
17. FRANCO, M.R.B. **Aroma e Sabor de Alimentos**: Temas Atuais. São Paulo: Varela, 2003. 246p.
18. GANDHI, N.N. Application of Lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.74, n. 6, p. 621-634, 1997.
19. GONÇALVES, F.A.G. **Produção de Lípase Extracelular por Leveduras em Cultivo Submerso**. Belo Horizonte, 2007. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais.
20. HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, v.22, n.6, p.475-600, 1973.
21. HASAN,F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial Application of Microbial Lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p.235–251, 2006.
22. HETTINGA, David. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. 6^a ed, v. 6, New Jersey: Fereidoon Shahidi, 2005. 60p.
23. HURTAUD, C.; FAUCON, F.; COUVREUR, S.; PEYRAUND, J-L. Liner Relationship Between Increasing amounts of Extruded Linseed in Dairy Cow Diet

and Milk Fatty Acid Composition and Butter Properties. **Journal Dairy Science**, v. 93, p. 1429- 1443, 2010.

24. HURTAUD, C.; PEYRAUD, J.L. Effects of Feeding Camelina (Seeds or Meal) on Milk Fatty Acid Composition and Butter Spreadability. **Journal Dairy Science**, v. 90, p. 5134-5145, 2007.

25. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análises de alimentos**. 3ª ed, v. 1, São Paulo: Imprensa Oficial do Estado de São Paulo, 1985.

26. JAEGER, K.E.; REETZ, M.T. Microbial Lipases form Versatile Tools for Biotechnology. **Tibtech September Reviews**, v.16, p.396-403, 1998.

27. JENSEN, Robert. Invited Review: The Composition of Bovine Milk Lipids: January 1995 to December 2000. **Journal Dairy Science**, v. 85, p.295–350, 2002.

28. KRAUSE, A.J.; LOPETCHARAT, K.; DRAKE, M.A. Identification of the Characteristics That Drive Consumer Liking of Butter. **Journal Dairy Science**, v.90, n.5, p. 2091-2102, 2007.

29. KRAUSE, A.J.; MIRACLE, R.E.; SANDRES, T.H.; DEAN, L.L.; DRAKE, M.A. The Effect of Refrigerated and Frozen Storage on Butter Flavor and Texture. **Journal Dairy Science**, v.91, p. 455-465, 2008.

30. LI, N.; ZONG, M.H.; MA, D. *Thermomyces lanuginosus* lipase-catalyze regioselective acylation of nucleosides: Enzyme substrate recognition. **Journal of Biotechnology**, v.140, p. 250–253, 2009.

31. MARANGONI, A.G.; ROSSEAU, D. Chemical and Enzymatic Modification of Butterfat and Butterfat-canola oil Blends. **Food Research International**, v.31. n. 8, p. 595-599, 1998.

32. MEILGAARD, M.; CIVILLE, C.V.; CARR, B.T. **Evaluation Techniques Food**. 2ª ed, New York: CRC Press, 1999. 129p.

33. MONTEIRO, C.L.B. **Técnicas de Avaliação Sensorial**. 2. ed. Curitiba: CEPPA-UFPR, 1984. 101p.

34. NASSU, R.T.; LIMA, J.R. Estabilidade Oxidativa de Manteiga da Terra Acondicionada em Diferentes Embalagens. **Ciência Agrônômica**, v. 35, n.1, p. 110-115, jan/jun, 2004.

35. NETO, C.G. Subproduto Lácteo Vira na FEA Ingrediente Rico em Nutrientes. **Jornal da Unicamp**, Campinas, 2009.

36. NUNES, G.F.M.; PAULA, A.V.de.; CASTRO, H.F.de.; Modificação Bioquímica da Gordura do Leite. **Revista Química Nova**, v.33, n. 2, p.431-437, 2010.

37. OBA, T.; WITHOLT, B. Interesterification of Milk Fat with Oleic Acid Catalyzed by Immobilized *Rhizopus oryzae* Lipase. **Journal Dairy Science**, v.77, p.1790-1797, 1994.
38. OLIVEIRA, F.C.de.; **Produção de Lipase por *Penicillium roqueforti* e sua Aplicação na Obtenção de Aroma de Queijo**. Lorena, 2010. 124 f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Área de Concentração Microbiologia Aplicada, Departamento de Biotecnologia Industrial, Universidade de São Paulo - Escola de Engenharia de Lorena.
39. ORDÓÑEZ, P.J.A. **Tecnologia dos Alimentos**. Porto Alegre : Artmed, 2005.
40. PAULA, A.V.de. **Seleção de Preparações Comerciais de Lipase para a Interesterificação da Gordura do Leite com Óleo de Soja**. Lorena, 2008. 112f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química-Área de Processos Catalíticos e Biocatalíticos), Universidade de São Paulo - Escola de Engenharia de Lorena.
41. RACT, J.N.R.; GIOIELLI, L.A. Lipídios Modificados Obtidos a Partir de Gordura do Leite, Óleo de Girassol e Ésteres de Fitoesteróis para Aplicação em *Spreads*. **Química Nova**, v.31, n.8, p.1960-1965, 2008.
42. RAMPIN, M.A. **Síntese de Ésteres Etílicos Obtidos a Partir dos Óleos de Mamona e Soja Utilizando a Lipase Imobilizada de *Thermomyces lanuginosus* (LIPOZYME TL IM)**. Ribeirão Preto, 2007. 263f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Área de Concentração Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
43. REGADO, M.A.; CRISTÓVAM, B.M.; MOUTINHO, C.G.; BALCÃO, V.M.; BARROS, R.A.; FERREIRA, J.P.M.; MALCATA, F.X. Flavour development via lipolysis of milkfats: changes in free fatty acid pool. **Journal Food Science and Technology**, v.42, p. 961-968, 2007.
44. SANTOS, F.L.; SILVA, M.T.C.; LANA, R.P.de.; BRANDÃO, S.C.C.; VARGAS, L.H.; ABREU, L.R.de. Efeito da Suplementação de Lipídios na Ração Sobre a Produção de Ácido Linoléico Conjugado (CLA) e a Composição da Gordura do Leite de Vacas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30. n 6. p.1931-1938, 2001.
45. SAXENA, R.K. GHOSH, P.K; GUPTA, R.; DAVIDSON, W.S.; BRADDOO, S.; GULATI, R. Microbial Lipases: Potencial Biocatalysts for the Future Industry. **Current Science**, v.77, n.1, p.101-115, 1999.
46. SIMIONATO, J.I. **Composição Química e Quantificação de Ácidos Graxos com Ênfase ao Ácido Linoléico Conjugado (CLA) em Leites e Derivados**. Maringá, 2008. 132f. Tese (Doutorado em Química), Centro de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá.
47. SOARES, C.M.F. CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 77/79, n.2, p. 745-757, 1999.

48. SOARES, C.M.F. **Encapsulação da Enzima Lípase em Matrizes Sol-Gel e sua Aplicação em Reações de Hidrólise e Esterificação**. Maringá, 2004. 239f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Departamento de Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá.
49. STEPHANI, R.; NEVES, H.C.de.; NEVES, E.O.; SOUZA, A.B.de.; PERRONE, I.T.; SILVA, P.H.F.da. Caracterização Físico-Química do Creme de Leite UHT Comercializado no Brasil. **Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes**, v. 66, n. 379, p.25-29, mar/abr, 2011.
50. WANG, B.; XU, S. Effects of different commercial lipases on the volatile profile of lipolysed milk fat. **Flavour and Fragrance Journal**, v.24, p.335–340, Aug, 2009.
51. WILLIS, W.M.; MARANGONI, A.G. Biotechnological Strategies for the Modification of Food Lipids. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v.16, Apr, 1999.