

**ELABORAÇÃO DE QUEIJO MINAS PADRÃO
COM ADIÇÃO DE PROBIÓTICO E
PREBIÓTICO**

CELEIDE PEREIRA

2005

59090

050405

CELEIDE PEREIRA

**ELABORAÇÃO DE QUEIJO MINAS PADRÃO COM ADIÇÃO DE
PROBIÓTICO E PREBIÓTICO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora

Profa. Dra. Verônica Lobato

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2005**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Pereira, Celeide

Elaboração de queijo Minas Padrão com adição de probiótico e
prebiótico / Celeide Pereira. -- Lavras : UFLA, 2005.

115 p. : il.

Orientador: Verônica Lobato.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Queijo. 2. Fabricação. 3. Prebiotico. 4. Probiótico. 5. Alimento funcional. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-637.35

CELEIDE PEREIRA

**ELABORAÇÃO DE QUEIJO MINAS PADRÃO COM ADIÇÃO DE
PROBIÓTICO E PREBIÓTICO**

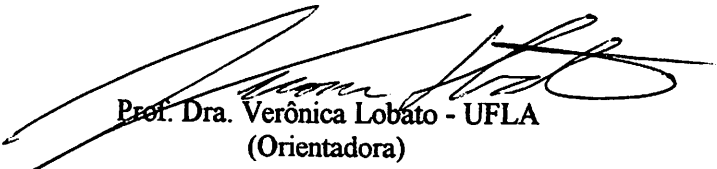
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 11 de fevereiro de 2005.

Prof. Dr. Nélio José de Andrade UFV

Prof. Dr. José Luís Contado UNINCOR

Profa. Dra. Maria de Fátima Piccolo Barcelos UFLA



Prof. Dra. Verônica Lobato - UFLA
(Orientadora)

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL**

À minha querida mãe pela incansável luta. Mesmo com sua pouca leitura e sua infundável simplicidade, sempre esteve presente com suas orações na minha caminhada,

DEDICO

Aos meus queridos irmãos, Selma, Célia, Beatriz, Graça e José Carlos, pelo constante apoio nos momentos difíceis.

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

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força nos momentos difíceis.

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

Ao Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA) pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À Profa. Dra. Verônica Lobato, do DCA/UFLA, pela orientação e auxílio na execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Luís Contado, da Universidade do Vale do Rio Verde (UNINCOR/MG), pela inestimável ajuda, orientação, preocupação, disponibilidade nas horas difíceis, amizade e constante incentivo. Valeu!

Ao Prof. Dr. Nélio José de Andrade da Universidade Federal de Viçosa (UFV/MG) e Profa. Dra. Maria de Fátima Piccolo Barcelos do DCA/UFLA, pelo apoio na realização deste trabalho

Ao Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu, do DCA/UFLA, por ter me admitido no curso de mestrado em Ciência dos Alimentos.

Ao Laticínio Verde Campo, que colaborou para a realização deste trabalho e, em especial, aos funcionários Joaquim e Maria, pela inestimável ajuda.

Ao Prof. Dr. Mário César Guerreiro, do DQI/UFLA e Prof. Dr. José Cleto da Silva Filho, do DZO/UFLA, pela inestimável ajuda.

À Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan e Técnica Maria Aparecida Gomes Souza Dias, do Laboratório de Fisiologia e Genética de Microrganismos-Sector de Microbiologia do DBI/UFLA, pela ajuda e orientação.

À Profa. Dra. Ivana Aparecida da Silveira e estagiários Edson Pablo da Silva fé e Mary Lucy Natalina de Araújo, do Laboratório de Microbiologia e Higiene de Alimentos do Centro Universitário de Lavras (UNILAVRAS/MG) pela ajuda e orientação nas análises microbiológicas.

Ao Prof. Msc. Paulo Roberto Clemente e Técnica Maria Aparecida Correia Lima, do Laboratório de Análise Sensorial do DCA/UFLA, pela ajuda e orientação nas análises sensoriais.

Aos queridos amigos Ayrton e Clédis, Magda, Sascha, Claudinho, Carla Schmidt, Márcio e Andressa, Valdomiro, Sueli, Caroline Angélico, João Borges e Débora Obrigada pela amizade, apoio e carinho.

Aos funcionários do serviço de vigilância da UFLA/MG pela paciência e boa vontade, um muito obrigado de coração.

Aos integrantes do painel de avaliação sensorial, pela disponibilidade e grande contribuição durante o treinamento e testes sensoriais.

Enfim, a todos que, de algum modo, contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO	05
2.1 Queijo	05
2.2. Queijo minas padrão	06
2.2.1 Fluxograma de fabricação do queijo minas padrão	08
2.3 Microrganismos utilizados na fabricação do queijo	08
2.3.1 Gênero <i>Lactococcus</i>	10
2.3.1.1 <i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>cremoris</i>	10
2.3.1.2 <i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i>	11
2.4 Probióticos	11
2.4.1 Principais microrganismos probióticos e seus produtos de metabolismo	14
2.4.2 Aspectos funcionais probióticos	17
2.4.3 Adequação da tecnologia de produtos lácteos probióticos	18
2.4.4 Características do gênero	18
2.4.5 Grupo espécie <i>Lactobacillus acidophilus</i>	19
2.4.6 Grupo espécie <i>Lactobacillus casei</i>	20
2.5 Transformações químicas durante a maturação do queijo	22
2.5.1 Efeito do pH	22
2.5.2 Efeito da temperatura/umidade	23
2.5.3 Efeito do sal no queijo	23
2.6 Prebióticos	24
2.6.1 Ocorrência natural de prebióticos	25
2.6.2 Consumo de prebióticos	26
2.6.3 Estrutura química	27
2.6.4 Propriedades dos frutooligossacarídeos (FOS)	29
2.6.5 Efeitos benéficos dos FOS à saúde	30
2.6.6 Principais aplicações dos frutooligossacarídeos	31
2.7 Inulina	32
2.7.1 Fluxograma de extração da inulina de raízes de chicória	33
2.7.2 Aspectos nutricionais	35
2.8 Alimentos funcionais	37
2.8.1 O mercado mundial de alimentos funcionais	39
2.9 Queijo simbiótico	40
2.10 Análise sensorial	42
2.11 Análise generalizada de procrustes (GPA)	44

3 MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1 Fabricação do queijo minas padrão com adição de probiótico e prebiótico	45
3.1.1 Matéria-prima	45
3.2 Fluxograma de fabricação do queijo minas padrão	46
3.3 Ingredientes utilizados na fabricação do queijo	47
3.3.1 Cloreto de cálcio	47
3.3.2 Culturas lácticas	47
3.3.3 Coalho	47
3.3.4 Culturas lácticas probióticas	47
3.3.5 Salmoura	48
3.3.6 Prebiótico	48
3.4 Análise do leite	48
3.4.1 Análise físico-química do leite pasteurizado	48
3.4.2 Análise microbiológica do leite pasteurizado	49
3.5 Análise dos queijos	49
3.5.1 Análise físico-química dos queijos	49
3.5.1.1 Amostragem dos queijos para análise	49
3.5.1.2 Preparo das amostras	49
3.5.1.3 Análise físico-química dos queijos	50
3.5.2. Análise microbiológica do queijo	50
3.5.2.1 Amostragem dos queijos para análise microbiológica	50
3.5.2.2 Contagem de microrganismos do gênero <i>Lactobacillus</i> nos queijos	50
3.6 Análise do soro	51
3.6.1 Análise físico-química do soro	51
3.7 Análise da salmoura	51
3.7.1 Análise físico-química da salmoura	51
3.8 Análise sensorial dos queijos	52
3.9 Análise estatística dos dados	55
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1 Análise do leite	56
4.1.1 Análise físico-química do leite pasteurizado	56
4.1.2 Análise microbiológica do leite pasteurizado	57
4.2 Análise físico-química do soro do queijo	57
4.3 Análise físico-química da salmoura	58
4.4 Análise dos queijos	59
4.4.1 Análise físico-química dos queijos	60
4.4.1.1 Teor de gordura dos queijos	60
4.4.1.2 Valor do pH dos queijos	61
4.4.1.3 Acidez titulável dos queijos expressos em ácido láctico	62
4.4.1.4 Teores dos cloretos dos queijos	65

4.4.1.5 Teores de nitrogênio total dos queijos	67
4.4.2 Análise microbiológica dos queijos	69
4.4.3 Análise sensorial dos queijos	73
4.4.3.1 Aparência	73
4.4.3.2 Cor	75
4.4.3.3 Sabor	76
4.4.3.4 Textura	77
4.4.4 Análise generalizada de procrustes	81
5 CONCLUSÕES	84
6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
ANEXOS	101

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 Fluxograma de fabricação do queijo minas padrão	09
FIGURA 2 Eletromicrografia eletrônica de <i>Lactobacillus acidophilus</i> aderido às vilosidades intestinais	13
FIGURA 3 Local de ação dos microrganismos probióticos <i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Bifidobacterium</i>	15
FIGURA 4 Estrutura química da inulina e da oligofrutose	28
FIGURA 5 Representação esquemática da inulina	32
FIGURA 6 Passos para a extração de inulina de chicória	33
FIGURA 7 Caminho da inulina no canal alimentar	35
FIGURA 8 Inulina melhora a função do sistema digestivo	36
FIGURA 9 Fluxograma de interação dos alimentos funcionais	39
FIGURA 10 Fluxograma de fabricação do queijo minas padrão com adição de probiótico e prebiótico	46
FIGURA 11 Ficha de qualidade teste duplo ordenação-preferência	53
FIGURA 12 Teste de ordenação-qualidade	54
FIGURA 13 Ficha de resposta do teste de aceitação (escala hedônica de nove pontos, modificada)	54
FIGURA 14 Queijo minas padrão com adição de 0%, 2% e 4% de inulina	59
FIGURA 15 Queijo minas padrão na câmara de maturação	60
FIGURA 16 Comportamento da concentração de ácido láctico dos queijos, em função do tempo de armazenamento	64
FIGURA 17 Comportamento da concentração de ácido láctico dos queijos, em função da concentração de inulina	65
FIGURA 18 Teor de cloretos dos queijos em função do tempo de armazenamento	67
FIGURA 19 Comportamento dos teores de nitrogênio total dos queijos em função do tempo de maturação	69

FIGURA 20	Placas apresentando crescimento de <i>Lactobacillus</i> nos queijos a 0% de inulina.....	70
FIGURA 21	Placas apresentando crescimento de <i>Lactobacillus</i> nos queijos a 2% de inulina.....	70
FIGURA 22	Placas apresentando crescimento de <i>Lactobacillus</i> nos queijos a 4% de inulina.....	71
FIGURA 23	Comportamento da aparência em função da porcentagem de inulina dos queijos	74
FIGURA 24	Comportamento da aparência dos queijos em função do tempo de armazenamento	75
FIGURA 25	Comportamento da cor em função do tempo em dias nos queijos	76
FIGURA 26	Comportamento do sabor dos queijos em função do tempo	77
FIGURA 27	Comportamento da textura em função do queijo sem adição de inulina	78
FIGURA 28	Comportamento da textura dos queijos adicionados de 4% de inulina em função do tempo	79
FIGURA 29	Comportamento da textura dos queijos em função da dose de inulina, dentro do tempo de 15 dias	80
FIGURA 30	Comportamento da textura dos queijos em função da dose de inulina, dentro do tempo de 30 dias	81
FIGURA 31	Varição do consenso dos provadores em relação à comparação das três doses de inulina, em função do tempo de maturação (dias)	82
FIGURA 32	Varição do círculo de correlação dos provadores em relação às três doses de inulina X quatro tempos de maturação	83

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1	Produção, em toneladas, de queijo minas padrão no Brasil, em estabelecimentos sob inspeção federal, no período de 1991 a 2002 07
TABELA 2	Características de subespécies do gênero <i>Lactococcus</i> empregadas como cultura láctica 10
TABELA 3	Principais bactérias probióticas e seus produtos de metabolismo 16
TABELA 4	Redenominação de espécie e alteração de gêneros de algumas espécies de <i>Lactobacillus</i> 17
TABELA 5	Características fenotípicas do grupo-espécie <i>Lactobacillus acidophilus</i> 19
TABELA 6	Reclassificação de <i>Lactobacillus casei</i> 21
TABELA 7	Ocorrência natural de inulina e oligofrutose em alimentos 26
TABELA 8	Esquema do delineamento experimental utilizado 55
TABELA 9	Valores médios da análise físico-química do leite pasteurizado usado na fabricação dos queijos adicionados de probiótico e prebiótico 56
TABELA 10	Análises microbiológicas do leite pasteurizado 57
TABELA 11	Análise físico-química do soro do queijo no momento do corte e do ponto da massa 58
TABELA 12	Valores de pH das salmouras utilizadas nas três fabricações dos queijos 59
TABELA 13	Teor de gordura (%) dos queijos aos 0, 1 e 15 dias após a salmoura 60
TABELA 14	Valores de pH durante a maturação dos queijos 61
TABELA 15	Valores médios da acidez titulável dos queijos em ácido láctico 62
TABELA 16	Análise do teor de cloretos durante a maturação dos queijos 65

TABELA 17 Valores de nitrogênio total durante a maturação dos
queijos

RESUMO

PEREIRA, Celeide **Elaboração de queijo minas padrão com adição de probiótico e prebiótico**. 2005. 106p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

O objetivo deste trabalho foi produzir um queijo minas padrão adicionado de bactérias acidificantes (*Lactococcus. lactis* spp. *lactis* e *Lactococcus. lactis* spp. *Cremonis*), bactérias probióticas (*Lactobacillus.acidophilus* e *Lactobacillus casei*) e um prebiótico (inulina) em três concentrações (0%, 2%, 4%), visando obter um produto com propriedades simbióticas. As amostras dos queijos, soro no corte, soro no ponto e salmoura foram submetidas a análises físico-químicas (gordura, acidez, cloretos, pH, nitrogênio total), microbiológicas (contagem de *Lactobacillus*) e sensoriais, durante os sete períodos de avaliação. O delineamento experimental empregado foi em blocos inteiramente casualizados (três fabricações), com fatorial de três (concentrações de inulina) x sete dias de maturação. As análises do soro no corte, ponto e salmoura não apresentaram diferenças significativas. Para as análises microbiológicas, o crescimento dos *Lactobacillus* nos queijos foi similar nos tratamentos utilizados. Os resultados do presente trabalho demonstraram diferenças estatísticas nos queijos para a produção de ácido láctico (4% de inulina) e com o tempo de maturação. As análises físico-químicas do soro no corte, ponto e salmoura não apresentaram diferenças significativas. Para as análises microbiológicas, o crescimento dos *Lactobacillus* nos queijos foi similar nos tratamentos utilizados. Em relação às análises sensoriais, a adição de inulina influenciou ($P < 0,05$) na aparência e textura. O tempo de maturação apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) na aparência, cor, sabor e textura dos queijos. Com base nos resultados do presente experimento concluiu-se que a adição da inulina não interfere no crescimento dos *Lactobacillus* adicionados durante a fabricação dos queijos provocou alteração na aparência e textura dos queijos. Assim, pelos resultados do presente experimento, a adição de inulina não apresentou nenhuma vantagem neste tipo de massa.

¹ Comitê de orientação: Verônica Lobato - UFLA (Orientadora), José Luís Contado (Co-orientador) - UNINCOR.

ABSTRACT

PEREIRA, Celeide. Making of standard hard cheese with the addition of probiotic and prebiotic. 2005. 106p. Dissertation (Master in Food Science) - Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.¹

The objective of this work was to produce a standard hard cheese added of acidifying bacteria *Lactococcus lactis* spp. *lactis* and *Lactococcus lactis* spp. *Cremoris* probiotic bacteria (*Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and one prebiotic (inulin) at three concentrations (0, 2, 4%) aiming to obtain a product with symbiotic properties. The samples of the cheeses, whey, whey at cutting, whey at point and brine have been submitted to physicochemical (fat, acidity, chlorites, pH, total nitrogen) microbiological (count of *Lactobacillus*), and sensorial analyses during the seven evaluation periods. The experimental design employed was in randomized blocks (3 manufactures) with a factorial of three (concentrations of inulin) x 7 days' maturation. The analysis of the whey at cutting, point and brine have showed no significant differences. For the microbiological analyses, the growth of *Lactococcus* in the cheeses was similar in the treatments utilized. The results of the present work show statistic differences in the cheeses for lactic acid production (4% of inulin) and with maturation time. The physicochemical analyses of the whey at cutting, point and brine presented no significant differences. For the microbiological analyses, the growth of *Lactobacillus* in the cheeses was similar in the treatments utilized. As regards the sensorial analyses, the addition of inulin has influenced ($P < 0,05$) both the appearance and texture. Maturation time has presented ($P < 0,05$) effects in appearance, color, flavor and texture. On the basis of the results of the present experiment, it follows that the addition of inulin does not interfere in the growth of *Lactobacillus* added during the making, but has caused alterations in the appearance and texture of cheeses. Thus, from the results of the present experiment, addition of inulin has present no advantages in this type of paste.

¹ Guidance committee: Verônica Lobato - UFLA (Adviser), José Luís Contado - UNINCOR (Co-adviser).

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o desenvolvimento acelerado do mundo industrializado tem afetado drasticamente o estilo de vida do homem moderno e as conseqüências deste crescimento tem, provocado um desequilíbrio intenso na qualidade de vida da população mundial. A grande maioria das pessoas passou a consumir dietas inadequadas, com aumento do sedentarismo, uso do tabaco, estresse, hipertensão e doenças crônicas degenerativas gerando assim um grande impacto na saúde dos indivíduos. Estes fatos têm afetado o bem-estar físico e mental dos indivíduos comprometendo o objetivo, preconizado pela Organização Mundial da Saúde, no que concerne ao conceito de saúde.

Estas transformações no estilo de vida de algumas pessoas da população mundial têm levado à intensa procura por alimentos que, além de suprir as suas necessidades nutricionais, contribuam com benefícios à saúde e ao bem estar, proporcionando melhor qualidade de vida e prevenindo o aparecimento de determinadas doenças.

Atenta às expectativas da população mundial, a indústria de alimentos, notadamente a laticinista, vem desenvolvendo novas modalidades de produtos, que contribuam e atendam às exigências do mundo moderno. Estes são os chamados alimentos funcionais que, a cada dia, ganham destaque, para os consumidores que se preocupam com o seu bem-estar, por estarem relacionados com a promoção da qualidade de vida do indivíduo.

O desenvolvimento maior no segmento dos alimentos funcionais é em relação aos alimentos acrescidos de probióticos e prebióticos que melhoram a microbiota do intestino. Os probióticos são utilizados como suplementos alimentares microbianos contendo células viáveis de origem humana, tendo como principal alvo a mucosa intestinal e a sua microbiota. Para que seus

benefícios sejam notados, nas últimas duas décadas as bactérias probióticas têm sido progressivamente incluídas em iogurtes e leites fermentados (Daly & Davis, 1998).

Prebióticos são ingredientes alimentares não digeríveis que afetam de maneira benéfica o organismo, por estimular seletivamente o crescimento e ou a atividade de um ou de um número limitado de bactérias no cólon. Estas substâncias que modificam a composição da microbiota de tal forma que as bactérias com potencial de promoção de saúde (isto é, não patogênica, especialmente lactobacilos e bifidobactérias) tornam-se predominantes (Roberfroid, 1998; Gibson & Roberfroid, 1995).

De acordo com alguns estudos científicos, a manutenção da microbiota saudável pode proporcionar proteção contra desordens gastrintestinais, incluindo infecções, doenças inflamatórias do intestino e, até mesmo, neoplasias (Haenel & Bending, 1975; Mitsuoka, 1982; Salminen et al., 1998).

Finalmente, simbióticos são misturas de probióticos e prebióticos. Esta mistura pode beneficiar o hospedeiro por melhorar a sobrevivência e a implantação do seletivo suplemento microbiano, a partir da utilização dos alimentos veiculando os pró-pré e simbióticos (Gibson & Roberfroid, 1995).

As bactérias mais amplamente utilizadas pela indústria de alimentos pertencem ao grupo das bactérias lácticas, embora algumas bifidobactérias e leveduras também sejam utilizadas. Deste grupo, as mais comumente utilizadas são as dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, que usualmente são adicionadas em leites fermentados na forma liofilizada. As do gênero *Lactobacillus* são mais freqüentemente consideradas como seguras ou reconhecidamente seguras, *generally recognized as safe* (GRAS) (Collins et al., 1998; Ziemer & Gibson, 1998; Lee et al., 1999).

Apesar das culturas probióticas de *Lactobacillus* spp. e de *Bifidobacterium* spp. serem consideradas GRAS, é necessária a determinação da

segurança na utilização da cepa antes do lançamento e da divulgação de um novo produto. Assim, uma avaliação crítica da segurança tornará os benefícios dos probióticos acessíveis ao consumidor (Salminen et al., 1998; O'Brien et al., 1999).

Atualmente, os carboidratos não-digeríveis mais estudados com atividades prebióticas são os frutooligosacarídeos (FOS), por exemplo, a inulina e oligofrutose. Estes estão presentes em altas concentrações em alguns alimentos, cabendo citar alguns deles, como chicória, alho, cebola, alcachofra e aspargos. Além dos FOS, podem-se citar como exemplos os seguintes ingredientes com características prebióticas: derivados de lactose, como a lactulose e o lactitol, galactooligosacarídeos e oligossacarídeos de soja (Gibson & Robefroid, 1995; O'Sullivan, 1996; German et al., 1999).

A presença dos chamados alimentos de “terceira geração” no mercado brasileiro ainda é incipiente. O desenvolvimento de pesquisas, divulgação e comercialização destes produtos para a população brasileira têm um papel muito importante, pois promoverão uma maior disponibilidade deles no mercado, levando ao aumento do consumo e abrindo novas perspectivas tecnológicas para a indústria de alimentos (Ferreira, 2003).

O objetivo geral deste trabalho foi produzir um queijo minas padrão adicionado de bactérias acidificantes (*Lactococcus lactis* spp. *lactis* e *Lactococcus lactis* spp. *cremoris*), bactérias probióticas (*Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei*) e um prebiótico (inulina), visando estudar seus efeitos e interações para caracterizá-lo ou não como um produto com propriedades simbióticas. Vale ressaltar que a elaboração deste queijo não deve sofrer alteração na tecnologia de fabricação do queijo minas padrão tradicional, somente adicionando-se os ingredientes, tornando o processo atrativo do ponto de vista comercial.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- avaliar os efeitos dos microrganismos probióticos e do prebiótico sobre as características físico-químicas do queijo;
- verificar, durante o período de maturação, a sobrevivência dos microrganismos probióticos adicionados no queijo;
- determinar os efeitos do prebiótico (inulina) no queijo durante o período de estocagem e verificar sua influência no desenvolvimento do probiótico;
- analisar sensorialmente a aceitação do produto.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Queijo

A fabricação de queijos é uma forma de preservação do leite, pela qual os seus nutrientes são seletivamente concentrados na forma de um alimento de alto valor nutritivo. A origem da arte de fazer queijo nasceu há mais de 10.000 anos. A concentração dos sólidos do leite é obtida por processos de coagulação, acidificação e desidratação, embora, atualmente, exista uma ampla gama de tipos de queijos, todos evoluíram basicamente de um coágulo de leite ácido ou não (Banks, 1983; Scott, 1986; Fox, 1987).

A fabricação de queijos no Brasil é de história relativamente recente, firmando-se, do ponto de vista industrial, no início do século vinte e, sobretudo, a partir da década de 1920, com estabelecimento de imigrantes dinamarqueses, no sul de Minas Gerais e holandeses, na região de Santos Dumont e Barbacena, em Minas Gerais (Furtado, 1991).

Do queijo de minas originaram-se os seguintes queijos: frescal; minas curado, minas padrão ou minas prensado; do serro; de coalho (Nordeste) e minas de Araxá, dentre outros. Os primeiros apresentam uma produção relevante em âmbito industrial, enquanto que os três últimos ainda têm uma produção artesanal, existindo também na região sul de Minas Gerais.

Um outro tipo de queijo produzido com características específicas é denominado de queijo minas meia-cura. Presume-se que este produto teve uma evolução técnica de fabricação, sendo identificado como queijo minas padronizado e a metodologia descrita na época difere da utilizada hoje (Furtado et al., 1984).

Segundo Regulamento Técnico (Brasil, 1996), entende-se por queijo o produto fresco ou maturado que se obtém 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 bactérias específicas, de ácidos 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. Entende-se por queijo fresco o que está pronto para consumo logo após sua fabricação. Entende-se por queijo maturado o que sofreu as trocas bioquímicas e físicas necessárias e características da variedade do queijo.

2.2 Queijo minas padrão

O queijo minas padrão é o mais antigo e original queijo brasileiro. Sua fabricação iniciou-se ainda no século XIX, no estado de Minas Gerais, e é conhecido como minas curado, prensado ou minas pasteurizado (Furtado & Lourenço Neto, 1994). A quantidade de queijo minas padrão produzido manteve-se constante no período de 1991 a 1995, apresentando ligeiro aumento a partir de 1996, sendo sua participação no mercado de 1,4%, conforme dados da Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ, 2002) (Tabela 1).

TABELA 1 - Produção, em toneladas, de queijo minas padrão no Brasil, em estabelecimentos sob inspeção federal, no período de 1991 a 2002.

Ano	Produção do queijo minas padrão no Brasil (t)
1991	3.374
1992	3.036
1993	3.036
1994	3.491
1995	3.840
1996	4.109
1997	4.520
1998	4800
1999	5.000
2000	5.200
2001	5460
2002	5.733

Fonte: ABIQ (2002).

Segundo o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produto de Origem Animal (RIISPOA) (Brasil, 1997), no art. 614, o queijo minas padrão é o produto obtido de leite integral ou padronizado, pasteurizado, de massa crua, prensada mecanicamente e devidamente maturada durante vinte dias e deve apresentar:

- formato: cilíndrico, de faces planas e bordos retos, formando ângulo vivo;
- peso: 1,0 a 1,2 kg;
- crosta: fina amarelada, preferentemente revestida de parafina;
- consistência: semidura, tendente à macia, de untura manteigosa;
- textura: buracos mecânicos e em cabeça de alfinete, pouco numerosos;
- cor: branco-creme, homogênea;
- odor e sabor: próprios, ácidos agradáveis e não picantes.

A fabricação do queijo é feita com leite pasteurizado (72°C/15s), com teor médio de gordura entre 3,2% e 3,4% e fermento láctico mesofílico tipo O composto de *Lactococcus lactis* spp. *lactis* (5%) e *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* (95%). Sua coagulação é feita por meio de coalho e, no corte devem ser obtidos grãos de tamanho grande, devendo ser maturado (Furtado, 1994).

2.2.1 Fluxograma de fabricação do queijo minas padrão

A Figura 1 descreve a seqüência tradicional de fabricação do queijo minas padrão, adaptado de Furtado (1994).

2.3 Microrganismos utilizados na fabricação do queijo

Os microrganismos são usados na fabricação do queijo para promover o desenvolvimento da acidez durante a cura e também para conferir as propriedades distintas de textura e sabor.

O desenvolvimento da acidez influencia as propriedades de textura dos queijos e também proporciona condições ambientais corretas, as quais permitem a formação de compostos flavorizantes na fabricação do queijo (Banks, 1988).

As culturas *starters* são as principais bactérias gram-positivas que utilizam a fermentação da lactose como via de produção de ácido láctico no leite.

O ácido láctico é responsável pelo sabor suave e ácido que enriquece os queijos e é importante na formação da textura durante a maturação. Além disso, as culturas *starter* têm outro papel essencial: a produção de compostos de aroma voláteis como o diacetil, aldeídos e a síntese de enzimas proteolíticas e lipolíticas envolvidas na maturação dos queijos e inibição de patógenos e de alguns microrganismos esporulados. Os quatro gêneros amplamente utilizados

são *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus* (Ferreira, 2003).

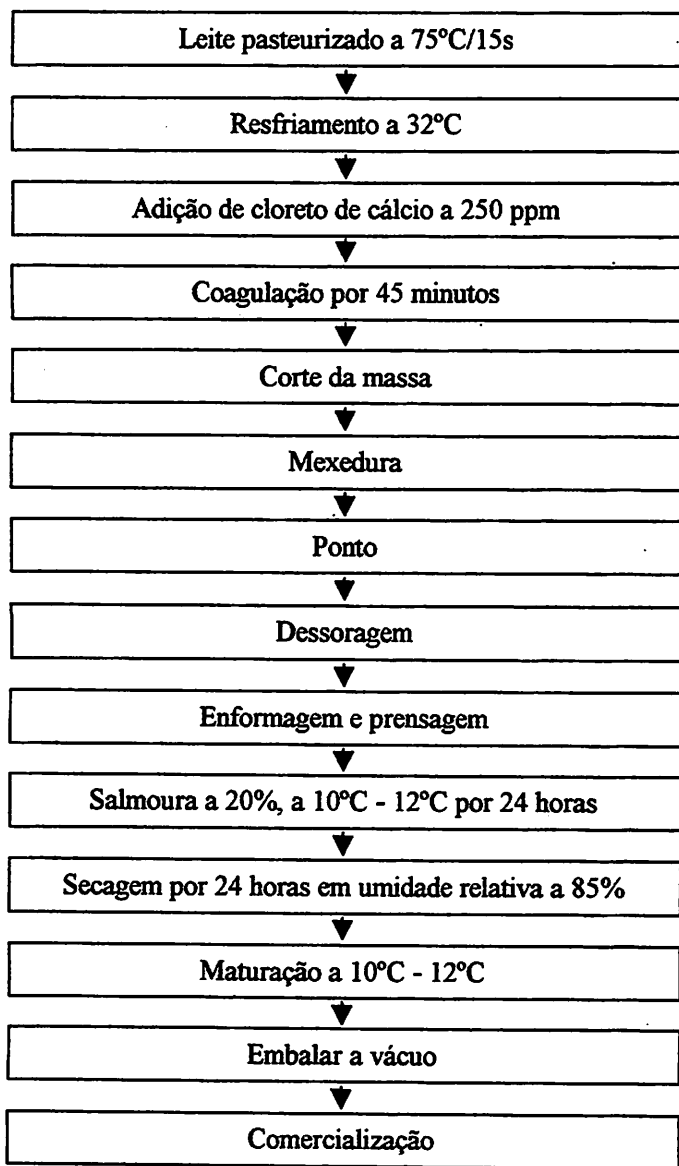


FIGURA 1 - Fluxograma de fabricação do queijo minas padrão (adaptado de Furtado, 1994).

2.3.1 Gênero Lactococcus

Lactococcus lactis spp. *lactis* e *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* são culturas *starters* mesofílicas (Tabela 2), utilizadas na produção de uma variedade de queijos, as quais são incorporadas aos processos de fabricação somente em intervalos de temperaturas moderadas (próximas a 40°C). São culturas acidificantes e não produzem olhaduras nos queijos. O gênero *Lactococcus* (grupo lácticos/N - Sherman, 1937, produz ácido láctico na forma L(+), sendo o componente mais frequente na composição de fermentos mesofílicos para laticínios (Furtado, 1991).

TABELA 2 - Características de subespécies do gênero *Lactococcus* empregadas como cultura láctica (Ferreira, 2003).

Fenótipo	<i>Lactobacillus lactis</i>	
	spp. <i>lactis</i>	ssp <i>cremoris</i>
Crescimento		
40°C	+	-
4% NaCl	+	-
0,1% de azul de metileno	+	-
pH = 9,2	+	-
Utilização de citrato	-	-

Fonte: adaptado de Ferreira (2003).

2.3.1.1 Lactococcus lactis ssp. cremoris

São cocos, gram-positivos, mesofílicos, homofermentativos, produzem ácido láctico a partir da lactose, crescendo na faixa de temperatura de 36°C a 41°C. Estes apresentam-se em longas cadeias, produzem ácido por volta de 1,0% de ácido láctico, sensível ao sal, inibido em meio com mais de 4,0% de sal, resistente até o pH 9,2. São destruídos pela pasteurização do leite e constituem

quase que 90% da flora original do fermento. Produzem uma bacteriocina, a diplococina, que atua como inibidor de outras bactérias lácticas (Furtado, 1991).

2.3.1.2 Lactococcus lactis ssp. lactis

São cocos, gram-positivos, do tipo diplococos, mesofílicos, homofermentativos, produzem ácido até a concentração de 1,0% de ácido láctico, resistente ao sal, sendo capaz de crescer em meios com até 4,0% de sal na umidade e entre 10°C e 40°C. São destruídos pela pasteurização do leite e constituem apenas uma pequena fração (5%) da cultura láctica normal (Furtado, 1991).

2.4 Probióticos

Os efeitos benéficos de microrganismos vivos no trato intestinal remontam à Antiguidade e as primeiras citações foram feitas pelo historiador romano Plínio, em 76 antes de Cristo, sobre o uso de leites fermentados no tratamento de várias formas de infecções intestinais (O'Sullivan, 1992).

O estudo sistemático dos microrganismos normalmente presentes no intestino originou-se das pesquisas de Escherich, em 1885. Seus estudos sobre gastroenterite e desnutrição infantil, realizados na Universidade de Viena, levaram-no à descoberta dos lactobacilos, inicialmente classificados como *Bacterium coli communior* e, posteriormente, reclassificados como *Escherichia coli* (Mitsuoka, 1977, 1989).

Em 1899, Tissier então pesquisador do instituto Pasteur, realizou estudos sobre a microbiota do sistema digestivo de recém-nascidos e descobriu as bifidobactérias classificadas inicialmente como *Bacillus bifidus commnis* e posteriormente como para *Lactobacillus bifidus* e finalmente foi reconhecida

como gênero do *Bifidobacterium* sp (Mitsuoka, 1977; 1989).

Em 1900, Moro descobriu uma nova espécie de microrganismo isolada das fezes de recém-nascidos alimentados com leite materno, classificando-a como *Bacillus acidophilus*, posteriormente reclassificada como *Lactobacillus acidophilus* (Mitsuoka, 1977, 1989). Moro foi o primeiro pesquisador a propor a existência de um grupo de bactérias residentes no intestino, exercendo uma função preventiva contra a invasão de microrganismos patogênicos (Mitsuoka, 1989).

Em 1906, Tissier propôs o uso de espécie de *Bifidobacterium* sp, no tratamento de casos de diarreia infantil. Em 1907, Metchnikoff apresentou a primeira hipótese sobre a regulação da microbiota e fisiologia intestinal por lactobacilos, após a constatação da correlação da longevidade dos povos dos Balcãs com o elevado consumo de iogurte (O' Sullivan, 1992).

Segundo Goldin (1998), a palavra probiótico foi introduzida por Lilly & Stillwell, em 1965, para descrever microrganismos que desempenham atividades benéficas. Kurmmann (1988) e Fuller (1994) definem probióticos como microrganismos vivos que, quando consumidos, agem no trato gastrointestinal do hospedeiro, melhorando sua microbiota.

A designação de probióticos é conhecida há mais de 35 anos, mas foi Fuller que, em 1991, os definiu como suplementos alimentares e como microrganismos que produzem efeitos benéficos no hospedeiro por meio da melhora da microbiota intestinal. Os probióticos fazem parte do grupo denominado "alimentos funcionais", cujo principal alvo é a mucosa intestinal e sua microflora, estão incluídos neste grupo o iogurte e os leites fermentados (Souza, 2001), cujo consumo vem apresentando um crescimento vertiginoso, estando disponíveis em vários formatos e formulações para o consumo (Ferreira, 2003).

Segundo Lee et al. (1999), as bactérias mais amplamente utilizadas pela

indústria de alimentos pertencem ao grupo das bactérias lácticas. Os microrganismos probióticos são bactérias gram-positivas e são incluídas basicamente em dois gêneros: *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* que, usualmente, são adicionados em leites fermentados ou acrescentados na forma liofilizada (Ziemer & Gibson, 1998; Who, 2001).

A morfologia das bactérias lácticas pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, conforme a Figura 2, é freqüentemente considerada seguras ou reconhecidamente segura (*generally recognized as safe* - GRAS) Collins et al., 1998; Lee et al., 1999).



FIGURA 2 - Eletromicrografia de *Lactobacillus acidophilus* aderido às vilosidades intestinais.

Fonte: Probióticos (1999).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Brasil, 2002), probióticos são microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do

indivíduo.

Os alimentos probióticos fazem parte do mercado de alimentos funcionais, que vem crescendo vertiginosamente. Esses alimentos estão disponíveis em vários formatos, como formulação para animais, produtos farmacêuticos, produtos de confeitarias e produtos lácteos, fermentados ou não.

A indústria de laticínios está entre as que apresentam maior crescimento na disponibilização de produtos funcionais, em especial nos segmentos de iogurtes e outros leites fermentados. Essa funcionalidade é efetivada por meio da utilização de culturas probióticas e ou adição de substâncias prebióticas (Ferreira, 2003).

Os probióticos constituem um motivo de investigação atual pelo seu interesse em várias áreas do conhecimento, notadamente a medicina, a veterinária e a indústria de alimentos, daí resultando seus conceitos. Por isso, em 1999, foi elaborado, na Europa, um documento de consenso que define probiótico como um alimento que incorpora microrganismos vivos (*Lactobacillus e bifidobactérias*) e que, consumido em quantidades suficientes, deve produzir efeitos benéficos para a saúde e para o bem estar, para além dos efeitos nutricionais habituais. Esta definição, embora abrangente, é algo limitada por considerar apenas microrganismos vivos, uma vez que alguns produtos considerados como probióticos são constituídos por lisados bacterianos ou produtos inativados pelo calor que, quando ingeridos, exercem efeitos benéficos para a saúde do hospedeiro (Souza, 2001).

2.4.1 Principais microrganismos probióticos e seus produtos de metabolismo

Nas diferentes regiões do trato digestivo estão presentes grupos específicos de microrganismos, como bactérias bífidas (predominância no cólon) e lactobacilos (predominância no intestino delgado), que modulam a microbiota

num microambiente, por meio de seus produtos e metabolismo, conforme (Figura 3) (Probióticos, 1999). Para se obter o máximo benefício é necessário que os mesmos estejam viáveis e disponíveis no alimento em concentrações superiores a 10^6 UFC/g, para *Lactobacillus* spp. e 10^7 UFC/g, para *Bifidobacterium* spp. (Ferreira, 2003).

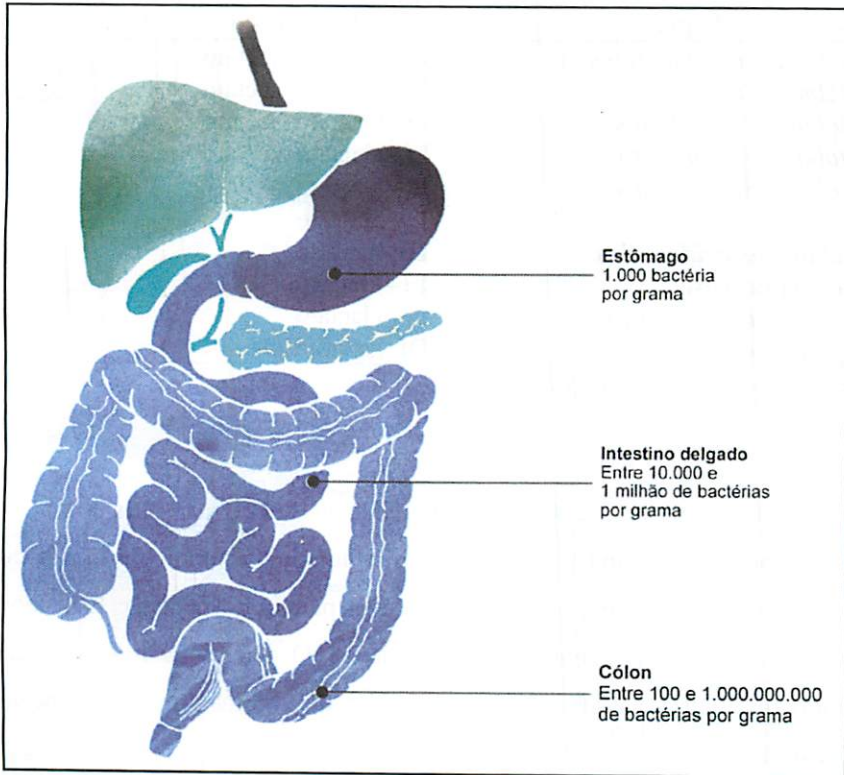


FIGURA 3 - Local de ação dos microrganismos probióticos: *Lacobacillus acidophillus* e *Bifidobacteirium*.
Fonte: Probióticos (1999).

As espécies probióticas mais utilizadas para conferir funcionalidade aos produtos lácteos estão indicadas na Tabela 3.

A colonização das bactérias lácticas probióticas no intestino delgado se faz pelo consumo contínuo de alimentos carreando níveis de 10^6 UFC/g de *Lactobacillus* (Ferreira, 2003).

TABELA 3 - Principais bactérias probióticas e seus produtos de metabolismo (Ferreira, 2003).

Espécies	Produtos de metabolismo
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	L(+) lactato, acetato
<i>Bifidobacterium breve</i>	L(+) lactato, acetato
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	L(+) lactato, acetato
<i>Bifidobacterium infantis</i>	L(+) lactato, acetato
<i>Bifidobacterium longum</i>	L(+) lactato, acetato
<i>Enterococcus faecium</i>	L(+) lactato
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	DL lactato
<i>Lactobacillus casei</i>	L(+) lactato
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	L(+) lactato
<i>Lactobacillus reuterii</i>	DL lactato, CO ₂

* acetato: lactato na proporção 3:2.

Segundo Ferreira (2003), a predominância de *Lactobacillus* diminui os processos putrefativos no trato intestinal, diminuindo o acúmulo de substâncias nocivas, promovendo uma vida mais saudável para o hospedeiro. Esta teoria ficou conhecida como “Teoria da longevidade”. O gênero *Lactobacillus* tem recebido diferentes classificações e alterações de algumas de suas espécies, conforme Tabela 4.

TABELA 4 - Redenominação de espécie e alteração de gêneros de algumas espécies de *Lactobacillus* (Ferreira, 2003).

Nomenclatura anterior	Nomenclatura atual
<i>L. bulgaricus</i>	<i>L. delbrueckii</i> spp. <i>Bulgaricus</i>
<i>L. casei</i> spp. <i>Alactosus</i>	<i>L. casei</i>
<i>L. casei</i> spp. <i>pseudopiantarum</i>	<i>L. casei</i>
<i>L. casei</i> spp. <i>Rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>
<i>L. casei</i> spp. <i>Tolerans</i>	<i>L. casei</i>
<i>L. lactis</i>	<i>L. delbrueckii</i> spp. <i>Lactis</i>
<i>L. jugurti</i>	<i>L. helveticus</i>
<i>L. divergens</i>	<i>Carnobacterium divergens</i>
<i>L. piscicola</i>	<i>Carnobacterium piscicola</i>
<i>L. minnutus</i>	<i>Atopobium minutum</i>
<i>L. rimae</i>	<i>Atopobium rimae</i>

2.4.2 Aspectos funcionais dos probióticos

Segundo Goldin (1998) e Madley (2001), são atribuídas várias funções aos microrganismos probióticos, como:

- diminuição do colesterol sérico e da reabsorção de compostos aminados indesejáveis;
- aumento da absorção de minerais, como cálcio, ferro e magnésio;
- aumento da resposta do sistema imune do hospedeiro;
- favorecimento do metabolismo de algumas substâncias, como o da lactose ,em indivíduos lactase não persistentes;
- aderência às paredes epiteliais, habilidade de estabilizar a microbiota intestinal;
- propriedades antigenotóxicas e não patogênicas;
- prevenção de câncer, redução do colesterol, infecções no trato urinário, alergias, inflamações e hipersensibilidade.

2.4.3 Adequação da tecnologia de produtos lácteos probióticos

Segundo Ferreira (2003), os produtos lácteos probióticos devem ser produzidos utilizando-se as mesmas tecnologias empregadas no processamento dos produtos lácteos não probióticos, levando em consideração alguns fatores que devem ser citados para garantir sua funcionalidade, como:

- adequação da cultura, levando em conta o público alvo: criança ou adulto;
- funcionalidade esperada;
- sobreviver em leite;
- não alterar o sabor característico do produto;
- resultar em produto com textura esperada;
- produção de ácido na taxa esperada ou ser carreada na forma concentrada;
- a cultura deve ser resistente à acidez do produto e às rápidas mudanças de pH após a digestão;
- resistir à presença de bile e de outras secreções intestinais;
- não produzir substâncias indesejáveis;
- habilidade de passar pelo trato gastrointestinal em estado viável;
- estar presente em elevada concentração celular ao final da fermentação;
- habilidade de se multiplicar no trato gastrointestinal.

2.4.4 Características do gênero

Conforme dados de Gomes & Malcata (1999), os *Lactobacillus* apresentam as seguintes características:

- forma de bacilos ou cocobacilos;
- gram positivos e asporogênicos;

- aos pares ou formando correntes curtas;
- isolados de boca, vagina e intestinos;
- anaeróbios facultativos ou microaerofílicos;
- não formam esporos, catalase e benzidina negativos;
- algumas estirpes podem produzir uma pseudocatalase e outras estirpes podem apresentar motilidade;
- crescem na faixa de 2°C a 53°C;
- o conteúdo de G + C encontra-se entre 32 a 55 mol%;
- formam isômeros do ácido láctico: L(+), D(-), DL;
- homofermentativo/heterofermentativo;
- crescem em pH 4,5, mas não crescem em pH 9,0.

2.4.5 Grupo-espécie *Lactobacillus acidophilus*

O *Lactobacillus* foi primeiramente descrito por Moro, em 1900 e denominado de *Lactobacillus acidophilus*. O grupo-espécie foi redefinida por Mitsuoka (1992) com seis componentes, apresentando características fenotípicas bem definidas, conforme descrito na Tabela 5 (Ferreira, 2003).

TABELA 5 - Características fenotípicas do grupo-espécie *Lactobacillus acidophilus*.

Espécie	G+C %	Crescimento (NaCl%)			Fermentação		
		3,5	4,5	5,0	Melibiose	Rafinose	Trealose
<i>L. acidophilus</i>	32 - 37	-	-	-	-	v*	+
<i>L. amylovorus</i>	40	-	-	-	v	+	+
<i>L. crispatus</i>	35 - 38	+	-	-	+	+	-
<i>L. gallinarum</i>	33 - 36	+	+	-	+	+	-
<i>L. gasseri</i>	33 - 35	+	+	v	-	-	+
<i>L. Johnsonii</i>	32 - 38	+	+	+	v	v	+

* Variável.

Fonte: Ferreira (2003).

Conforme dados de Gomes & Malcata (1999), os *Lactobacillus acidophilus* apresentam as seguintes características:

- gram negativos, pares ou em cadeias curtas;
- homofermentativos, anaeróbios ou microaerofílicos;
- não possuem flagelos, não têm motilidade e não formam esporos;
- apresentam tamanho/largura de 0,6 a 0,9 μm e 1,5 a 6,0 μm de comprimento;
- intolerantes ao sal;
- não contêm citocromos e são benzidina negativas;
- composição base do DNA G + C de 34 - 37 Mol%;
- produzem isômeros do ácido láctico DL;
- crescem em reduzida pressão de oxigênio e em 5% a 10% CO_2 ;
- podem crescer à temperatura de 45°C, mas o crescimento ótimo é a 35°C a 40°C;
- toleram acidez de 0,3% a 1,9%, com pH ótimo de 5,5 a 6,0;
- composição da parede celular: peptidoglicanos (Lys-D Asp).

2.4.6 Grupo-espécie *Lactobacillus casei*

O *Lactobacillus casei* é um microrganismo homofermentativo, grande produtor de lactato L(+), que chega a produzir a forma isomérica L(+) pura (Vaccari et al., 1993). Apresenta temperatura ótima de crescimento a 37°C e mínima de 15°C. O pH ótimo de crescimento é 6,8, com mínimo em torno de 3,0 (Rasic e Kurmann, 1983; Ferreira, 1987). A Tabela 6 apresenta a reclassificação de *Lactobacillus casei* (Ferreira, 2003).

A estirpe do *Lactobacillus casei* é capaz de sobreviver ao suco gástrico e aos sais biliares e tem demonstrado efeito inibitório no crescimento de microrganismos patogênicos, como *Listeria monocytogenes* e *Shigella sonnei*

(Kandler & Weiss, 1986; Macias et al., 1992). Também tem sido empregada como agente profilático, reduzindo o período de diarreia, associada à administração de ampicilina e a reincidência de colite pseudomembranosa causada pelo *Clostridium difficile* (Gilliland, 1979; Gorbach et al., 1987; Fernandes et al., 1988).

TABELA 6 - Reclassificação de *Lactobacillus casei* (Ferreira, 2003).

Kandler & Weiss (1986)	Collins et al. (1989)	Dicks et al. (1996)
<i>L. casei ssp. casei</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. zeae</i> , <i>L. casei</i>
<i>L. casei ssp. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>
<i>L. casei ssp. tolerans</i>	<i>L. paracasei ssp. tolerans</i>	<i>L. casei</i>
<i>L. casei pseudoplantarum</i>	<i>L. paracasei ssp. paracasei</i>	<i>L. casei</i>
<i>L. casei ssp. alactosus</i>	<i>L. paracasei ssp. paracasei</i>	<i>L. casei</i>

Estudos clínicos indicam a ação deste microrganismo no tratamento de diarreia infantil, estabilização da permeabilidade intestinal, balanço da microflora intestinal, tratamento da superfície de bexiga com câncer, aumento da imunidade e avanços em vacinas (Tamime, 2002).

A administração oral de *Lactobacillus casei* tem gerado ativação de macrófagos e das funções linfocitárias. Foi demonstrado que a injeção intraperitoneal de *Lactobacillus casei* em comundongos estimula a atividade antitumoral e que este efeito supressor está relacionado com a ativação de macrófagos e linfócitos. O uso de leite fermentado com *Lactobacillus casei* biovar *shirota* é indicado para diminuir a duração de diarreia, durante enterite por rotavírus em crianças (Kato et al., 1981; Perdígón et al., 1986; Marteau, 1996).

A resposta imune obtida com *Lactobacillus casei*, expressando o fragmento C da toxina tetânica (TTFC) na superfície da parede celular, quando o fragmento é administrado por da via subcutânea com o adjuvante de Freund,

apresentou reação também positiva e foi capaz de elevar os níveis de anticorpos TTFC-específicos, ao ser administrado pela via intranasal em comundongos.

O *Lactobacillus casei* mostrou-se capaz de estimular a resposta imunitária de crianças quando vacinadas por via oral contra o rotavírus, vírus responsável pela diarreia aguda infantil, nos países em desenvolvimento (Isolauri et al., 1995; Steidler et al., 1998; Maassen et al., 1999).

2.5 Transformações químicas durante a maturação do queijo

Durante a maturação do queijo ocorrem várias modificações de ordem microbiológica, bioquímica e química. Os constituintes do queijo, proteínas, lipídios e lactose residual, sofrem degradação em produtos primários e secundários. Os principais compostos que têm sido isolados de diversos queijos são peptídeos, aminoácidos, ácidos, tióis e tioésteres de proteínas, ácidos gordurosos, metilcetonas, lactonas e ésteres de lipídeos e ácidos orgânicos, como os ácidos láctico, acético, propionico, dióxido de carbono, ésteres e álcoois da lactose.

A combinação e a concentração destes compostos são responsáveis pelas características de sabor em diversos queijos (Fox et al., 1995).

2.5.1 Efeito do pH

O pH modifica a textura do queijo durante toda a maturação. O pH inicial do queijo é de aproximadamente 4,6 a 4,7 e sua textura é firme e brilhante; o aumento desse valor, durante o último estágio da maturação, é um importante fator no amolecimento do corpo do queijo. A elevação do valor de pH também permite o crescimento de microrganismos ácidos tolerantes que são derivados da fabricação de queijo. Tais microrganismos podem fazer uma

contribuição positiva ou negativa ao sabor.

O pH do queijo eleva-se muito pouco durante a maturação para as massas fechadas e cozidas, mas não chega à neutralidade e eleva-se mais acentuadamente para as massas moles que podem se tornar alcalinas. O sabor desses tipos de queijos é, evidentemente, muito diferente. O queijo de longa conservação tem, em geral, pH que não ultrapassa 5,6. O papel regulador do pH é muito importante, pois inúmeras enzimas microbianas, como endopeptidases e descarboxilases, são mais ativas em torno de pH 5 a 6. Por outro lado, as desaminases têm um pH ótimo mais elevado em torno de 7 ou superior (Surazinski & Petersen, 1973).

2.5.2 Efeito da temperatura/umidade

O controle de temperatura e umidade é fator muito importante durante os primeiros 12 dias de maturação do queijo minas padrão. A temperatura deve ser controlada entre 11°C e 14°C e a umidade relativa mantida entre 85% e 90%. A maturação é reduzida sob temperaturas e umidades baixas. Em altas temperaturas e umidades, a superfície dos queijos ficará molhada, o corpo desidratado, e provavelmente, haverá crescimento excessivo de uma biodiversidade de microrganismos indesejáveis (Surazinski & Petersen, 1973).

2.5.3 Efeito do sal no queijo

Os fenômenos físico-químicos e bioquímicos que caracterizam o processo de maturação do queijo são afetados pelo seu teor de sal, uma vez que a proteólise (degradação protéica) e a lipólise (hidrólise da gordura) são reguladas por enzimas ativadas nos teores de sal normais do queijo entre 0,5% a 2,5%, em geral, e inibidos em teores excessivamente elevados (Furtado, 1991).

Quanto mais elevada for a umidade do queijo, mas rápida é a proteólise a uma dada temperatura. Os queijos mais dessorados têm uma maturação mais lenta e este fenômeno se deve a um aumento da concentração de sal, com conseqüente abaixamento da atividade de água e diminuição da disponibilidade de água para o crescimento bacteriano e para a degradação protéica em reações caracterizadas principalmente pela hidrólise das ligações peptídicas. A lipólise prossegue nos queijos mais fortemente salgados, assim que cessa a proteólise

A concentração de sal no queijo provavelmente controla a formação de sabor amargo por sua influência na atividade do coalho e das proteinases bacterianas. A atividade do coalho em relação à paracaseína tem seu ponto máximo em concentração de sal entre 2,5% a 4,0% e a atividade diminui rapidamente em caso de aumento nesta concentração (Surazinski & Petersen, 1973).

Quando o teor de sal é superior a 4,9%, o defeito quase sempre não aparece, o que geralmente ocorre quando este teor de sal é inferior a 4,3%. Pode-se então concluir que a fração β da caseína é a principal precursora dos peptídeos amargos em queijos, podendo ser inibida a hidrólise desta fração pelo aumento das concentrações de sal (Furtado, 1991).

2.6 Prebióticos

Os prebióticos podem ser definidos como ingredientes não digeríveis que afetam de maneira benéfica o organismo por estimular seletivamente o crescimento e ou atividade de um ou de um número limitado de bactérias no cólon (Gibson & Roberfroid, 1995).

Segundo Gibson (1999), um ingrediente alimentar, para ser considerado prebiótico, deve atender aos seguintes itens:

- não pode ser hidrolisado, nem absorvido na parte superior de trato gastrintestinal;
- deve ser seletivamente fermentado por um ou um limitado número de bactérias potencialmente benéficas no cólon;
- deve alterar a composição da microbiota para uma composição mais saudável;
- deve preferencialmente induzir efeitos que são benéficos para a saúde do hospedeiro.

Atualmente, os carboidratos não digeríveis mais estudados com atividades prebióticas são os frutooligossacarídeos (FOS), também denominados oligofrutose e inulina. Pesquisas comprovam que os FOS modificam o hábitat intestinal, causando um aumento do bolo fecal (Gibson & Roberfroid, 1995; German et al., 1999).

A normalização da frequência fecal e o efeito prebiótico aumentam o número de bactérias e ou a atividade do número de bifidobactérias e bactérias do ácido láctico no intestino humano (German et al., 1999).

Além dos FOS, podem-se citar como exemplo os seguintes ingredientes com características prebióticas: derivados de lactose, como a lactulose e o lactitol, os galactooligossacarídeos e os oligossacarídeos de soja (O'Sullivan, 1996).

2.6.1 Ocorrência natural de prebióticos

Os oligofrutoses e a inulina são de ocorrência natural, principalmente em produtos de origem vegetal, estando presentes como compostos de reserva energética em mais de 36.000 espécies de vegetais, muitos destes utilizados na alimentação humana. As principais fontes naturais de frutooligossacarídeos

incluem trigo, cebola, banana, alcachofra, alho e raízes de chicória (Carpita et al., 1989; Hartemink et al., 1997), conforme Tabela 7.

TABELA 7 - Ocorrência natural de inulina e oligofrutose em alimentos.

Alimentos	Inulina (%)	Oligofrutose (%)
Cebola	2,0 - 6,0	2,0 - 6,0
Chicória (raízes)	15,0 - 20,0	5,0 - 10,0
Aspargos	1,0 - 30,0	1,0 - 20,0
Alho	9,0 - 16	3,0 - 6,0
Banana	0,3 - 0,7	0,3 - 0,7
Trigo	1,0 - 4,0	1,0 - 4,0
Centeio	0,5 - 1,0	0,5 - 1,0
Cevada	0,5 - 1,5	0,5 - 1,5
Alho poro	3,0 - 10,0	2,5 - 8,0

Fonte: Roberfroid et al. (1993); Gibson et al. (1994).

2.6.2 Consumo de prebióticos

De acordo com Spiegel et al. (1994), a dose efetiva diária de frutooligossarídeos (forma pura) é de 3,0 g; a dose mínima requerida de frutooligosacarídeos para induzir diarreia é de 44 g para o homem e de 49 g para mulheres. Hidaka et al. (1986) estipularam que a quantidade eficaz de frutooligosacarídeos necessária para adultos é cerca de 5 g/dia. Na dieta americana, a ingestão de FOS ocorre, principalmente, por meio do trigo (70%) e da cebola (25%). A ingestão diária *per capita* de FOS é de 2 a 4 g, para americanos e 3 a 12 g, para europeus (Gibson et al., 1994).

De acordo com a FAO, no Brasil, em 1999, o consumo per capita anual de trigo foi de, aproximadamente, 48,6 kg; o de cebolas foi de 5,3 kg e o de bananas de 27,4 kg. Considerando estas informações e os valores da Tabela 7,

estima-se que o consumo médio diário de FOS no Brasil esteja em torno de 3 a 12 g (Nitschkee & Umbelino, 2002).

2.6.3 Estrutura química

Os frutooligossacarídeos são polímeros de D-frutose unidos por meio de ligações glicosídicas do tipo β -(2 \rightarrow 1) com uma molécula de sacarose terminal e este tipo de ligação glicosídica não é hidrolisada pela ação das enzimas digestivas (Anderson et al., 1999).

A síntese destes compostos nas plantas inicia-se a partir da transferência de uma unidade de frutose entre duas moléculas de sacarose, portanto, alguns FOS possuem uma molécula de glicose na extremidade da cadeia.

Dependendo do comprimento da cadeia, definida pelo número de unidades de monossacarídeos, também chamado grau de polimerização (DP), os FOS podem ser chamados de oligofrutose (DP<10, com média = 4,8) ou inulina (DP de 2 a 60, com média = 12) (Gibson & Roberfroid, 1995; Niness et al., 1999).

As oligofrutoses originam-se da hidrólise enzimática parcial da inulina que pode ocorrer naturalmente como também pode ser obtidas industrialmente.

Além do baixo grau de polimerização, os oligofrutoses são representadas pela fórmula GF_n (polímeros de glicose-frutose, em que n representa o número de unidades frutossil) ou F_m (polímeros de frutose, em que m representa o número de unidades frutossil). Estes produtos diferenciam-se pelo fato de os compostos do tipo F_m serem redutores, enquanto que GF_n não o são (Roberfroid, 1993) (Figura 4).

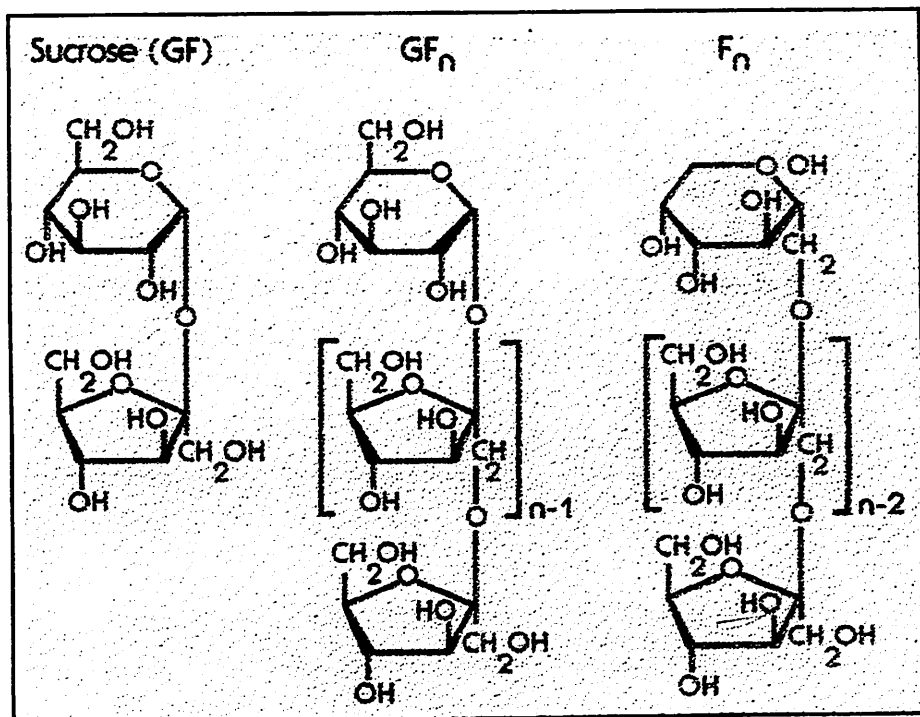


FIGURA 4 - Estrutura química da inulina e da oligofrutose.

A quantidade de frutooligossacarídeos e o grau de polimerização variam grandemente com a sua fonte. Assim, bulbo de dália, chicória e tubérculos de alcachofra-de-jerusalém apresentam quantidade significativa deste carboidrato de reserva, mas com graus de polimerização diferentes, sendo 18 para chicória, acima de 18 para bulbo de dália e inferior a 18 para tubérculos de alcachofra-de Jerusalém. Cereais, como trigo e centeio, apresentam frutooligossacarídeos com grau de polimerização de 2 a 7, mas a maioria das frutanas é do tipo ramificada, com ligações glicosídicas β 2-6 (Molder, 1994; Housley et al., 1989; Carpita et al., 1989; Edelman & Jefford, 1968; Edelman, 1956; Bacon & Edelman, 1951).

2.6.4 Propriedades dos frutooligosacarídeos (FOS)

Segundo Schneeman (1999), Molis et al. (1996), Yun (1996) e Bornet (1994), as principais propriedades dos FOS são:

- as oligofrutoses possuem propriedades funcionais semelhantes a da sacarose ou do xarope de glicose;
- são higroscópicas e sua capacidade de retenção de água é maior que a da sacarose;
- oligofrutoses do tipo GFn não são redutores e portanto apresentam a vantagem de não serem suscetíveis à reação de Maillard;
- quanto à estabilidade, estes açúcares suportam pH superiores a 3 e temperatura de até 140°C;
- a viscosidade é comparável à da sacarose e a solubilidade em água atinge 80% a 25°C;
- representa entre 30% e 50% do poder doçante da sacarose, esta propriedade é bastante útil em alimentos nos quais o uso da sacarose é restrito;
- não cristalizam, não precipitam, nem deixam sensação arenosa ao paladar;
- não são degradados pela maioria dos processos térmicos da indústria de alimentos, como, por exemplo, a pasteurização;
- são isentos de calorias podendo ser usados em alimentos para diabéticos e alimentos de baixo valor calórico;
- não são cariogênicos, ou seja, não são metabolizados por *Streptococcus mutans* evitando a formação de ácidos e β -glucanos, responsáveis pelo desenvolvimento das cáries;
- têm ação como fibra alimentar: resistência à digestão;

- possuem alta dispersibilidade em água, são rapidamente fermentados pelos microrganismos do cólon e, conseqüentemente aumentam a massa fecal e a freqüência de evacuação e diminuem a constipação;
- não possuem sabor desagradável e não aumentam a viscosidade dos alimentos.

2.6.5 Efeitos benéficos dos FOS à saúde

Os efeitos benéficos à saúde promovidos pela ingestão de frutooligossacarídeos assemelham-se àquele atribuído as fibras, pois, aumentam o bolo fecal, reduzem o trânsito gastrintestinal, aumentam o volume do lúmen intestinal e podem suprimir a digestão e absorção de nutrientes no intestino, além de exercerem um efeito modulador da flora intestinal (Okue et al., 1984, Tokunaga et al., 1986 e 1989).

De acordo com Nitschke & Umbelino (2002), são inúmeros os benefícios que os FOS promovem a saúde, destacando-se:

- efeito anticarcinogênico;
- efeito hipolipidêmico;
- efeito na intolerância à lactose;
- redução de metabólitos tóxicos;
- efeito na encefalopatia portal sistêmica;
- prevenção da diarreia;
- aumento a proliferação de bifidobactérias e redução de patógenos;
- aumento na absorção (cálcio, magnésio fósforo);
- redução da pressão sanguínea;
- redução de várias patologias humanas (doenças auto-imunes, câncer, acne, cirrose hepática, constipação, intoxicação alimentar, diarreia

associada a antibióticos, problemas digestivos, alergias e gases intestinais);

- redução do colesterol;
- produção de ácidos graxos de cadeia curta.

2.6.6 Principais aplicações dos frutooligosacarídeos

De acordo com Yun (1996); Fishbein et al. (1998); Ninness (1999) e Pszczola (1999), os FOS podem ser aplicados nos seguintes alimentos:

- formulação de alimentos dietéticos, em que são utilizados como substitutos de gorduras em sorvetes, cremes, vegetais, queijos cremosos e patês ou como substitutos de açúcares em chocolates e sobremesas instantâneas;
- enriquecimento do teor de fibra dietética quando adicionados em barras de cereais, biscoitos, bolos e cereais matinais;
- formulações de alimentos prebióticos, como bebidas lácteas funcionais ou simbióticos, no caso de iogurte;
- produtos de confeitarias, substituindo carboidratos e gerando produtos de teor reduzido de açúcar, produtos para diabéticos néctares frescos, sucos;
- formulações para produtos alimentícios para animais com os mesmos efeitos prebióticos (aditivos alimentares para suínos e aves domésticas);
- podem ser usados em outros tipos de indústrias que não as de alimentos (ração para gado, aves).

2.7 Inulina

A inulina foi descoberta por Rose, em 1804 (Gibson et al., 1994) e, nos meados do século XIX, sua rota bioquímica foi elucidada. Entretanto, suas propriedades de resistência à digestão só foram descobertas no início do século XX. Somente mais recentemente é que foram descobertas as propriedades benéficas à saúde deste tipo de carboidrato e, conseqüentemente, sua produção industrial despertou mais interesse (Nitschke & Umbelino, 2002).

A inulina é formada por uma mistura heterogênea de polímeros de frutose (GFn ou Fm) amplamente distribuída na natureza como compostos de reserva de vegetais. As unidades de frutose são, geralmente, unidas por ligações do tipo β 2-1; quase todas as cadeias podem ter até 60 unidades que terminam com uma molécula de glicose (Niness, 1999) (Figura 5).

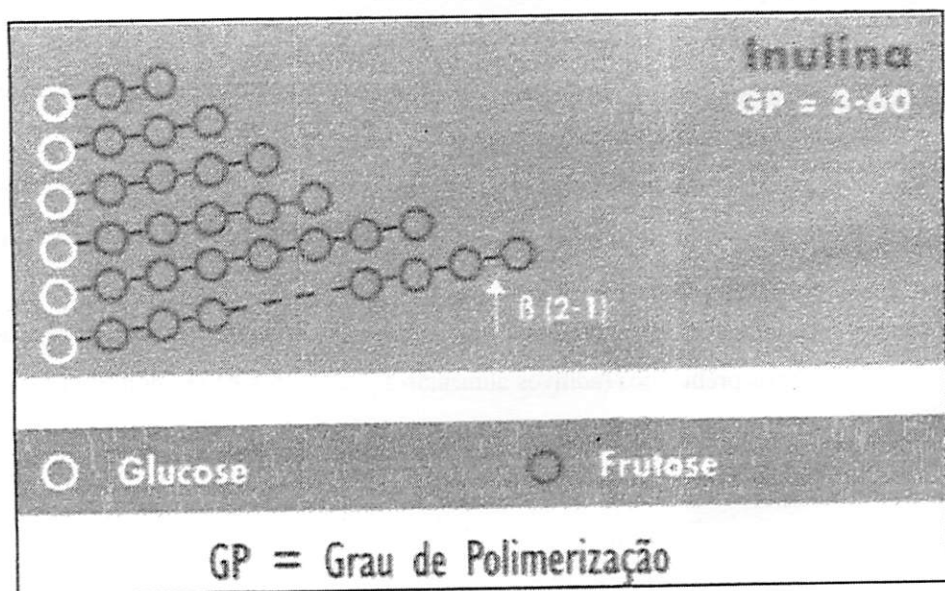


FIGURA 5 - Representação esquemática da inulina (Orafti, 2004).



A molécula de inulina também pode apresentar uma pequena incidência de ramificações, dependendo da planta de origem. No caso da inulina de chicória *Chicorium inibus*, são encontradas entre 1% e 2% de ramificações do tipo β 2- 6.

A produção de inulina é realizada a partir da extração de raízes de chicórias. A inulina é extraída com água quente, conforme Figura 6, por um processo semelhante ao da extração de açúcar de beterraba (Gibson et al., 1994).

2.7.1 Fluxograma de extração da inulina de raízes de chicória

A Figura 6 representa a seqüência de extração da inulina das raízes de chicória

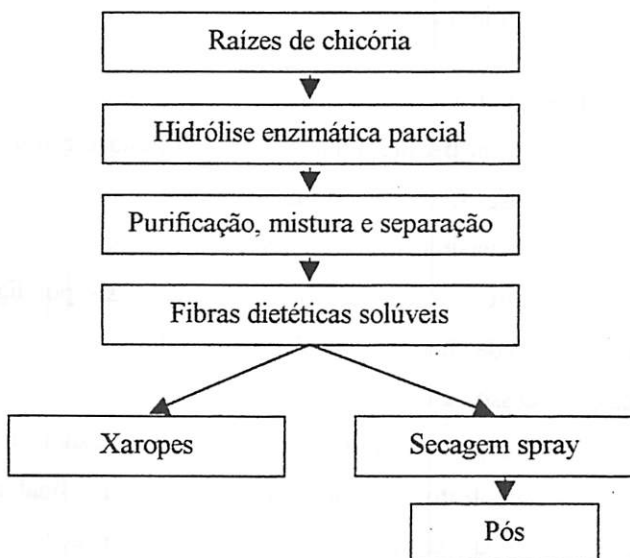


FIGURA 6 - Passos para a extração de inulina de chicória (Orafiti, 2004 - adaptado).

A preparação comercial denominada Raflinose (Orafti - Bélgica) tem entre 92% e 99% de inulina (DP 2 - 50). Para a produção industrial de oligofrutose são utilizados dois métodos principais:

a) A partir da inulina

A hidrólise enzimática controlada da molécula de inulina utiliza a enzima inulinase, formando uma mistura de FOS do tipo GF_n onde $n = 2 - 9$ e F_m em que $m = 1 - 9$. Este processo é utilizado na produção de raflinose (Orafti-Bélgica), a partir da inulina extraída de raízes de chicória. A raflinose é comercializada em diversos graus de pureza, em forma de pó ou de xarope. A concentração de FOS varia de 35% > 95% e o produto também apresenta diferentes teores de glicose, frutose e sacarose, dependendo do grau de pureza (Gibson et al., 1994; Playne et al., 1996).

b) A partir da sacarose

Utiliza a enzima β -frutofuranosidase que promove a transfrutossilacção de moléculas de sacarose. É necessária uma alta concentração de substrato inicial (sacarose) para a eficiente atividade enzimática. Os FOS formados a partir deste processo contêm entre 2 e 4 unidades de frutose unidas por ligações β 2 - 1, contendo um resíduo de glicose terminal, ou seja, GF_n.

Neste processo não são produzidos FOS do tipo F_m, os compostos formados são denominados 1-Ketose, nistose e frutofruanosilnistose. Glicose e pequenas porções de frutose também são detectadas ao final da reacção, bem como sacarose que não sofreu acção enzimática. Estes açúcares residuais são removidos da mistura de oligossacarídeos utilizando técnicas cromatográficas e resultando na obtenção de FOS de alta pureza (Crittenden et al., Playne et al., 1996). As fontes de enzimas para a síntese de oligofrutoses podem ser divididas em duas classes: originárias de plantas como aspargo, beterraba, cebola e alcachofra e as originárias de microrganismos como *Aspergillus* sp,

Aureobasidium sp., *Arthrobacter* sp e *Fusarium* sp. Atualmente a produção de oligofrutoses depende basicamente de enzimas fúngicas (Yun, 1996).

2.7.2 Aspectos nutricionais

Os efeitos benéficos de um grande número de produtos alimentícios contendo inulina é conhecido há séculos. Entretanto, a ciência tem descoberto que estes efeitos benéficos podem ser atribuídos à presença de inulina. Essencial neste fato é que inulina e oligofrutose são resistentes à hidrólise por enzimas digestivas. Quando ingeridas, chegam integralmente intactas e não são hidrolisadas nas suas unidades monossacarídeas na parte do intestino, conforme Figuras 7 e 8.

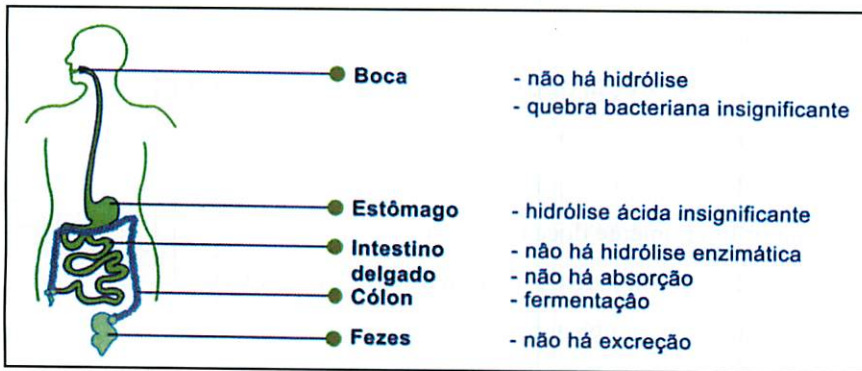


FIGURA 7 - Caminho da inulina no canal alimentar.

Fonte: Orafti (2004).

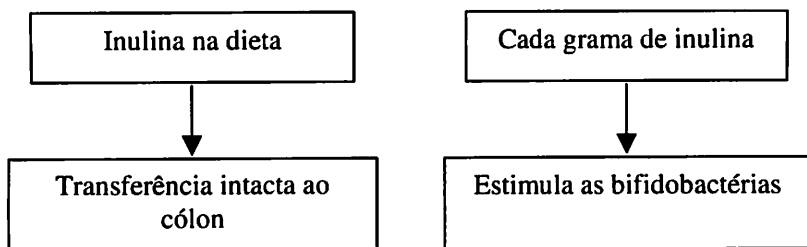


FIGURA 8 - Inulina melhora a função do sistema digestivo.

Fonte: Orafti (2004).

A inulina é seletivamente fermentada pela microbiota, proporcionando os seguintes benefícios nutricionais, como citados abaixo:

- efeito de fibra dietética, melhorando a função intestinal;
- efeito prebiótico ou bifidogênico, promovendo uma proteção contra patógenos;
- aumenta a absorção de cálcio, essencial para ossos fortes;
- pode ser usadas como substitutas de gordura;
- fácil dispersão nos líquidos;
- sabor ligeiramente doce ou neutro;
- elevada solubilidade e estabilidade térmica e ácida;
- estimula as bifidobactérias;
- melhora do sabor e textura;
- utilizada em alimentos para enriquecimento com fibras;
- aumento da massa fecal, diminuição do pH das fezes;
- diminuição da resposta glicêmica, do colesterol HDL/LDH;
- diminuição dos lipídios do sangue;
- sinergia com edulcorantes de alta intensidade.

2.8 Alimentos funcionais

A principal função da dieta é fornecer nutriente suficiente para suprir os requerimentos necessários para uma alimentação balanceada, e ao mesmo tempo, proporcionar sensação de satisfação e bem-estar. Os mais recentes conhecimentos da biociência sustentam a hipótese de que a dieta também controla e modula várias funções no organismo, como a manutenção da boa saúde e a redução de risco de algumas doenças (Roberfroid, 1998; Bozanic et al., 2001).

Na última década, tem-se observado crescente preocupação da população mundial com a qualidade de vida, levando os consumidores à procura por alimentos que lhe proporcionem melhor saúde e qualidade de vida.

Para atender a esta crescente procura a ciência e a tecnologia de alimentos têm procurado desenvolver uma imensa gama de produtos alimentícios que além de promover a nutrição básica, promova benefícios fisiológicos adicionais à saúde. Estes produtos são conhecidos como alimentos funcionais.

O termo “functional foods” foi introduzido inicialmente no Japão em meados dos anos 1980, referindo-se aos alimentos processados contendo ingredientes que auxiliam as funções específicas do organismo, além de serem nutritivos (Hasler, 1998). São conhecidos também como FOSHU (“Foods for Specifeid Health Use”).

Segundo Brasil (1999), alegação de propriedade funcional é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano; alegação de propriedade de saúde, é aquela que afirma, sugere ou implica a existência de relação entre o alimento ou ingrediente com doença ou condição relacionada à saúde.

Sanders (1998) enumerou seis causas para o aumento da procura por alimentos funcionais, a saber:

- aumento dos custos médicos;
- os consumidores estão mais cientes sobre a relação entre a saúde e a nutrição;
- envelhecimento da população;
- desejo de combater os males causados pela poluição, microrganismos e agentes químicos no ar, na água e nos alimentos;
- aumento das evidências científicas sobre a sua eficácia.

O desenvolvimento maior em alimentos funcionais é em relação aos alimentos contendo probióticos e prebióticos que melhoram a flora microbiana do intestino. Há crescentes evidências científicas para sustentar a idéia de que a manutenção da microbiota saudável pode proporcionar proteção contra desordens gastrintestinais, incluindo infecções gastrintestinais, doenças inflamatórias do intestino e até mesmo câncer (Haenel & Benig, 1975; Mitsuoka, 1982; Salminen et al., 1998).

Bifidobacterium e ou *Lactobacillus* são microrganismos alvos por atender as características de funcionais. Finalmente, simbióticos são misturas de probióticos e prebióticos (Gibson & Roberfroid, 1995), as quais podem beneficiar o hospedeiro por melhorar a sobrevivência e a implantação do seletivo suplemento microbiano. Por causa dos benefícios nutricionais associados com a microflora, os alimentos são os principais veículos para probiótico, prebiótico e simbiótico (Ziemer & Gibson, 1998), conforme Figura 9.

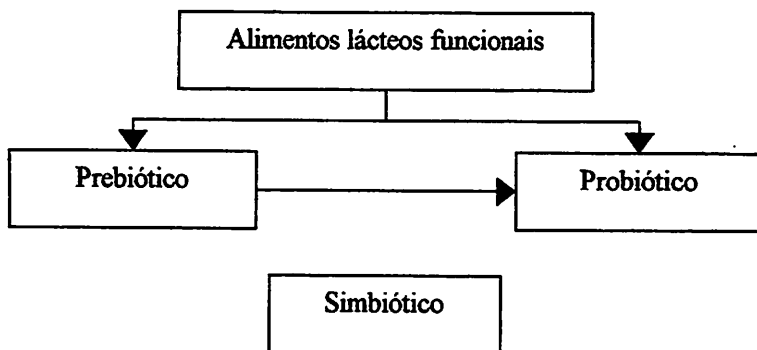


FIGURA 9 - Fluxograma de interação dos alimentos funcionais (Tamine, 2002).

2.8.1 O mercado mundial de alimentos funcionais

O mercado mundial de alimentos funcionais movimentava cerca de US\$60 bilhões e com expectativas de crescimento da ordem de 5% ao ano, sendo responsável por mais da metade dos investimentos publicitários na área alimentícia (Hardy, 2000; Swadling, 2001).

O principal fator que contribuiu para o aumento rápido deste mercado é a estimativa de que pelo menos cerca de um sexto das causas de morte está relacionada com a dieta. A melhoria da dieta futura dos consumidores pode aumentar a expectativa e a qualidade de vida da população como um todo (Brandão, 2002).

Na Alemanha, França e Reino Unido, 10% a 20% dos consumidores já ouviram falar em alimentos funcionais e 80% concordam com a adição de ingredientes benéficos à saúde, ingredientes já conhecidos, como vitaminas, minerais, gordura poliinsaturada, fibras, bífidos/acidófilos e ômega 3 (Yokoyama, 1999).

No oriente, o Japão foi o líder mundial no desenvolvimento de alimentos funcionais, representando 5% do mercado alimentício para produtos

processados, com potencial de US\$7 bilhões. Destes, 40% são adicionados de fibras, 20% de cálcio, 20% oligossacarídeos, 10% bactérias e 10% de outros (Castro, 2003).

2.9 Queijo simbiótico

Potencialmente, os efeitos promovidos à saúde dos consumidores pelos produtos lácteos, nos quais são incorporados microrganismos probióticos tais como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* spp., têm estimulado maiores esforços de pesquisas nos anos recentes (Sanders, 1994; Lee & Salminen, 1995).

A maior parte dos alimentos popularmente distribuídos para essas culturas tem sido de alimentos lácteos fermentados fresco, tais como iogurte e leite fermentado, assim como leite não adicionado de cultura (Fernandes et al., 1987; De Simeone et al., 1989; Alm, 1991; Sanders et al., 1996; Bourlioux & Pochart, 1998).

No esforço para expandir a cadeia de produtos probióticos, um grande número de pesquisadores e companhias tem-se esforçado para fabricar queijos que contenham uma alta contagem de culturas probióticas viáveis (Gardiner & Lynch, 1999; Mc.Brearty et al., 2001).

Para exercer seu efeito benéfico, as bactérias probióticas têm que ser viáveis e presentes em alto número no produto durante o período de estocagem do alimento (self life). Um número adicional de fatores demonstra os benefícios das bactérias probióticas para incorporação em sistemas alimentícios e isto inclui a habilidade das estirpes sobreviverem ao processo de fabricação do alimento, a vida de prateleira do produto e a passagem pelo trato gastrointestinal (Stanton & Lynch, 1998; Mc.Brearty et al., 2001).

No Japão, os leites fermentados e bactérias lácticas associadas têm sido recomendados e estes produtos probióticos devem conter 10^7 células viáveis por

gramas ou mililitro (Ishibashi & Shimamura, 1993). Geralmente, bifidobactéria tem pobre viabilidade em produtos lácteos fermentados e vários estudos têm indicado que nem todos os produtos probióticos contm os níveis recomendados de microrganismos viáveis (Kaiyalasapathy & Rybka, 1997).

Fatores que afetam a viabilidade das bifidobactérias em alimentos fermentados incluem acidez, pH, temperatura de estocagem, conteúdo de oxigênio e concentração de ácidos láctico e acético (Roy et al., 1997). A incorporação de bifidobactérias em alimentos fermentados é dificultada pela necessidade de condições rigorosas para o crescimento e cultivo em altas quantidades, as quais incluem ambiente anaeróbico, crescimento ótimo em temperaturas de 37°C a 41°C e valor ótimo de pH de 6,5 a 7,0 (Gomes et al., 1995).

Recentemente, um grande número de estudos (Dinakar & Mistry, 1994; Gardiner et al., 1998; Oliveira et al., 2002) tem relatado o desenvolvimento de uma gama de variedades de queijos contendo bifidobactérias, como os queijos cheddar, gouda (Gomes et al., 1995), cottage (Blanchette et al., 1996), branco salgado (Ghoddusi & Robinson, 1996), crescenza (Gobbetti et al., 1997) e queijo fresco (Roy et al., 1997), revelando-se apropriados como carreadores de *Lactobacillus* e *Bifidobactéria* (Gardiner & Lynch, 1999; Mc. Brearty et al., 2001).

Daigle et al. (1999) relataram um estudo com um queijo semelhante ao cheddar produzido com leite microfiltrado. O leite era produzido por meio da adição de creme enriquecido com retentato de fosfocaseinato e fermentado com *Bifidobacterium infantis*. Os autores obtiveram contagens de bifidobactéria em níveis acima de 10^6 UFC/g durante, pelo menos, 12 semanas. Paralelamente, não foram observados efeitos da cultura sobre as características dos queijos.

Em estudos realizados com queijo minas frescal fabricado com 1% de cultura probiótica composta por *S. thermophilus*, *B. lactis* e *L. acidophilus* e

mantido armazenado durante 21 dias a 8,5°C, a viabilidade do *L. acidophilus* permaneceu estável por 14 dias, aumentando ligeiramente para após 21 dias. A contagem de probióticos foi de $1,3 \times 10^6$ a $3,4 \times 10^7$ UFC/g, enquanto a de *S. thermophilus* variou de $3,8 \times 10^8$ a $8,0 \times 10^8$ UFC/g (Oliveira et al., 2002).

Foi observado que a textura do queijo fabricado com culturas probióticas após um dia de fabricação apresentou dureza intermediária entre a dos queijos fabricados com cultura O e com ácido láctico. Após 7 dias, a dureza do queijo preparado com bactérias probióticas aumenta, provavelmente, devido à pós-acidificação e à perda de umidade (Oliveira et al., 2002).

Vale ressaltar que o queijo probiótico deve ser produzido sem alteração na tecnologia de fabricação do queijo tradicional, tornando o processo atrativo do ponto de vista comercial. Além disso, as pesquisas relatadas sugerem que menor quantidade de algumas bactérias probióticas permanecem altamente viáveis durante o período de maturação e evidências preliminares sugerem que o queijo é tão efetivo quanto o iogurte para a distribuição destas estirpes no trato gastrointestinal (Gardiner & Lynch, 1998; Mc Brearty et al., 2001).

2.10 Análise sensorial

Nas últimas décadas tem-se verificado que o consumidor está a cada dia mais exigente quanto à qualidade dos produtos alimentícios, provocando um aumento na competitividade entre as indústrias de alimentos, que vêm procurando oferecer produtos com garantia de qualidade, tornando-se de grande valia para a obtenção de vantagens mercadológicas.

Os métodos disponíveis para o levantamento das causas de perda de qualidade em alimentos são de três tipos: físicos-químicos, microbiológicos e sensoriais. Além das características de qualidade relacionadas com a segurança da saúde do consumidor, a qualidade sensorial apropriada dos produtos deve ser

um dos objetivos da indústria, pois contribui para assegurar a liderança do produto no mercado. O método mais simples, rápido e direto de acesso às causas de defeitos de qualidade é a avaliação ou análise sensorial. Além disso, não há métodos analíticos isolados que possibilitem avaliar, satisfatoriamente, propriedades sensoriais, como sabor e aparência (BodyFelt et al., 1988).

Segundo Moskowitz (1988), a metodologia empregada pela análise sensorial para descrever as características sensoriais com precisão em termos matemáticos é a “análise descritiva quantitativa” (ADQ), que descreve e quantifica os atributos sensoriais de um produto e a intensidade de percepção dos provadores. Esta técnica é valiosa quando deseja-se obter melhores informações sobre a aparência, o sabor, o aroma, a textura e a cor dos alimentos. Ela é utilizada e aplicada na solução de diversos problemas relacionados com controle de qualidade, desenvolvimento de novos produtos, vida de prateleira, desenvolvimento de processos, melhoramento de produtos e correlação entre análises instrumentais ou químicas e sensoriais (Damásio & Costell, 1991; Magalhães, 1996).

A seleção e o treinamento de provadores podem ser efetuados pelo método de diferenças, mais especificamente o teste triangular. Esse teste também pode ser aplicado quando se deseja determinar pequenas diferenças entre as amostras ou na avaliação das diferenças que envolvam todos os atributos organolépticos como textura, odor, acidez, doçura, cor, aparência e salinidade (Teixeira, 1987).

O teste triangular é empregado especificamente quando o número de provadores é limitado, quando as amostras são homogêneas, quando não há problemas de fadiga ou adaptação sensorial, ou, ainda, quando, a dimensão da diferença é conhecida ou é de muita complexidade para os provadores. Este teste é composto de três amostras, duas iguais e uma diferente, que não são entregues simultaneamente aos provadores, que deverão identificar a amostra diferente

(Teixeira, 1987).

Uma importante técnica de avaliação sensorial é a de escalas e categorias, que determinam a ordem ou o número de diferenças, a localização das amostras por classe, ou seja, em qual classe a amostra está localizada. O teste de preferência, implica na escolha de amostras ou produto sobre o outro, o que pode ser afetado pelas condições econômicas, sociais, culturais, sexo e idade. O teste de ordenação-pareada pode ser aplicado quando da avaliação de um grande número de amostras, ao mesmo tempo, sendo amplamente utilizado pela simplicidade e facilidade de aplicação e interpretação dos resultados. Nesse teste várias amostras com padrões ou não, são apresentadas aos provadores, que devem arruma-lás em ordem crescente ou decrescente, de acordo com a sua preferência (Anzaldúa-Morales, 1994).

2.11 Análise generalizada de procrustes (GPA)

A Análise Generalizada de Procrustes (GPA) pode ser considerada uma metodologia exploratória multivariada, uma vez que não se ocupa em fazer inferência, mas em descrever o fenômeno e propiciar a obtenção de conclusões relativas. Por exemplo, pode-se determinar qual é o melhor produto em relação aos outros participantes do estudo, qual produto apresenta relativamente, maior quantidade de uma determinada variável de interesse, qual o consenso do painel de provadores acerca de um produto, etc. (Ferreira, 2004).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Universidade Federal de Lavras e no Laticínio Verde Campo.

As análises físico-químicas e sensoriais foram feitas no Departamento de Ciência dos alimentos (DCA) e as análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia e Higiene de Alimentos da Universidade de Lavras (UNILAVRAS)

3.1 Fabricação do queijo minas padrão com adição de probiótico e prebiótico

3.1.1 *Matéria-prima*

Para a fabricação dos queijos, foram utilizados 600 litros de leite pasteurizado com 3,5% de gordura, acidez entre 15 e 16 °D (Dornic), divididos em 3 lotes para as repetições com 200 litros cada. Em cada repetição, separaram-se porções iguais da massa do queijo para os tratamentos, que diferenciaram-se pela adição do prebiótico inulina: testemunha 0%, 2% e 4%. Os queijos prontos e embalados foram armazenados para o processo de maturação nos tempos de 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90 dias. Conforme recomendação do Ministério da Agricultura (Brasil, 1997), o queijo minas padrão deve ter 90 dias de maturação. Amostras foram submetidas às análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais.

A Figura 10 representa o fluxograma de fabricação do queijo minas padrão experimental adicionado de pró e prebióticos.

3.2 Fluxograma de fabricação do queijo minas padrão

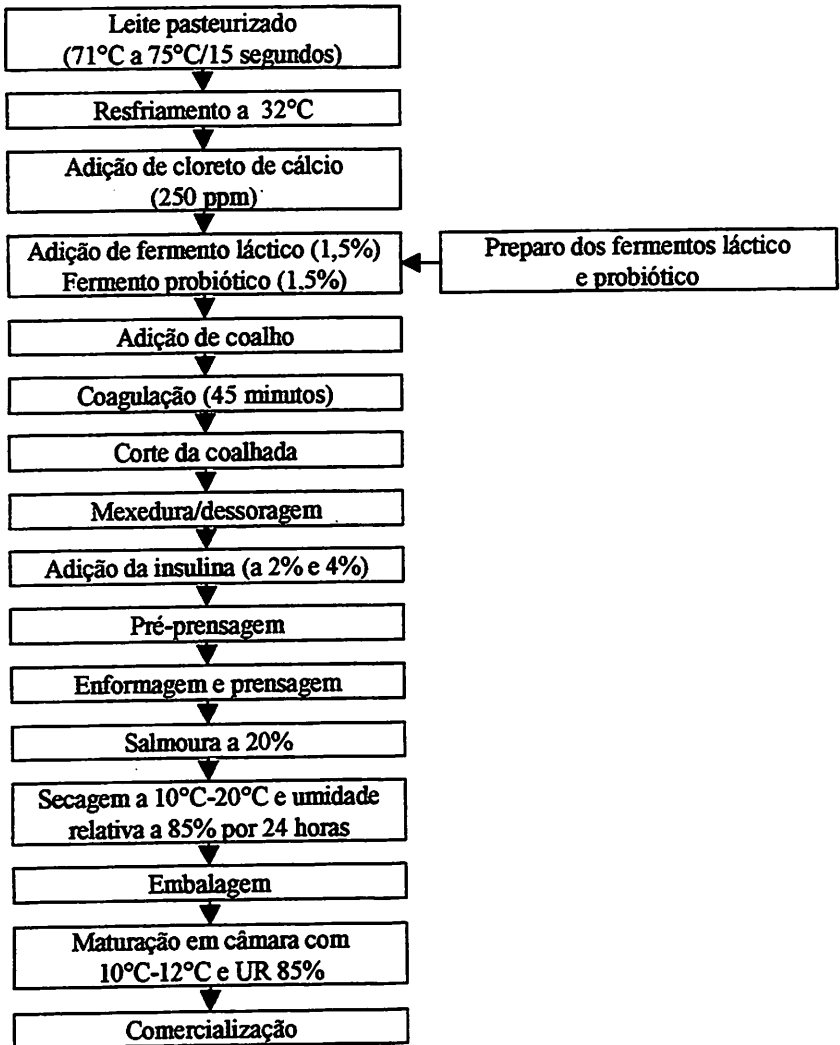


FIGURA 10 - Fluxograma de fabricação de queijo minas padrão com adição de probiótico e prebiótico.

3.3 Ingredientes utilizados na fabricação do queijo

3.3.1 Cloreto de cálcio

Adicionou-se ao leite uma solução de cloreto de cálcio a 50%, na proporção de 250 mg/L de leite.

3.3.2 Culturas lácticas

Empregaram-se culturas lácticas mesófilicas mistas *Lactococcus lactis* spp. *lactis* e *Lactococcus lactis* spp. *cremoris*, MA - 016 (Fermentec^R), na proporção de 1,5%.

3.3.3 Coalho

Foi utilizado coalho bovino líquido comercial na proporção 25mL/100litros de leite, conforme indicação do fabricante.

3.3.4 Culturas lácticas probióticas

As culturas lácticas probióticas forma empregadas na proporção de 1,5, as quais sejam:

- *Lactobacillus acidophilus* La-14 (Fermentec^R);
- *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* LBC - 81 (Fermentec^R).

3.3.5 Salmoura

A salga dos queijos foi feita em solução de cloreto de sódio a 20% (m/v), em água a 15°C, por 24 horas.

3.3.6 Prebiótico

Empregou-se a inulina em pó (Raftiline St), Clariant^R com 92% de grau de pureza.

3.4 Análise do leite

3.4.1 Análise físico-química do leite pasteurizado

Todas as análises do leite foram realizadas em duplicatas, seguindo-se as técnicas descritas pela Instrução Normativa do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2003).

Foram analisados os seguintes análises físico-químicas no leite:

- pH - pHmetro;
- acidez titulável (°D) - empregando método titrimétrico com solução alcalina;
- gordura - pelo método butirométrico de Gerber;
- densidade - determinada por de leitura direta, utilizando-se um termolactodensímetro de Quevenne;
- crioscopia - determinada empregando-se crioscópio eletrônico Laktron^R;
- peroxidase - método do guaiacol a 2%;
- fosfatase alcalina - empregando-se Kit fosfatase Merck^R.

3.4.2 Análise microbiológica do leite pasteurizado

A contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos foi realizada pelo método de plaqueamento em profundidade utilizando PCA (*Plate Count Agar*), segundo metodologia descrita por Marshall (1992) e análises de coliformes e psicrotróficos descritas por Brasil (2002).

3.5 Análise dos queijos

3.5.1 Análise físico-química dos queijos

3.5.1.1 Amostragem dos queijos para análise

Todas as análises foram realizadas em triplicata, seguindo as técnicas descritas pela Instrução Normativa do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2003).

As amostras de queijos foram coletadas nos tempos 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90 dias de maturação e estavam embaladas em película plástica termoencolhível á vácuo em equipamento selovac^R 300 e armazenadas em câmara de maturação sob temperatura de 10°C - 12°C e umidade relativa de 85%.

3.5.1.2. Preparo das amostras

As amostras foram cortadas em várias porções, de acordo com o esquema contido no Anexo I do regulamento (Brasil, 2003). Após retirar-se a parte não comestível da amostra, o queijo foi triturado em processador, homogeneizado e acondicionado em frasco de boca larga com tampa. Conservou-se em geladeira até o início das análises, conforme metodologia

descrita na Instrução Normativa do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2003).

3.5.1.3 Análise físico-química dos queijos

As amostras dos queijos contendo 0%, 2% e 4% de inulina foram coletadas com 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90 dias de maturação. As seguintes análises foram realizadas:

- **gordura** - determinada pelo método do butirômetro para queijos;
- **pH** - as determinações foram medidas com a utilização de pHmetro Hanna^R 8314, previamente calibrado;
- **acidez** - empregando método titrimétrico com solução alcalina;
- **cloreto de sódio** - AOAC (1995).

3.5.2 Análise microbiológica do queijo

3.5.2.1 Amostragem dos queijos para análise microbiológica

As amostras de queijos contendo 0%, 2% e 4% de inulina foram coletadas com 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90 dias de maturação.

Foram pesados 25 gramas das amostras em capela de fluxo laminar, colocadas em copos homogeneizadores tarados, adicionando-se 225 mL de água peptonada a 0,1% e citrato de sódio a 2%.

Homogeneizaram-se e prepararam-se diluições de 10^3 , 10^4 , 10^5 .

*3.5.2.2 Contagem de microrganismos do gênero *Lactobacillus* nos queijos*

As contagens microbiológicas do gênero *Lactobacillus* spp. foram

realizadas segundo método descrito por Ravula et al. (1998). Aliquotas de 1 mL das diluições previamente selecionadas foram semeadas em placas contendo o meio *Lactobacillus* MRS Ágar, utilizando o método de plaqueamento em profundidade. As placas, após inoculação, foram incubadas a 37°C por 48 horas. Todas as análises foram feitas em duplicata e o resultado foi expresso em UFC/g.

3.6 Análise do soro

3.6.1 Análise físico-química do soro

As análises do soro foram feitas em duplicatas e foram analisadas seguindo as técnicas descritas pela Instrução Normativa do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2003). Foram realizadas as seguintes análises:

- acidez no ponto e no corte - empregando método titrimétrico com solução alcalina;
- gordura - pelo método butirométrico de Gerber.

3.7 Análise da salmoura

3.7.1 Análise físico-química da salmoura

A análises da salmoura foi feita em triplicata, e seguindo as técnicas descritas pela Instrução Normativa do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2003), sendo as seguintes análises:

- o pH foi medido no pHmetro Hanna^R 8314, previamente calibrado.

3.9 Análise sensorial nos queijos

As análises sensoriais foram realizadas no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras. Houve uma seleção, seguida de um treinamento dos provadores (alunos da pós-graduação e graduação, professores ou funcionários do departamento), observando-se disponibilidade de tempo, atenção, aptidão e responsabilidade. Foi recrutado um grupo de 20 pessoas para o treinamento e, no final, foram selecionadas 15 pessoas que foram submetidos a uma série de testes de diferenças, teste triangular, visando avaliar a habilidade sensorial dos provadores.

As amostras, em quantidade suficiente e à temperatura ambiente, foram avaliadas em dois horários, de manhã e à tarde, em cabines individuais, codificadas com três dígitos aleatórios e apresentadas aos provadores em duas repetições para os atributos sabor e textura e em uma repetição para cor e aparência.

Os queijos elaborados com 0%, 2% e 4% de inulina foram submetidos à análise sensorial aos 0, 15, 30 e 45 dias de maturação para avaliação dos atributos sabor, textura, aparência e cor, utilizando Teste Duplo de Ordenação-Preferência (Della -Modesta, 1994), conforme ficha de resposta (Figura 11 e 12). Também foram submetidos ao Teste de Aceitação, mediante o uso de escala hedônica de 9 pontos (Stone et al., 1985), conforme ficha de resposta (Figura 13).

Teste de Qualidade

PRODUTO: QUEIJO

Nome: _____ Data: / /

Você está recebendo 03 amostras de queijo. Por Favor, começando da esquerda para a direita, avalie sua qualidade (Sabor e Textura) de acordo com a escala anexa. Lave a boca antes e entre as amostras.

Amostras: _____

Sabor: _____

Textura: _____

Comentários: _____

Você está recebendo 03 amostras de queijo. Por Favor, começando da esquerda para a direita, avalie sua qualidade (Aparência e Cor) de acordo com a escala anexa. Lave a boca antes e entre as amostras.

Amostras: _____

Aparência: _____

Côr: _____

Comentários: _____

FIGURA 11 - Ficha de qualidade teste duplo de ordenação - preferência.
Fonte: Della-Modesta (1994).

Teste de ordenação - qualidade

PRODUTO: QUEIJO

Nome: _____ Data: ____/____/____

Você está recebendo 04 amostras de queijo. Por favor, prove da esquerda para a direita e ordene decrescentemente a qualidade (melhor amostra em primeiro lugar). Atribua notas de 1 a 9 para cada amostra (conforme escala anexa). Lave a boca antes e entre cada amostra.

Amostras: _____

Ordenação: _____ () _____ () _____ () _____ ()

Amostras: _____

Ordenação: _____ () _____ () _____ () _____ ()

Comentários: _____

FIGURA 12 - Teste de ordenação - qualidade.
 Fonte: Della-Modesta (1994).

Escala de qualidade

9 - Gostei extremamente
 8 - Gostei muito
 7 - Gostei moderadamente
 6 - Gostei ligeiramente
 5 - Indiferente
 4 - Desgostei Ligeiramente
 3 - Desgostei moderadamente
 2 - Desgostei muito
 1 - Desgostei extremamente

FIGURA 13 - Ficha de resposta do teste de aceitação (escala hedônica de nove pontos - modificada).
 Fonte: Stone et al. (1985).

3.10 Análise estatística dos dados

O delineamento experimental empregado foi em blocos casualizados (DBC) (três blocos), conforme Tabela 8, analisado em esquema fatorial de 3 x 8, ou seja, 3 doses de inulina e 8 tempos de maturação, a 5% de significância. Os resultados foram submetidos à análise de variância com aplicação do teste F. Quando o teste apresentou-se significativo, a análise estatística tem continuidade por meio de regressão polinomial. As análises de variância foram feitas nos softwares R (R, 2003) e Sisvar (Ferreira, 2000). Além disso, foi realizada a Análise Generalizada de Procrustes (Gower, 1975) dos dados de análise sensorial, no software R.

TABELA 8 - Esquema do delineamento experimental utilizado.

Delineamento do experimento				
Inulina	Blocos	Tempo de maturação (dias)	Total	Análises realizadas
0%	3	0, 1, 15, 30, 45, 60, 75, 90	24	Físico-químicas,
2%	3	0, 1, 15, 30, 45, 60, 75, 90	24	Microbiológicas
4%	3	0, 1, 15, 30, 45, 60, 75, 90	24	e sensoriais

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise do leite

4.1.1 Análise físico-química do leite pasteurizado

Os resultados das análises físico-químicas do leite usados na fabricação dos queijos estão apresentados na Tabela 9.

TABELA 9 - Valores médios da análise físico-química do leite pasteurizado usado na fabricação dos queijos adicionados de probióticos e prebióticos.

	Leite		
	1ª fabricação	2ª fabricação	3ª fabricação
pH	6,6	6,7	6,7
Acidez (ac. láctico/100mL)	0,15	0,17	0,15
Crioscopia (°H)	- 0,530	- 0,530	- 0,530
Densidade (15/15°C,g/mL)	1,030	1,027	1,030
Nitrogênio total (g/100g)	0,56	0,54	0,55
Nitrogênio não protéico(g/100g)	0,10	0,11	0,11
Gordura (g/100g)	3,5%	3,5%	3,5%
Peroxidase	+	+	+
Fosfatase	-	-	-

De acordo com a legislação (Brasil, 1996), a matéria-prima destinada à realização deste trabalho encontra-se dentro da faixa aceitável para fabricação do queijo minas padrão.

4.1.2 Análise microbiológica do leite pasteurizado

Os resultados das análises microbiológicas da matéria prima são apresentados na Tabela 10.

TABELA 10 - Análises microbiológicas do leite pasteurizado.

Leite pasteurizado	1 ^a fabricação	2 ^a fabricação	3 ^a fabricação
Contagem total de mesófilos (UFC/mL)	$2,5 \times 10^4$	$3,3 \times 10^4$	$3,6 \times 10^4$
Coliformes (NMP/mL) (35°C)	< 0,3	< 0,3	< 0,3
Coliformes (NMP/mL) (44,5°C)	< 0,0	< 0,0	< 0,0
Psicrotróficos (UFC/mL)	1×10^3	2×10^3	1×10^3

Observou-se que os resultados das análises microbiológicas do leite nos três tratamentos apresentaram-se dentro dos padrões exigidos pelo Ministério da Agricultura (Brasil, 2002), indicando a eficiência da pasteurização do leite a 72°C/15s.

Segundo Pinheiro (1985) e Brasil (1997), a utilização deste binômio tempo/temperatura visa à destruição total dos microrganismos patogênicos ou flora anormal do leite, evitando disseminação de doenças e preservando as características físico-químicas, sensoriais e nutritivas do produto final.

4.2 Análise físico-química do soro do queijo

Os resultados das análises do soro do queijo estão apresentados na Tabela 11.

TABELA 11 - Análise físico-química do soro no queijo no momento do corte e do ponto da massa.

Fabricação	Soro de queijo					
	Corte			Ponto		
	1ª	2ª	3ª	1ª	2ª	3ª
pH	6,40	6,40	6,40	6,30	6,40	6,40
Gordura (g/100g)	0,50	0,40	0,50	0,50	0,40	0,40
Acidez em g ácido láctico/100mL	13,50	14,00	12,00	13,50	14,00	13,00
Nitrogênio total (g/100g)	0,23	0,28	0,29	0,22	0,22	0,26
Nitrogênio não protéico (g/100g)	0,14	0,15	0,14	0,15	0,15	0,15

Verificou-se que não houve perda de gordura no soro no corte e no momento da dessoragem da massa, indicando não ter havido perda de gordura durante a fabricação do queijo. Estes resultados foram inferiores aos citados por Furtado et al. (1980), que obtiveram valores maiores que 0,64% de gordura no soro. A perda de sólidos do leite durante a fabricação de queijo depende do corte do grão, do tamanho dos grãos e da agitação no ponto refletindo a adequação à tecnologia de fabricação. Os valores de pH do soro e acidez foram semelhantes aos resultados obtidos por Furtado (1980) e Vieira (1984), que também encontraram valores de pH em torno de 6,4 e da acidez em torno de 13,0 a 14°D.

4.3 Análise físico-química da salmoura

Os valores de pH da salmoura foram semelhantes nas três repetições, conforme Tabela 12.

Segundo Furtado (1991), o pH da salmoura, para a maioria dos queijos, varia de 5,0 a 5,4, faixa que se ajusta os resultados do presente experimento. O sal exerce um importante papel nas reações físico-químicas e microbiológicas dos queijos. Quando o pH da salmoura é demasiado baixo, pode aproximar-se do ponto isoelétrico da caseína (4,6) e ocorre a precipitação de proteínas na casca

do queijo, o que aumenta a perda de água pelo queijo, ao mesmo tempo em que diminui a velocidade de absorção do sal (Furtado, 1991).

TABELA 12 - Valores de pH das salmouras utilizadas nas três fabricações dos queijos.

Fabricação	Valores de pH
1 ^a	5,1
2 ^a	5,0
3 ^a	5,1

4.4 Análise dos queijos

As Figuras 14 e 15 mostram os queijos fabricados neste experimento. Na Figura 14, os queijos minas padrão com adição a 0%, 2% e 4% de inulina e na Figura 15, os queijos na câmara de maturação.

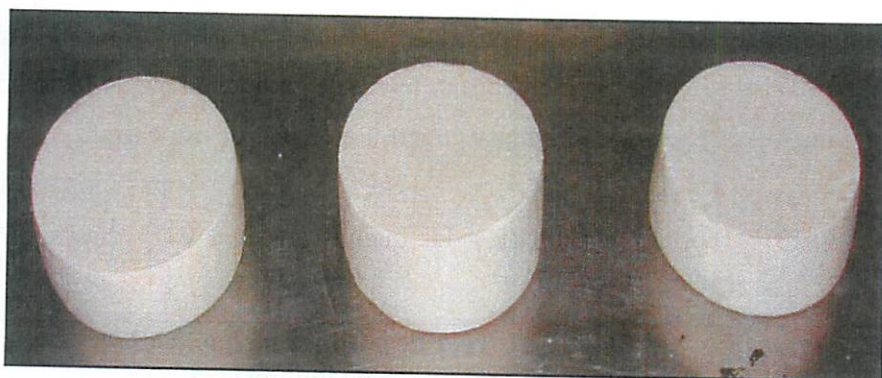


FIGURA 14 - Queijo minas padrão com adição de 0%, 2% e 4% de inulina.



FIGURA 15 - Queijo minas padrão na câmara de maturação.

4.4.1. Análise físico-química dos queijos

4.4.1.1 Teor de gordura dos queijos

Na Tabela 13 está representados os teores de gordura no queijo fabricado sem inulina, com 2% e 4% de inulina e com 0, 1 e 15 dias de estocagem.

TABELA 13 - Teor de gordura (%) dos queijos aos 0, 1 e 15 dias após a salmoura.

Dias após a fabricação do queijo	Teor de gordura no queijo (%) % de inulina (%)		
	0	2	4
0	29,0	29,5	29,0
1	29,0	30,0	30,0
15	29,0	29,0	29,0

Os percentuais de gordura dos queijos variaram de 29% a 30%, apresentando semelhante ao valor citado por Furtado (1998) e de acordo com regulamento técnico de identidade dos queijos (Brasil, 2003).

Segundo Siqueira (1984), o teor de gordura do leite exerce um papel importante na composição final do queijo minas. O mesmo autor afirma que o aumento do teor de gordura do leite pode resultar em maiores perdas de teor de gordura no soro, o que não foi observado neste trabalho, pois a gordura no soro manteve-se constante durante os primeiros 15 dias de maturação dos queijos.

4.4.1.2 Valor do pH dos queijos

Os valores de pH dos queijos durante os 90 dias de maturação estão apresentados na Tabela 14.

TABELA 14 - Valores de pH durante a maturação dos queijos.

Tratamentos (% de inulina) no queijo	pH do queijo						
	Dias de maturação						
	0	15	30	45	60	75	90
0	5,3	5,3	5,1	5,2	5,1	5,0	5,2
2	5,2	5,1	5,1	4,8	5,1	5,0	5,1
4	5,2	5,1	4,9	4,8	5,1	5,1	5,0

Não houve alteração significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos, assim como não houve diferenças entre os dias, entre os níveis de inulina e na interação dia X inulina, com relação à variável pH.

Segundo Farkye & Fox (1990), o aumento do pH durante a maturação do queijo é um fenômeno normal e resulta da formação de compostos nitrogenados alcalinos ou do catabolismo do ácido láctico.

O pH do queijo eleva-se muito pouco para as massas fechadas e cozidas, uma vez que as massas prensadas e cozidas têm um pH entre 5,0 e 5,3, pois elas conservam quantidades apreciáveis de cálcio e fosfato, tornando o meio mais temperado e com maior poder de neutralização (Surazinski & Petersen, 1973).

A variação do pH é discreta durante a maturação e eleva-se mais acentuadamente para as massas macias, podendo alcançar a alcalinidade passando por valores da neutralidade. Os queijos moles têm, em geral, um pH mais baixo, próximo ao ponto isoelétrico da caseína (Surazinski & Petersen, 1973).

Vários relatos têm sido feitos sobre o efeito do pH na viabilidade das bactérias probióticas, quando utilizadas em leites fermentados. Especial atenção foi atribuída para a pós-acidificação, sendo a viabilidade das bactérias probióticas afetada se o valor do pH estiver abaixo de 4,0 (Shah et al., 1990; Laroia et al., 1991).

4.4.1.3 Acidez titulável dos queijos expressos em ácido láctico

Os resultados de acidez dos queijos durante a maturação estão apresentados na Tabela 15.

TABELA 15 - Valores médios da acidez titulável dos queijos em ácido láctico.

Tratamentos (% inulina)	Acido láctico (g /100mL)						
	Maturação (dias)						
	0	15	30	45	60	75	90
0	0,04	0,04	0,06	0,06	0,07	0,07	0,07
2	0,04	0,05	0,07	0,08	0,07	0,08	0,08
4	0,04	0,06	0,08	0,09	0,07	0,08	0,09

Observou-se que houve ligeira variação na acidez do queijos ao longo da maturação, o que é explicável pela produção de ácido láctico. Segundo Casagrande & Wolsfschoon-Pombo (1988), uma produção excessiva de ácido láctico pode conduzir a um sabor muito ácido e descaracterizar o produto. A velocidade de formação e a quantidade de ácido láctico produzido influenciam a qualidade do queijo, regulando o pH e o equilíbrio iônico, sendo também muito importante na formação do sabor e inibição do crescimento microbiano (Wolfschoon-Pombo et al., 1984).

Ocorreram diferenças significativas entre os dias analisados e o teor de ácido láctico ($P < 0,05$) e também houve diferença significativas, entre os níveis de inulina ($P < 0,05$) nos tratamentos a (0%, 2%, 4%), porém, não houve interação entre estas variáveis ($P > 0,05$).

Com a finalidade de avaliar a função da maturação na produção de ácido láctico e, assim, estimar o seu comportamento ao longo dos dias, procedeu-se a uma regressão matemática. Os resultados, conforme Figura 16, demonstram a relação linear positiva entre a produção de ácido com a evolução do tempo, durante a maturação em qualquer concentração de inulina. A Figura 17 demonstra a relação linear positiva entre a produção de ácido láctico com a percentagem de inulina, durante a maturação, indicando que, a 4% e 2% de inulina, houve maior produção de acidez, seguidos de 0% de inulina.

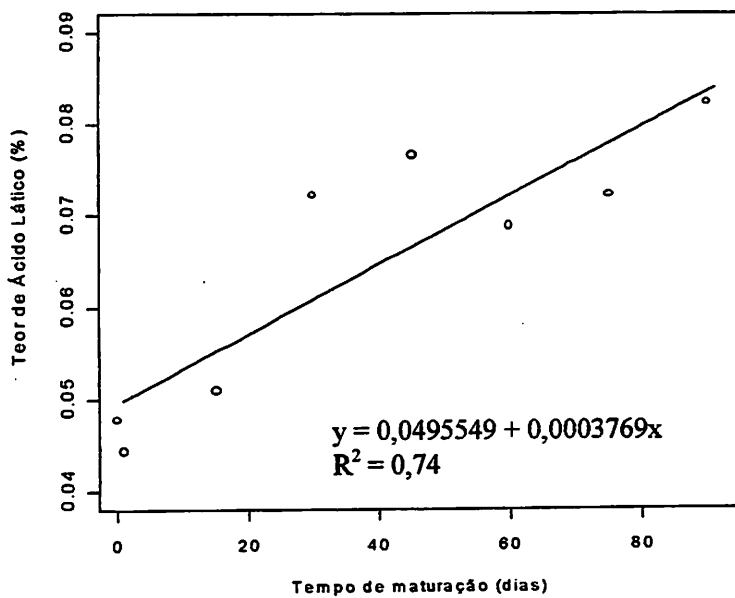


FIGURA 16 - Comportamento da concentração de ácido láctico dos queijos em função do tempo de armazenamento.

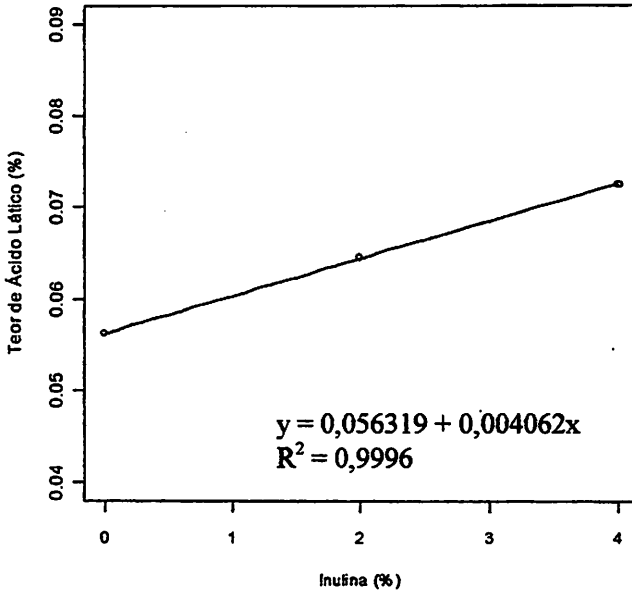



FIGURA 17 - Comportamento da concentração de ácido láctico dos queijos em função da concentração de inulina.

4.4.1.4. Teores dos cloretos dos queijos

Os resultados do teor médios, de cloretos dos queijos durante a maturação encontram-se apresentados na Tabela 16

TABELA 16 - Análise teor de cloretos durante a maturação dos queijos.

Tratamentos (% inulina)	Cloretos%						
	Maturação (dias)						
	0	15	30	45	60	75	90
0	1,1	1,3	1,2	1,2	1,2	1,2	1,3
2	1,1	1,3	1,2	1,4	1,3	1,3	1,2
4	1,3	1,3	1,3	1,4	1,3	1,3	1,3



Observou-se que não ocorreu variação significativa dentre os tratamentos ($P > 0,05$), mas houve entre os dias analisados com relação ao teor de cloretos ($p < 0,05$). Porém, houve diferenças entre os níveis de inulina na interação entre essas duas variáveis.

Segundo Furtado (1991), quanto maior o tempo de salga, maior a quantidade de sal absorvida pela massa e também maior é a perda de peso na salmoura, devido à perda da umidade. A absorção de sal não tem uma relação linear com o tempo, porque a maior parte do sal é absorvida nas primeiras horas de salga, chegando a uma saturação ao longo do tempo de salga.

A função do sal no queijo é conferir-lhe sabor característico, ao mesmo tempo em que realça ou mascara o sabor de outras substâncias presentes ao queijo.

A solução é hipertônica em relação ao queijo. Assim, há uma tendência de penetração do sal até que atinja um ponto de saturação ou equilíbrio (Furtado, 1991).

A Figura 18 demonstra a variação da porcentagem do cloreto entre os dias 15, 45 e 75.

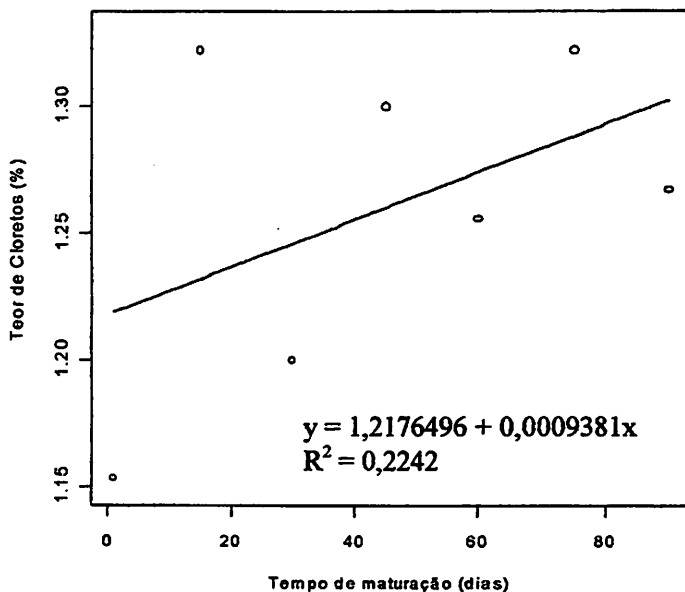


FIGURA 18 - Teor de cloretos dos queijos em função do tempo de armazenamento.

4.4.1.5 Teores de nitrogênio total dos queijos

Os valores de nitrogênio total dos queijos durante a maturação encontram-se na Tabela 17.

TABELA 17 - Valores de nitrogênio total durante a maturação dos queijos.

Tratamentos (% inulina)	Nitrogênio total				
	Maturação (dias)				
	0	15	30	45	6
0	3,8	4,0	4,0	4,2	4,4
2	3,8	3,9	4,1	3,9	4,2
4	3,8	3,9	4,1	4,1	4,3

A quantidade de nitrogênio total apresentou diferença significativa entre os dias analisados ($P < 0,01$), ou seja, aumentou ao longo da maturação. Este fato está de acordo com a perda de umidade, porém, não houve diferenças entre os níveis de inulina nem na interação. Segundo O'keeffe et al. (1976), dependendo do tipo de queijo, do tempo e das condições de armazenamento, a solubilização do nitrogênio pode chegar a até 30% do valor do nitrogênio total.

A caseína representa, aproximadamente, 80% do nitrogênio total no leite bovino utilizado para a elaboração de queijos, enquanto na massa do queijo representa quase a totalidade do nitrogênio total presente (Fox, 1988). O teor de proteína é resultado da multiplicação do valor do nitrogênio total e o fator 6,38, conforme estabelecem as normas do MAPA (Brasil, 2003). O teor de proteína no extrato seco do queijo está relacionado com o desenvolvimento do corpo e textura do queijo maturado (Kosikowski, 1988). Pode-se verificar que a inulina não afetou o teor de nitrogênio dos queijos durante o período de maturação, quando as médias diferiram a partir dos 15 dias, portanto, segundo os resultados do presente experimento.

Proteólise não é usualmente fator importante no sabor ou em defeitos em leites fermentados, mas pode afetar o desenvolvimento da textura e sabor dos queijos durante a maturação. Entretanto, a atividade das enzimas produzidas pelas culturas *starter* pode ser utilizada para produzir peptídeos e aminoácidos que podem ser utilizados pelas bactérias probióticas como fator de crescimento (Dave et al., 1997).

Para avaliar o comportamento do nitrogênio total ao longo dos dias, procedeu-se a uma regressão matemática e a representação gráfica desta função está apresentada na Figura 19.

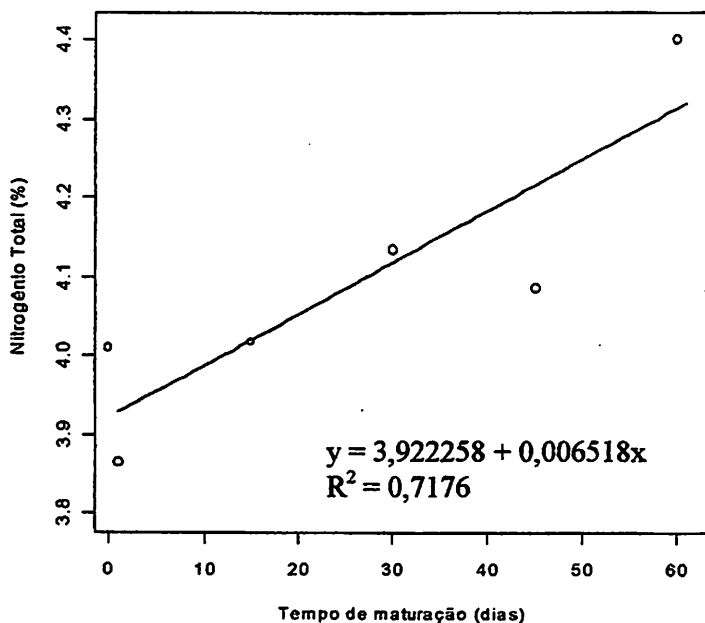


FIGURA 19 - Comportamento dos teores de nitrogênio total dos queijos em função do tempo de maturação.

O gráfico da Figura 19 mostra a relação linear positiva entre o tempo de maturação e os teores do nitrogênio total. Esta tendência, provavelmente, é explicada pela perda de umidade da massa dos queijos ao longo da maturação.

Observou-se que, aos 60 dias de maturação, houve maior variação no teor de nitrogênio total e, a seguir, aos 30 e 15 dias de maturação. Houve também variação.

4.4.2 Análise microbiológica dos queijos

O número de *Lactobacillus* no queijo permaneceu viável durante os 90 dias de estocagem para os três tratamentos utilizados, apresentando contagens superiores 10^5 UFC/mL.

As Figuras 20, 21 e 22 apresentam as placas com o crescimento de *Lactobacillus* nos queijos a 0%, 2% e 4% de inulina.



FIGURA 20 - Placas apresentando o crescimento de *Lactobacillus* nos queijos 0% de inulina.



FIGURA 21 - Placas apresentando o crescimento de *Lactobacillus* nos queijos 2% de inulina.

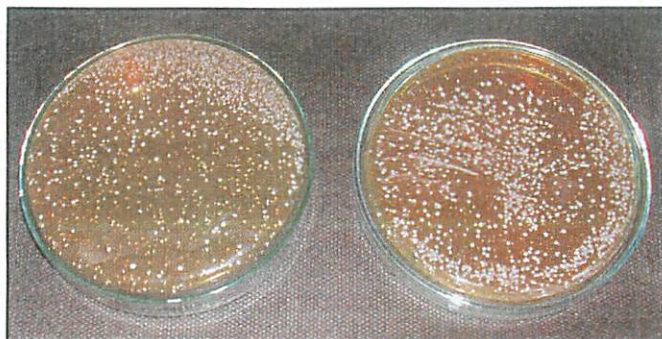


FIGURA 22 - Placas apresentando o crescimento de *Lactobacillus* nos queijos 4% de inulina.

A viabilidade destes microrganismos no leite e no queijo pode ser justificada pelo emprego de co-culturas (culturas mesofílicas) e pela pré-fermentação (o leite adicionado das culturas mesofílicas ficaram em repouso por 30 minutos) do leite antes de iniciar a coagulação. A adição de culturas acidificantes é realizada para que os produtos feitos com probióticos possam atingir uma acidez segura num período aceitável (Ferreira, 2003). O soro no corte e o soro no ponto oriundo do processamento do queijo também apresentaram contagens acima de 10^5 UFC/mL.

Segundo Saarela et al. (2000) e Saxelin et al. (1999), o emprego de co-culturas mesofílicas com diferentes linhagens aumenta a viabilidade das bactérias probióticas, permitindo uma fermentação em tempo aproximadamente duas vezes menor do que aquelas nas quais são utilizadas culturas puras, tornando-se adequado para a indústria.

Este fato demonstra que a seleção de co-culturas de suporte apropriadas para cada cultura probiótica é fundamental para a obtenção de produtos frescos fermentados com boa sobrevivência de culturas probióticas durante a vida de prateleira do produto. Em geral, as bactérias probióticas são exigentes em nutrientes, como os *Lactobacillus*, que apresentam necessidades nutricionais

complexas, como aminoácidos e fatores de crescimento, como pantotenato de cálcio, ácido fólico, niacina e riboflavina, que são essenciais (DuPlessis et al., 1996).

Gardiner et al. (2001) sugerem que a utilização de *Lactobacillus* como culturas probióticas em produtos de laticínios não tem efeito adverso e até certo ponto melhoram os atributos sensoriais de leites fermentados.

Neste experimento foi adicionada inulina em 0%, 2% e 4% como um possível fator de crescimento, mas os *Lactobacillus* apresentaram-se viáveis nos três níveis, durante todo o período de maturação.

Com a utilização de inulina, em leites fermentados com baixo teor de gordura, o crescimento dos *Lactobacillus* foi moderado, mas, quando foram adicionados 3% de oligofructose, o resultado da viabilidade foi alta (Orafi, 2003).

Diversos tipos de queijos foram testados como veículos para cepas probióticas, revelando-se apropriados para tal finalidade. Dentre os queijos testados para esse fim, destacam-se queijo fresco (Vinderola et al., 2000; Roy et al., 1997) cheddar (Gardiner et al., 1998; Dinakkar & Mistry, 1994), gouda (Gomes et al., 1998), cottage (Blanchette et al., 1996) e crescenza (Gobbetti et al., 1997 e Oliveira, 2002).

Assim como estes diferentes queijos, no presente experimento o queijo minas padrão também apresentou-se como um veículo apropriado para os microrganismos probióticos, pois eles se mantiveram viáveis por todo o período de maturação.

Stanton et al. (1998) salientaram que um alimento, como queijo cheddar, só poderá ser considerado um alimento funcional se a cultura probiótica adicionada durante o seu processamento resistir à sua maturação e sem prejudicar sua composição, textura e suas características sensoriais.

Neste experimento pôde-se concluir que este queijo pode ser considerado funcional, pois os *Lactobacillus* mantiveram-se viáveis nos três tratamentos e durante o período de maturação, e as características físico-químicas não foram significativamente afetadas.

4.4.4 Análise sensorial dos queijos

Para todas as análises de variáveis sensoriais, utilizou-se o esquema fatorial 3x4, com parcelas perdida, de um delineamento em blocos casualizados (DBC), com 18 blocos (provadores).

4.4.4.1 Aparência

Com relação à análise sensorial do atributo aparência, observou-se que há diferenças ($P < 0,05$) entre os dias analisados e entre os níveis de inulina, com relação à aparência. Porém, não há interação entre os dias X inulina.

Os queijos sem inulina obtiveram maior aceitação, ao contrário dos queijos a 4% de inulina, que não tiveram boa aceitação, em quaisquer dias de maturação, indicando um efeito sensorialmente desfavorável.

Em relação aos dias de maturação, os queijos aos 40 dias obtiveram melhor aceitação, seguidos dos queijos aos 0 (zeros) dias de maturação.

Os gráficos das Figuras 23 e 24 demonstram a variação linear e inversa da aparência, em função da adição da inulina.

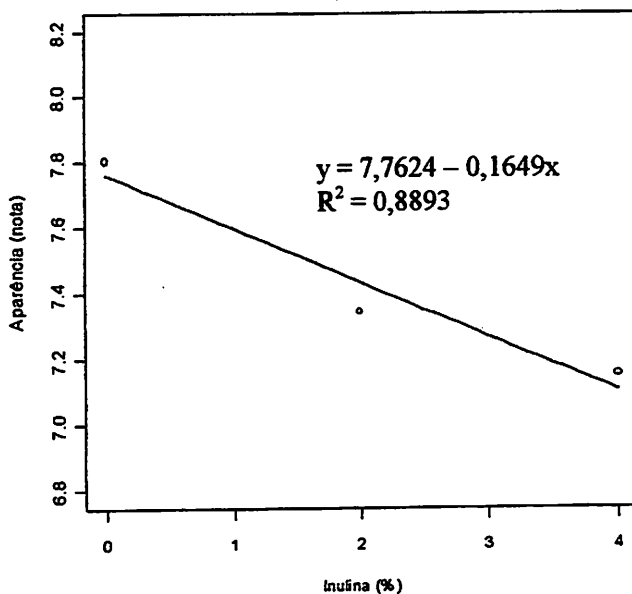


FIGURA 23 - Comportamento da aparência em função da porcentagem de inulina nos queijos.

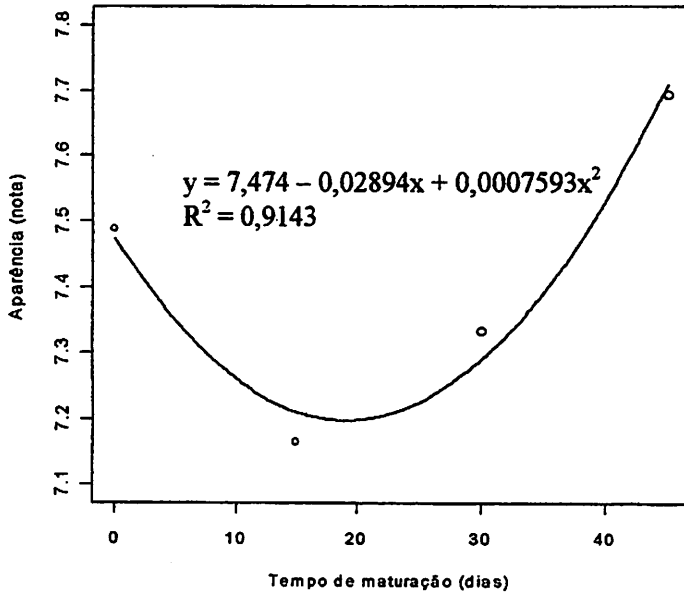


FIGURA 24 - Comportamento da aparência dos queijos em função do tempo de armazenamento.

4.4.4.2 Cor

Os resultados das análises sensoriais do atributo cor indicaram haver diferenças ($P < 0,05$) entre os dias analisados com relação à cor. Não houve diferenças com relação aos níveis de inulina nem na interação (dia X inulina).

Os queijos, aos 0 dias de maturação, obtiveram melhor aceitação, seguidos dos queijos a 40 dias de maturação, em relação ao atributo cor.

A Figura 25 demonstra o comportamento da cor dos queijos, em função dos dias de maturação.

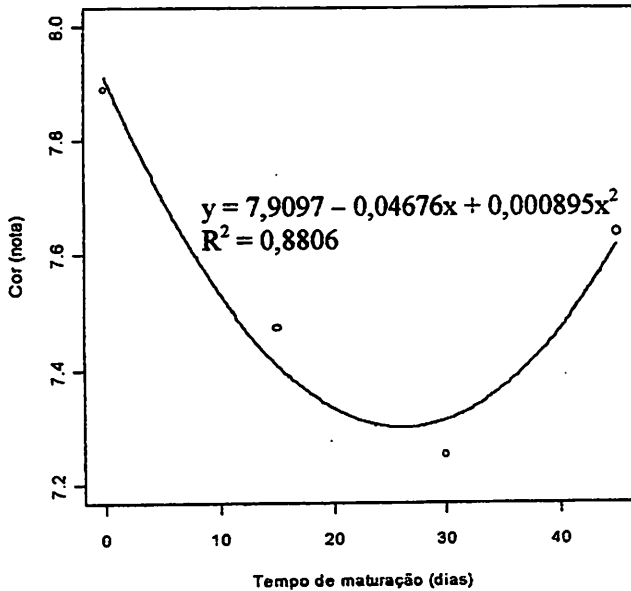


FIGURA 25 - Comportamento da cor em função do tempo em dias nos queijos.

4.4.43 Sabor

Houve diferenças ($P < 0,01$) entre os dias analisados com relação ao sabor, porém, não houve entre a interação (dia X inulina) nem com os níveis de inulina.

Os queijos frescos (dia 0) apresentaram melhor aceitação que os queijos aos 40 dias de maturação.

A Figura 26 demonstra o comportamento da avaliação sensorial do parâmetro sabor, em função do tempo.

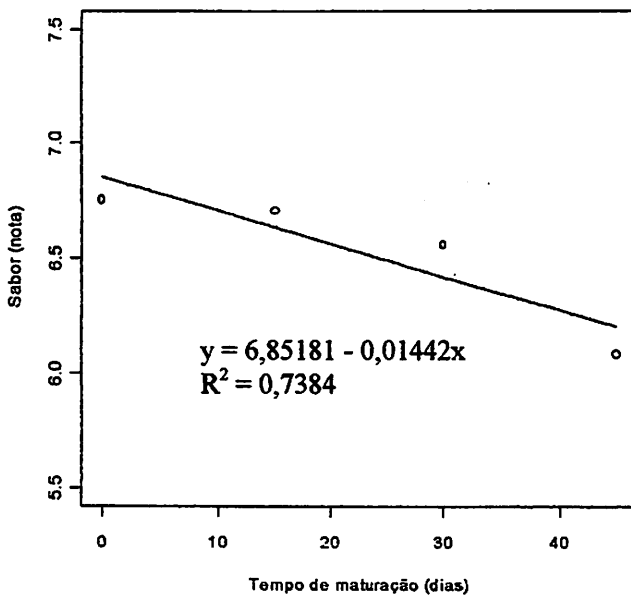


FIGURA 26 - Comportamento do sabor dos queijos em função do tempo.

4.4.4 Textura

Houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre as doses de inulina e na interação, quanto a textura, mas não entre os dias de maturação.

Fez-se o desdobramento dos tempos dentro de cada nível de inulina, em que foram constatadas diferenças significativas ($P < 0,05$) para as doses a 0% e 4% e ajustou-se uma curva de regressão. As Figuras 27 e 28 demonstram o comportamento da textura em função do queijo sem inulina e 4% de inulina em função do tempo.

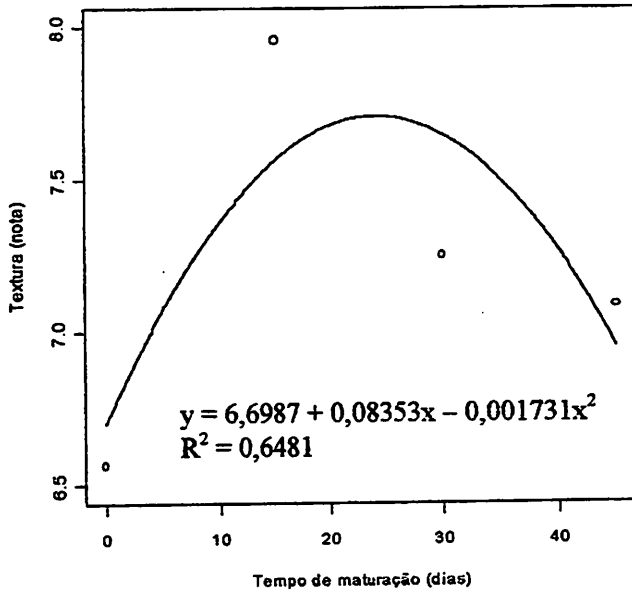


FIGURA 27 - Comportamento da textura em função do queijo sem adição de inulina.

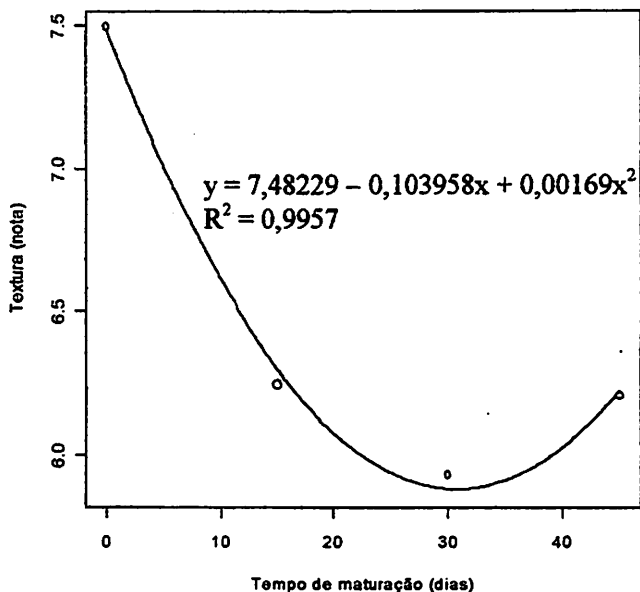


FIGURA 28 - Comportamento da textura dos queijos adicionados de 4% de inulina em função do tempo.

Os resultados apresentados na Figura 27 indicam que, a 0 dias, os queijos obtiveram melhor aceitação do que aos 40 dias de armazenamento.

Fez-se o desdobramento dos níveis de inulina dentro de cada tempo. Os resultados mostraram-se significativos ($P < 0,05$) nos tempos 2 e 3, os quais são apresentados nas Figuras 27 e 28.

A Figura 29 apresenta os resultados aos 15 dias de maturação, quando os queijos sem inulina obtiveram melhor aceitação do que os queijos adicionados de 4% de inulina.

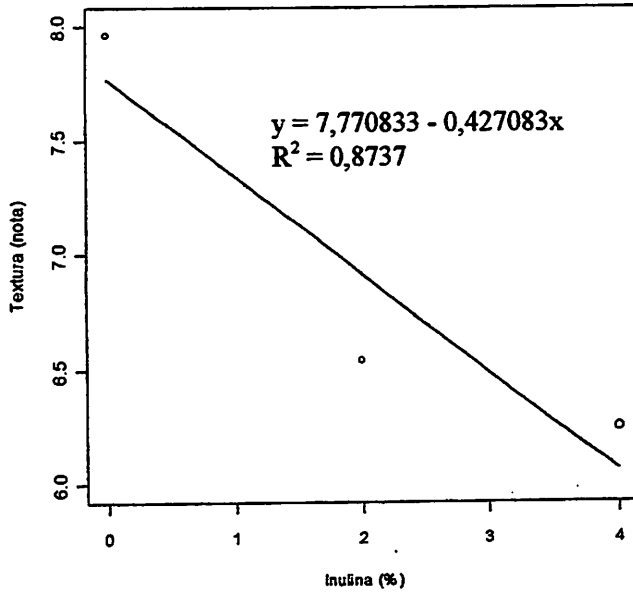


FIGURA 29 - Comportamento da textura dos queijos em função da dose de inulina, dentro do tempo de 15 dias.

Os resultados apresentados na Figura 30 demonstram que aos 30 dias de maturação, os queijos sem inulina obtiveram melhor aceitação e os queijos adicionados de 4% de inulina tiveram pior aceitação.

Gardiner et al. (1998) analisaram cuidadosamente as características de aroma, sabor, corpo e textura de um queijo cheddar probiótico e não encontraram diferenças claras entre os produtos analisados.

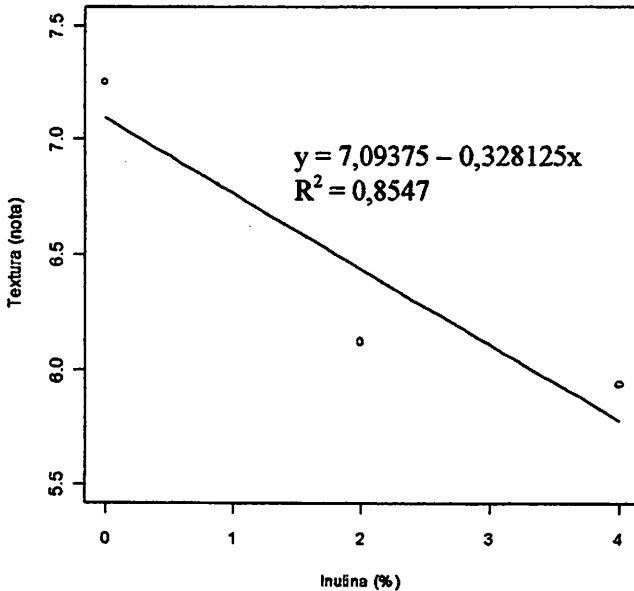


FIGURA 30 - Comportamento da textura dos queijos em função das doses de inulina, dentro do tempo de 30 dias.

4.4.4.5 Análise generalizada de procrustes

As notas mais altas para os atributos textura, sabor e aparência foram dadas para os queijos que apresentavam todas as doses de inulina no tempo zero e a dose 0% de inulina em todos os tempos, conforme Figuras 31 e 32.

As maiores notas para o atributo cor foram dadas aos queijos de todo o tempo zero e 15 dias e a dose de 4% de inulina, aos 45 dias.

Para 2% e 4% aos 30 dias e 2% aos 45 dias, ocorreram as piores notas para textura, sabor e aparência.

Para a testemunha (0% de inulina), aos 30 e 45 dias, tiveram as piores notas para cor, conforme Figuras 28 e 29.

Embora os grupos formados não sigam um padrão, houve tendência de

pontuar melhor (preferir) queijos mais novos (de 0 a 15 dias), independente da dose de inulina aplicada.

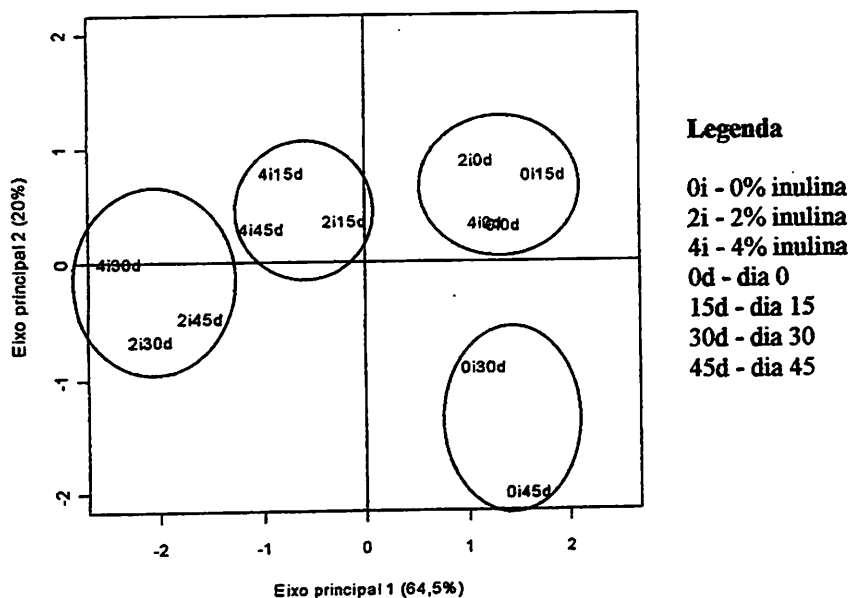


FIGURA 31 - Variação do consenso dos provadores em relação à comparação das três doses de inulina, em função do tempo de maturação (dias).

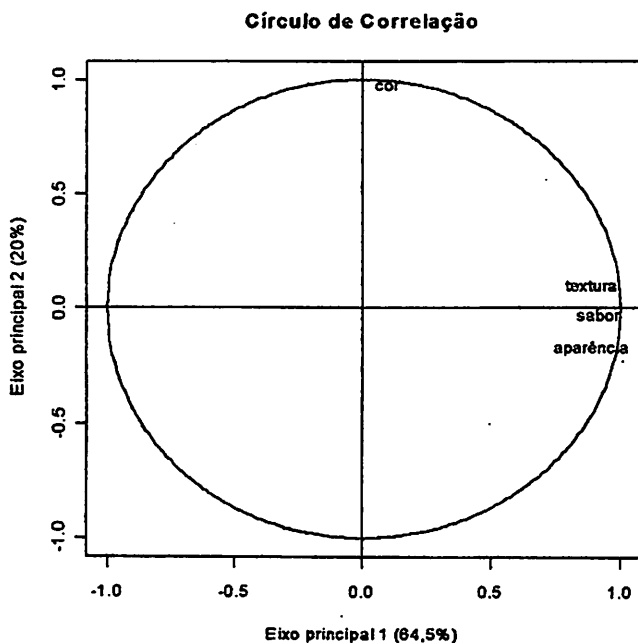


FIGURA 32 - Variação do círculo de correlação dos provadores, em relação à comparação de três doses de inulina X quatro tempos de maturação.

5 CONCLUSÕES

De acordo com os dados obtidos, pôde-se concluir que:

- com relação aos aspectos físico-químicos, o soro no corte, o soro no ponto e a salmoura não apresentaram diferenças entre os tratamentos quando submetidos à adição de inulina;
- os teores de gordura e nitrogênio total não apresentaram alterações significativas quando submetidos à adição de inulina e, quanto ao teor de nitrogênio total, ocorreu variação normal e proporcional à perda de umidade do queijo durante o período de maturação;
- quanto aos valores de pH, a elevação verificada foi proporcional à sua acidificação normal, durante o período de maturação, não sendo afetados pelos tratamentos;
- os teores de ácido láctico ao longo do período de maturação apresentaram ligeira variação, justificado pela acidificação normal do queijo. Mas, quanto aos tratamentos a 2% e 4% de inulina, os teores de ácido láctico foram maiores, indicando uma interferência da inulina na produção de ácido láctico nos queijos;
- os teores de cloretos não foram afetados pelos tratamentos com inulina, mas apresentaram diferenças durante os dias de maturação. Isto se justifica pelo fato da maior parte do sal ser absorvida nas primeiras horas de salga, aumentando proporcionalmente ao tempo de permanência na salmoura, ocorrendo uma tendência de penetração do sal até que atinja um ponto de saturação ou equilíbrio;
- sob aspectos microbiológicos, observou-se que a adição das bactérias probióticas (*Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus. casei*) manteve um crescimento constante durante todo o período de maturação, não

sofrendo influência da adição de inulina nem do tempo de armazenamento;

- quanto às análises sensoriais, foi observado que a presença de prebióticos (inulina) alterou o sabor, textura, cor e aparência;
- os atributos aparência, sabor, textura, cor e aparência, tiveram pior avaliação quando os queijos foram adicionados de 4% de inulina;
- embora os grupos formados não sigam um padrão, houve a tendência de pontuar melhor (preferir) queijos mais novos (de 0 a 15 dias), independente da dose de inulina aplicada;
- concluiu-se que o simples fato de adicionar um prebiótico e um probiótico não necessita de alteração na tecnologia tradicionalmente empregada na fabricação do queijo minas-padrão;
- para a indústria de laticínios, a adição destes ingredientes é viável, pois oferecerá ao consumidor um novo produto com propriedades funcionais;
- quanto à inulina adicionada em 2% e 4% no queijo minas padrão, outros estudos são necessários para uma melhor conclusão quanto à sua funcionalidade.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALM, L. The therapeutic effects of various cultures - an overview. In: ROBINSON, R. K. (Ed.). *Therapeutic properties of fermented milks*. London: Elsevier Applied Science, 1991. p. 45-64.

ANDALDUÁ-MORALES, M. *La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica*. Zaragoza: Acribia, 1994. 98 p.

ANDERSON, H. B.; ELLEGARD, L. H.; BOSOEUS, I. G. Nondigestibility characteristics of inulin and oligofructose in humans. *Journal of Nutrition*, Bethesda, v. 129, n. 7, p. 1428S-1430S, July/Sept. 1999.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official Methods Of Analysis*. 15. ed. Washington, 1995. 2v.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDUSTRIAS DE QUEIJOS . *Produção Brasileira de Produtos Lácteos em Estabelecimentos sob Inspeção Federal*. São Paulo, 2002. não paginado.

BACON, J. S. D.; EDELMAN, J. The carbohydrates the Jerusalem artichoke and other compositae. *The Biochemical Journal*, Essex, v. 48, p. 114-126, 1951.

BANKS, J. M. *Milk composition in relation to cheese yield and quality*. 1983. Thesis (PhD) - The University of Glasgow, Glasgow.

BANKS, J. M. Elimination of the development of bitter flavour in cheddar cheese made from milk containing heat-denatured whey protein. *Journal of the Society of Dairy Technology*, Huntindon Cambsm v. 41, n. 2, p. 37-41, May 1988.

BLANCHETTE, L.; ROY, D.; BELANGER, G.; GAUTHIER, G. F. Production of cottage cheese using dressing fermented by Bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 79, n. 1, p. 8-15, Jan. 1996.

BODYFELT, F. W.; TOBIAS, J.; TROUT, G. M. *The sensory evaluation of dairy products*. New York: Van Nostrand Reinhold, 1988. 598 p.

BORNET, F. R. Undigestible sugars in food products, Paris- France. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 59, n. 3, p. 763S-769S, 1994. Supplement.

BOURLIOUX, R.; POCHART, P. Nutritional and health properties of yogurt. **World Review of Nutrition and Dietetics**, Basel, v. 56, p. 217-258, 1988.

BOZANIC, R.; ROGELY, I.; TRATNIK, L. J. Fermented acidophilus goat's milk supplemented with inulin: comparison with cow's milk. **Milchwissenschaft**, Munich, v. 56, n.11, p. 619-622, Nov. 2001.

BRANDÃO, S. C. C. Novas gerações de produtos lácteos funcionais. **Revista Indústria de Laticínios**, São Paulo, v.6, n. 6, p. 64-66, jan./fev. 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e da Reforma Agrária, Portaria nº 146,07 de março de 1996. **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil**, Brasília, 1996. p. 3977-3986.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal – DIPOA; Divisão de Normas Técnicas: **regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal** aprovado pelo Decreto nº 30. 691, de 29-03-52, alterado pelos Decretos nºs 1. 255 de 25-06-62, 1. 236 de 02-09-94, nº 1. 812 de 08-02-96 e nº 2. 244 de 04-06-97), 1997.

BRASIL. Resolução Nº18, 30 de abril de 1999, **Regulamento técnico de procedimentos para registro de alimentos e ou novos ingredientes**. **Diário Oficial da União**, Brasília, 3 de dez 1999 seção 1, p. 11, 1999c.

BRASIL. ANVISA/ Ministério Da Saúde. Resolução num. 2, de 7 de janeiro de 2002. **Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde**. Publicada no **Diário Oficial da União**, Brasília em 9 de janeiro, DF, p. 191 – 192, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Instrução Normativa SDA Nº 22 de 22/04/03, **Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de produtos de leite e produtos lácteos, 2003**

CARPITA, N. C.; KANABUS, J.; HOUSLEY, T. L. Linkage structure of fructans and fructans oligomers from triticum aestivum and festuca arundinacea leaves. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 34, n. 2, p. 162-168, Mar. 1989.

CASTRO, I. A. Desenvolvimento de alimentos funcionais. In: CONGRESSO SUL BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 2003, Curitiba. Anais... Curitiba, 2003. 84 p.

CASAGRANDE, H. R.; WOLFSCHOON-POMBO, A. F. Fermentação da Lactose no queijo Minas frescal. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v. 43, n. 258, p. 38, jul./ago. 1988.

COLLINS, J. K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G. O. Selection of probiotic strains for human Applications. *International Dairy Journal*, Oxford, v. 8, n. 5/6, p. 487-490, May/June 1998.

CRITENDEN, R. G.; PAYNE, R. I. *Microbial diversity in gut ecosystems*. Aberdeen, UK, 1996. p. 28-33.

DAIGLE, A.; ROY, D.; BÉLANGER, G.; VUILLERMARD, J. C. Production of probiotic cheese (cheddar-like cheese) using enriched cream fermented by *Bifidobacterium infantis*. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 82, n. 6, p. 1081-1091, June 1999.

DALY, R.; DAVIS, R. The Biotechnology of lactic acid bacteria with emphasis on applications in food safety and Human health. *Agricultural and Food Science in Finland*, Jokioinen, v. 7, n. 2, p. 251-265, 1998.

DAMÁSIO, M. H.; COSTELL, E. Análisis sensorial descriptivo: generación de descriptores y selección de catadores. *Revista Agroquímica de Tecnología de Alimentos*, Valencia, v. 31, n. 2, p. 165-178, jun. 1991.

DAVE, R. I.; SHAH, N. P. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. *International Dairy Journal*, Oxford, v. 7, p. 31-41, 1997.

DELLA MODESTA, R. C. *Manual de análise sensorial de alimentos e bebidas*. Rio de Janeiro: EMBRAPA-CTTA, 1994. v. 2 e 3.

DE SIMEONE, C.; BIANCHI SALVADORI, B.; JIRILLO, E.; BALDINISSI, L.; BITONTI, F.; VESELY, R. Health properties of yogurt. In: CHANDAN, R. C. (Ed.). *Yogurt: nutritional and health properties*. National Yogurt Association Mclean, VA, 1989. p. 201-213.

DICKS, L. M. T.; DUPLESSIS, E. M.; DELLAGIO, F.; LAUER, E. Reclassification of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 15820 as *Lactobacillus zeae* nom rev. designation of ATCC334 as neotype of *Lactobacillus casei subsp casei*, and rejection of the name *Lactobacillus paracasei*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 46, p. 337-340, 1996.

DINAKAR, P.; MISTRY, V. V. Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in cheddar chesse. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 77, n. 10, p. 2854-2864, Oct. 1994.

DUPLESSIS, E. M.; DICKS, L. M. T.; VESCOVO, M.; TORRIANI, S.; DELLAGLIO, F. *Lactobacillus acidophilus* and related species: a review, **Annali di Microbiologia ed Enzimologia**, Milan, v. 46, p. 319-340, 1996.

EDELMAN, J. The formation of oligosaccharides by enzymic transglycosylation. **Advances in Enzimology**, New York, v. 17, p. 189-232, 1956.

EDELMAN, J.; JEFFORD, T. G. The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *heliantus tuberosus* L Irvine, EUA. **New Physiologist**, Copenhagen, v. 116, p. 197-208, 1968.

FARKYE, N. Y.; FOX, P. F. Objective indices of cheese ripening. **Trends in Food Science and Technology**, oxford, v. 1, p. 37-40, 1990.

FERNANDES, C. F.; SHAHANI, K. M.; AMER, M. A. Control of diarrhea by lactobacilli, **Journal Applied Nutrition**, La Habra, v. 40, n. 1, p. 32-43, 1988.

FERNANDES, C. F.; SHAHANI, L. M.; AMER, M. A. Therapeutic role of dietary lactobacilli and lactobacilli fermented dairy products. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v. 46, n. 3, p. 343-356, Sept. 1987.

FERREIRA, C. L. L. F. **Produtos lácteos fermentados: aspectos bioquímicos e tecnológicos**, Viçosa – MG: UFV. Imprensa Universitária, 1987. p. 96.

FERREIRA, C. L. L. F. **Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção**. Viçosa, MG, 2003. 206 p.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio de sisvar para window- versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais....** São Carlos: UFCAR, 2000. p. 255-258.

FERREIRA, E. B. Análise generalizada de Procrustes. Via R: uma aplicação em laticínios, 2004. 115 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

FISHBEIN, L.; KAPLAN, M.; GOUCH, M. Fructooligosaccharides: a review. Veterinary Human Toxicology, Manhattan, v. 30, n. 2, p. 104-107, Apr. 1998.

FOX, P. F. In chees: chemistry, physics and microbiology. general aspects. London: Elsevier, 1987. v. 1.

FOX, P. F. Rennets and their action in cheese manufacture and ripening. Biotechnonology and Applied Biochemistry, London, v. 10, n. 6, p. 552-535, Dec. 1988.

FOX, P. F.; SINGH, T. K.; MCSWEENEY, P. L. H. Biogenesis of flavour compounds in cheese in chemistry of structure/function-relationships in cheese MALIN, E. L.; TUNICK, M. H. (Ed.). New York: Plenum Press, 1995. p. 59-98.

FURTADO, M. M.; SOUZA, H. M.; MUNCK, A.V. A fabricação do queijo minas frescal sem emprego de culturas lácticas. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, v. 35, n. 211, p. 15-21, 1980.

FULLER, R. History and development of probiotics. New York: Marcell Dekker, 1994. p. 1-8.

FURTADO; M. M. A arte e a ciência do queijo. 2. ed. São Paulo: Globo, 1991. 297 p.

FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J. P. de M. Tecnologia de queijos: manual técnico para a produção industrial de queijos. São Paulo: Dipemar, 1994. 118 p.

FURTADO, M. M.; WOLFSCHOON-POMBO, A. F.; VENTURA, R. F. Caracterização do queijo Minas meia cura elaborado na região Sul de Mina, Encontro e concurso de queijos da indústria de laticínios e cooperativas do Sul de Minas³. Juiz de Fora: Emater - MG, 1984. (Material técnico).

GARDINER, G.; ROSS, P.; COLLINS, J. K. FITZGERALD, G. STANTON, C. Development of a probiotic cheddar cheese containing human-derived *Lactobacillus paracasei* strains. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 64, n. 6, p. 2192-2199, June 1998.

- GARDINER, G.; STANTON, C.; LYNCH, P. B.; COLLINS, J. K., FITZGERALD, G. ROSS, R. P. Evaluation of cheddar cheese as a food carrier for delivery of a probiotic strain to the gastrointestinal tract. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, n. 7, p. 1379-1387, July 1999.
- GERMAM, B.; SCHIFFRIN, E. J.; RENIERO, R.; MOLLET, B.; PFEIFER, A.; NEESER, J. R. The development of functional food: lesson from the gut. **Trends Biotechnology**, London, v. 17, n. 12, p. 492-499, Dec. 1999.
- GHODDUSI, H. B.; ROBINSON, R. K. The test of time. **Dairy Industries International**, London, v. 61, n. 71, p. 25-28, July 1996
- GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 124, n. 6, p. 1401-1412, June 1995.
- GIBSON, G. R.; WILLIAMS, C. M. Gut fermentation and health advantages: myth or reality ? **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 81, n. 2, p. 83-84, Feb. 1999.
- GIBSON, G. R.; WILLIS, C. L.; VAN LOO, J. Nondigestible oligosaccharides and bifidobacteria - implications for health. **International Sugar Journal**, West Glamorgan, v. 96, n. 1150, p. 381- 387, Oct. 1994.
- GILLILAND, S. E. Beneficial interrelationship between certain microorganisms for use as dietary adjuncts. **Journal of Protection**, Des Moines, v. 42, n. 2, p. 164-167, Feb. 1979.
- GOBBETTI, M.; CORSETTI, A.; SMACCHI, E.; ZOCCHETTI, A.; DE ANGELIS, M. Production of crescenza cheese by incorporation of bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 1, p. 37-47, Jan. 1997.
- GOLDIN, B. R. Health benefits of probiotics. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 80, p. 203-207, 1998. Supplement 2.
- GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. Development of probiotic cheese manufactured from goat milk: response surface analysis via technological manipulation. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 81, n. 6, p. 1492-1507, 1998.

- GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium ssp* and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics, **Trends in Food Science and Technology**, London, v. 10, n. 4/5, p. 139-157, Apr./May 1999.
- GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X.; KLAVER, F. A. M. ; GRANDE, H. G. Incorporation and survival of *Bifidobacterium spp*. Strain bo and *Lactobacillus acidophilus* strain Ki in a cheese product. **Netherland Milk and Dairy Journal**, Washington, v. 49, n. 2/3, p. 71-95, 1995.
- GORBACH, S. L.; CHANG, T.; COLDIN, B. Successful treatment relapsing *clostridium difficile* colite *lactobacillus GG*. **Lancet**, London, v. 2, n. 8572, p. 15-19, Dec. 1987
- GOWER, J. C. Generalized procrustes analysis. **Psychometrika**, Williamsburg, v. 40, n. 1, p. 33-51, 1975.
- HAENEL, H.; BENDING, J.; Intestinal flora in health and disease. **Progress in Food Nutrition Science**, Oxford, v. 1, p. 21-64, 1975.
- HARDY, G. Nutraceuticals and functional foods: introduction and meaning. **Nutrition**, New York, v. 16, n. 7/8, p. 688-689, July/Aug. 2000.
- HASLER, C. M. Functional foods: their role in disease prevention and health promotion. **Food Technology**, Chicago, v. 52, n. 11, p. 63-70, Nov. 1998.
- HARTEMINK, R.; VANLAERE, K. M. J.; ROMBOUTS, F. M. Growth of enterobacteria on fructooligosaccharides, Wageningnen, Holanda. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 83, n. 3, p. 367-374, Sept. 1997.
- HECKMAN, S.; MCMAHON, D. Urea in dry-rolled corn diets: finishing steer performance, nutrient digestion, and microbial protein production. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 75, n. 5, p. 1415-1422, May 1992.
- HIDAKA, H.; EDA, T.; TAKIZAKA, T.; TOKUNAGA, T.; TASHIRO, Y. Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. **Bifidobacteria Microflora**, v. 5, p. 37-50, 1986.
- HOUSLEY, T. L.; KANABUS, J.; CARPITA, N. C. Fructan synthesis in wheat leaf blades. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 134, p. 192-195, 1989.

ISHIBASHI, N.; SHIMAMURA, S. Bifidobacteria: research and development in Japan. *Food Technology*, Chicago, v. 47, n. 6, p. 126-135, June 1993.

ISOLAURI, E.; JOENSUN, J.; SUOMALAINEN, H.; LUOMALA, M.; VESIKARI, T. Improved immunogenicity of oral DX RRV reassortant rotavirus vaccine by *Lactobacillus casei* GG. *Vaccine*, Oxford, v. 13, n. 3, p. 310-312, Feb. 1995.

KAILASAPATHY, L.; RYBKA, S. *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp*: their therapeutic potential and survival in yogurt. *Australian Journal of Dairy Technology*, Melbourne, v. 52, n. 1, p. 28-38, Apr. 1997.

KANDLER, O.; WEIS, N. Genus *Lactobacillus*. In: SNEATH, P. H. A; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. (Ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Williams e Wilkins, 1986, v. 2, p. 1209-1234.

KATO, I.; KOBAYASHI, S.; YOKOKURA, T.; MUTAI, M. Antitumour activity of *Lactobacillus casei* in mice. *Gann*, Tokyo, v. 72, n. 4, p. 517-523, 1981.

KOSIKOWSKI, F. V. Enzyme behavior and utilization in dairy technology. *Journal Dairy Science*, Champaign, v. 71, n. 3, p. 557-573, Mar. 1988.

KURMANN, J. A. Starters for fermented milks. In: *Fermented milks science and technology*, Brussels: IDF, 1988. p. 41-55. (IDF Bulletin, 227).

LAROLA, S.; MARTIN, J. H. Effect of pH on survival of *Bifidobacterium* in frozen fermented dairy desserts. *Cultured Dairy Products Journal*, Washington, v. 26, p. 13-21, 1991.

LEE, Y. K.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S.; GORBACH, S. L. *Handbook of probiotics*. New York: Wiley, 1999. 211 p.

LEE, Y. K.; SALMINEN, S. The coming age of probiotics, *Trends in food Science and Technology*, Oxford, v. 6, n. 7, p. 241-244, July 1995.

LILLY, D. M.; STILLWELL, R. H. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, Washington, v. 147, n. 3659, p. 747-748, 1965.

- MAASSEN, C. B.; LAMAN, J. D.; DENBAR, -GLASHOUVER, M. J.; TIETEN, F. J.; VAN HOLTEN-NEELEN, J. C., HOOGTEIFLING, L.; ANTONISSEN, C.; LEER, R. J.; PUWELS, P. H.; BOERSMA, W.J.; SHOW, D. M.; Instruments for oral disease *Lactobacillus casei* expressing tetanus toxin fragment C for vaccination or myelin proteins for oral tolerance induction in multiple sclerosis. *Vaccine*, Oxford, v. 17, p. 2117-2128, 1999.
- MACÍAS, M. E. N.; APELLA, M. C.; ROMERO, N. C.; GONZALEZ, S. N.; OLIVER, G., Inhibition of *shigella sonnei* by *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*, *Journal Applied Bacteriology*, Oxford, v. 73, n. 5, p. 407-411, Nov. 1992.
- MCBREARTY, S.; ROOS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; COLLINS, J. K.; WALLACE, J. M.; STANTON, C. Influence of two commercially available bifidobacteria cultures on cheddar cheese quality. *International Dairy Journal*, Oxford, v. 11, n. 8, p. 599-610, 2001
- MADLEY, R. Probiotics, prebiotics & simbiotics: harnessing enormous potential. *Nutrition World*, v. 4, n. 9, p. 50-76, 2001
- MAGALHÃES, F. A. R. Métodos descritivos e avaliação sensorial de doce de leite pastoso. 1996. 83 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- MARSHALL, R. T. Standart methods for the examination of dairy products. 16. ed. Washington: American PublicHealth Association, 1992. 416 p.
- MARTEAU, P. Potential therapeutic applications of probiotics in humans. In: *Gut flora and health- past, present and future: Symposium abstracts*, U. K. 1996.
- METCHNIKOFF, E. *The prolongation of life*. New York: G. P. Putnam's Sons, 1908.
- MITSUOKA, T. Ecology of bifidobacteria. *American Journal Clinical Nutrition*, Bethesda, v. 30, n. 11, p. 1799-1710, Nov. 1977.
- MITSUOKA, T. The human gastrointestinal tract. In: WOOD, B. J. B. (Ed.). *The lactic acid bacteria: the lactic acid bacteria in health and disease*. London: Elsevier, 1992. p. 69-114.

MITSUOKA, T. Microbes in the intestine – our life longer partners. Tokio: Yakult Honsha, 1989. 104 p.

MITSUOKA, T. Recent trends in research on intestinal flora, bifidobacteria Microflora 1, p. 3-24, 1982.

MOLDER, H. W. Bifidogenic factors-sources metabolism and applications. International Dairy Journal, Oxford, v. 4, p. 383-407, 1994.

MOLIS, C., FLOURI, B.; OUARNE, F.; et al, Digestion, excretion and energy value of fructooligosaccharides in healthy humans, Nantes- França. American Journal of Clinical Nutrition, Bethesda, v. 64, n. 3, p. 324-328, Mar. 1996.

MOSLOWISTZ, H. R. Applied sensory analysis of foods. Boca Raton: CRC, 1988. v. 1, 259 p.

NINESS, K. R. Inulin and Oligofructose: What are they? Journal of Nutrition, Bethesda, v. 129, n. 7S, p. 1402S-1406S, July 1999.

NITSCHKE, M.; UMBELINO, C. D. Frutooligossacarídeos: novos ingredientes funcionais. Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de alimentos, Campinas, v. 6, n. 1, p. 27-34, jan./jun. 2002.

O'BRIEN, J.; CRITTENDEN, R.; OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S. Safety evaluation of probiotics. Trends Food Science Technology, Amsterdam, v. 10, p. 418-424, 1999.

OKU, T.; TOKUNAGA, T.; HOSOYA, N. Nondigestibility of a new sweetener “Neosugar” in the rat. The Journal of Nutrition, Bethesda, v. 114, n. 9, p. 1574-1581, Sept. 1984.

O'KEEFFE, R. B.; FOX, P. F., DALY, C. Contribution of rennet and start proteases to proteolyses in cheddar cheese. Journal of Dairy Research, Cambridge, v. 43, n. 1, p. 97-107, 1976.

OLIVEIRA, N. M.; SIVIER, K.; ALEGRO, A. H, J. SAAD, I, M. S. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. Brazilian Journal of Pharmaceutical Science, v. 38, n. 1, jan./mar. 2002.

ORAFI ACTIVE FOOD INGREDIENTS. Com. Raftiline. Tienen, Belgium, 2004. Disponível em: <<http://www.orafit.com>>. Acesso em: jan. 2004.

O'SULLIVAN, M. G. Metabolism of bifidogenic factors by gut flora an overview. **Bulletin of the IDF 313: Oligosaccharides and Probiotic Bacteria**, Brussels, n. 313, p. 23- 30, 1996.

O'SULLIVAN, M. G. Probiotic bacteria: Myth or reality? **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v. 3, p. 309-314, 1992.

PERDIGÓN, G.; MACIÁS, M. E. N.; ALVAREZ, S.; MEDICIM.; OLIVIER, G.; HOLGADO, A. A. P. D. Effect of a mixture of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* administered orally on the immune system in mice. **Journal Food Protection**, Des Moines, v. 49, n. 12, p. 986-989, Dec. 1986.

PINHEIRO, A. J. R. **Pasteurização: apostila de leite e derivados**. Viçosa: UFV, 1985.

PLAYNE, M. J.; CRITTENDEN, R. G. Commercially available oligosaccharides. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Brussels, n. 313, p. 10-22, 1996.

PREBIÓTICOS: in nutrition health and well-being. Vevey, Suíça: Nestlé Nutrition Communication, 1999.

PSZCZOLA, D. E. Nutraceuticals that take the form of candy and snacks. **Food Technology**, Chicago, v. 53, n. 10, p. 74-84, Oct. 1999.

RASIC, J. L.; KURMAM, J. A. **Bifidobacteria and their role**. Basel: Birkhauser Verlag, 1983. 6 p.

RAVULA, R. R.; SHAH, P. N.; Selective enumeration of *Lactobacillus casei* from iogurts and fermented milk drinks. **Biochenology Techniques**, Victoria, v. 12, n. 11, p. 819-822, 1998

ROBERFROID, M. **Alimentos funcionais: caso dos pro e prebióticos**. In: **Probióticos, outros fatores nutricionais e a microflora intestinal**. Vevey, Suíça: Nestlé Nutrition Services, Nestec 1998. p. 25-28.

ROBERFROID, M.; GIBSON, G. R.; DELZENNE, N. The biochemistry of oligofructose a nondigestible fiber: an approach to calculate its caloric value. **Nutrition Reviews**, Lawrence, v. 51, n. 5, p. 137-146, May 1993.

ROY, D.; MAINVILLE, I.; MONDOU, F. Selective enumeration and survival of bifidobacteria in fresh cheese. *International Dairy Journal*, Oxford, v. 7, n. 12, p. 785-793, Dec. 1997.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDIN, R.; MATTO, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technology properties. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, v. 84, n. 3, p. 197-215, 2000.

SALMINEN, S.; OUWEHAND, A. C.; ISOLAURI, E.; Clinical Applications of probiotics bacteria. *International Dairy Journal*, Oxford, v. 8, n. 5/6, p. 563-572, May/June 1998.

SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; MORELLI, L.; MARTEAU, P.; BRASSART, D.; DE VOS, W. M.; FONDÉN, R.; SAXELIN, M.; COLLINS, K.; MOGENSEN, G.; BIRKELAND, S. E.; MATTILA-SANDHOLM, T. Demonstration of safety of probiotics: a review. *International Food Microbiology*, Amsterdam, v. 44, n. 1/2, p. 93-106, Oct. 1998.

SANDERS, M. E. Lactic acid bacteria as promoters of human health. In: *Functional foods: designer foods, pharmafoods and nutraceuticals*. Goldberg: Chapman & Hall, 1994. p. 294-332.

SANDERS, M. E. Overview of functional foods: emphasis on protiotic bacteria. *International Dairy Journal*, Oxford, v. 9, n. 5/6, p. 341-347, May/June 1998.

SANDERS, M. E.; WALKER, D. C.; WALKER, K. M.; AOYAMA, K. and KLAENHAMMER, T. R. Performance of commercial cultures in fluid milk applications. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 79, n. 6, p. 943-955, June 1996.

SAXELIN, M.; GRENOV, B.; SVENSON, V.; FONDÉN, R.; RENIERO, R.; MATTILA-SANDHOLM, T. The techonology of probiotics. *Trends Food Science and Techonology*, Amesterdam, v. 10, p. 387-392, 1999.

SCHNEEMAN, B. O. Fiber, inulin and oligofructose: similarities and differences. *Journal of Nutrition*, Bethesda, v. 129, n. 7S, p. 1424S-1427S, July 1999.

SIQUEIRA, J. F. M. **Effects da variação do teor de gordura do leite na composição do queijo minas padronizado.** 1984. 43 p. Dissertação, (Mestrado em Ciência e Tecnologia de alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

SLEIDLER, L.; ROBINSON, K.; CHAMBERLAIN, L.; SCHOFIELD, K. M.; REMAUT, E.; LE PAGE, R. W.; WELLS, J. M.; Mucosal delivery of murine interleukin -2 (IL-2) and IL-6, by recombinant strains of *Lactococcus lactis* coexpressing antigen and cytokine. **Infection and Immunity**, Washinton, v. 66, n. 7, p. 3183-3189, July 1998.

SOUSA, J. S. Probioticos: O estado das coisas. **Acta Pediátrica Portuguesa**, Lisboa, v. 32, n. 1, p. 25-30, 2001.

SPIEGEL, J. E.; ROSE, R.; KARABELL, P.; FRANCOS, V. H.; SCHMIDT, D. F. Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients. **Food Technology**, Chicago, v. 48, n. 1, p. 85-89, Jan. 1994.

SCOTT, J. S. **cheesemaking practice.** London: Elsevier Applied Science, 1986. 529 p.

SHAH, N. P. Functional foods from probiotics and prebiotics. **Food Technology**, Chicago, v. 55, n. 11, p. 46-53, 2001.

SHAH, N. P.; JELEN, P. Survival of lactic acid bacteria and their lactases under acidic conditions. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 55, p. 505-509, 1990.

STANTON, C.; GARDINER, G.; LYNCH, P. B.; COLLINS, J. K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R. P. Probiotic cheese. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 8, n. 5/6, p. 491-496, May/June 1998.

STONE, H.; SIDEL, J. L. **Sensory evaluation practices.** Orlando, Florida: Academic Press, 1985. p. 227-252.

SURAZINSKI, A. PERTESON, E. Fenômenos Fundamentais durante la maturacion de los quesos. In: **CURSO NACIONAL DE LEITE E DERIVADOS**, 1., 1973, Belo Horizonte. **Resumo...** Rio de Janeiro: FAO/UFMG, 1973. p. 38.

SWADLING, I. The regulation and marketing of functional foods worldwide, **Food Info**, Sheffield, n. 4/5, jun. 2001.



TAMINE, A. Novas tendências na tecnologia de leites fermentados e produtos probióticos. **Dairy Science and Technology**, Departamento de Ciências Farmacêuticas- FCF- USP, 2002.

TEIXEIRA, E.; MEINERT, E. M.; BARBETTA, P. A. **Análise sensorial de alimentos**. Florianópolis: UFSC, 1987.

TISSIER, H. Traitement des infections intestinales par la methods de transformations de la flora bacterinne de l'intestin. **C. R. Soc. Biol.** v. 60, p. 359-362, 1906.

TOKUNAGA, T.; OKU, T.; HOSAYA, N. Influence of chronic intake of new sweetener fructooligosaccharides (neosugar) on growth and gastrointestinal function of rat. **Journal of Nutrition Science and Vitaminology**, Tokyo, v. 32, n. 4, p. 111-121, 1986.

TOKUNAGA, T.; OKU, T.; HOSAYA, N. Utilization and excretion of a new sweetener fructooligosaccharides (neosugar) in rats. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 119, n. 4, p. 553-559, Apr. 1989

VACCARI, G.; GONZÁLEZ-VARA, Y R. A.; CAMPI, A. L.; DOSI, E.; BRIGIDI, P.; MATTEEUZZI, D. Fermented production of L-lactic acid by *Lactobacillus casei* DSM20011 and product recovery using ion exchange resins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Washington, v. 40, n. 1, p. 23-27, 1993.

VARNAN, H. A.; SUTHERLAND, P. J. **Milk and milk products**. London: Chapman & Hall, 1994. Cap. 7, p. 278-279.

VIEIRA, M. C. **Conservação do soro do queijo minas com peróxido de hidrogênio**. 1984. 66 p. Dissertação (Mestrado) – univeersidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

VINDEROLA, C. G.; PROSILLO, W.; GHIRBERTO, D.; REINHEIMER, J. A. Viability of probiotics (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* and non probiotic microflora in argentinian fresco cheese **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 83, p. 1905-1911, 2000.

WOLFSCHOON-POMBO, A. F. Índices de proteólise em alguns queijos brasileiros. **Boletim do Leite**, Rio de Janeiro, v. 51, n. 661, p. 1-8, nov. 1983

WOLFSCHOON-POMBO, A. F.; CASAGRANDE, H. R.; LOURENÇO-

NETO, J. P. M.; MUNK, A. V. Alterações no queijo Minas Frescal durante o período de armazenamento. *Revista de Laticínios "Cândido Tostes"*, Juiz de Fora, v. 39, n. 233, p. 3-9, maio/jun. 1984.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk live lactic bacteria: report of the joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder with live lactic acid bacteria. Córdoba, Argentina, 2001.

YOKOYAMA, S. M. Alimentos funcionais – contribuição ao bem-estar e saúde do homem. *Food Ingredients*, São Paulo, n. 3, p. 31, nov./dez. 1999.

YUN, J. W. Fructooligosaccharides – occurrence, preparation and applications, B. Kyungbug, Coréia. *Enzymes and Microbial Technology*, Woburn, v. 19, n. 2, p. 107-117, Aug. 1996.

ZIEMER, C. J.; GIBSON, G. R. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. *International Dairy Journal*, Oxford, v. 8, n. 5/6, p. 473.

ANEXOS

	Página
TABELA 1A	Resumo da análise de variância para pH 103
TABELA 2A	Resumo da análise de variância para ácido láctico 103
TABELA 3A	Resumo dos coeficientes estimados (comportamento do teor de ácido láctico ao longo dos dias) 103
TABELA 4A	Resumo dos coeficientes estimados (comportamento do teor de ácido láctico ao longo dos níveis de inulina) 103
TABELA 5A	Resumo da análise de variância para cloretos 104
TABELA 6A	Resumo dos coeficientes estimados (comportamento do teor de cloretos ao longo dos dias) 104
TABELA 7A	Resumo da análise de variância para nitrogênio total (comportamento do nitrogênio total ao longo dos dias) 104
TABELA 8A	Resumo dos coeficientes estimados (comportamento do nitrogênio total ao longo dos dias) 104
TABELA 9A	Resumo da análise de variância (comportamento entre os dias analisados e entre os níveis de inulina) 105
TABELA 10A	Resumo dos coeficientes estimados (comportamento da aparência ao longo das doses de inulina) 105
TABELA 11A	Resumo dos coeficientes estimados (comportamento da aparência ao longo dos dias) 105
TABELA 12A	Resumo da análise de variância com relação à cor 105
TABELA 13A	Resumo dos coeficientes estimados (comportamento da cor ao longo dos dias) 106
TABELA 14A	Resumo da análise de variância com relação ao sabor .. 106
TABELA 15A	Resumo dos coeficientes estimados (comportamento do sabor ao longo dos dias) 106
TABELA 16A	Resumo da análise de variância com relação à textura . 106
TABELA 17A	Resumo da análise de variância do desdobramento de dias, para de cada nível de inulina 107
TABELA 18A	Resumo dos coeficientes estimados para a textura, em função do tempo nas doses 0% 107

TABELA 19A	Resumo da regressão, para a dose de 4% de inulina	107
TABELA 20A	Resumo da análise de variância do desdobramento de inulina para cada nível de dias	107
TABELA 21A	Resumo da análise de regressão para textura, em função da dose de inulina do tempo de 15 dias	108
TABELA 22A	Resumo da análise de regressão do tempo de 30 dias ...	108

TABELA 1A - Resumo da análise de variância para pH.

FV	GL	SQ	QM	Valor F	P valor
Bloco	2	0,24101	0,12051	6,5488	0,003143 **
Dia	7	0,27251	0,03893	2,1156	0,060626
Inulina	2	0,02934	0,01467	0,7974	0,456648
Dia x inulina	14	0,17412	0,01244	0,6759	0,785109
Resíduo	46	0,84646	0,01840		

TABELA 2A - Resumo da análise de variância para ácido láctico.

FV	GL	SQ	QM	Valor F	P valor
Bloco	2	0,0004194	0,0002097	0,6803	0,511480
Dia	7	0,0131556	0,0018794	6,0964	4,581e-05***
Inulina	2	0,0031694	0,0015847	5,1406	0,009662**
Dia x inulina	14	0,0022528	0,0001609	0,5220	0,907545
Resíduo	46	0,0141806	0,0003083		

TABELA 3A - Resumo dos coeficientes estimados (comportamento do teor de ácido láctico ao longo dos dias).

Coeficientes	Estimativa	Erro padrão	Valor t	P valor
Intercepto	4,955e-02	4,170e-03	11,884	2,15e-05 ***
Linear	3,769e-04	8,242e-05	4,573	0,0038 **

$R^2 = 74,00\%$

TABELA 4A - Resumo dos coeficientes estimados (comportamento do teor de ácido láctico ao longo dos níveis de inulina).

Coeficientes	Estimativa	Erro padrão	Valor t	P valor
Intercepto	0,056319	1,553e-04	362,69	0,00176 **
Linear	0,004062	6,014e-05	67,55	0,00942 **

$R^2 = 99,96\%$

TABELA 5A - Resumo da análise de variância para cloretos.

FV	GL	SQ	QM	Valor F	P valor
Bloco	2	0,08146	0,04073	3,7416	0,032388 *
Dia	6	0,03658	1,8174	3,3603	0,008916 **
Inulina	2	0,03127	0,01563	1,4362	0,249831
Dia x inulina	12	0,14360	0,01197	1,0993	0,387057
Resíduo	40	0,43541	0,01089		

TABELA 6A - Resumo dos coeficientes estimados (comportamento do teor de cloretos ao longo dos dias).

Coeficientes	Estimativa	Erro padrão	Valor t	P valor
Intercepto	1,2176496	0,0422145	28,844	9,38e-07 ***
Linear	0,0007805	8,242e-05	1,202	0,283

$R^2 = 22,42\%$

TABELA 7A - Resumo da análise de variância para nitrogênio total (comportamento do nitrogênio total ao longo dos dias).

FV	GL	SQ	QM	Valor F	P valor
Bloco	2	0,00445	0,00222	0,0365	0,964152
Dia	5	1,45761	0,29152	4,7903	0,002022**
Inulina	2	0,02605	0,01302	0,2140	0,808420
Dia x inulina	10	0,22000	0,02200	0,3615	0,954877
Resíduo	34	2,06915	0,06086		

TABELA 8A - Resumo dos coeficientes estimados (comportamento do nitrogênio total ao longo dos dias).

Coeficientes	Estimativa	Erro padrão	Valor t	P valor
Intercepto	3,922258	0,059060	66,412	3,08e-07 ***
Linear	0,006518	0,001761	3,702	0,0208 *

$R^2 = 71,76\%$

TABELA 9A - Resumo da análise de variância (comportamento entre os dias analisados e entre os níveis de inulina).

FV	GL	SQ	QM	Valor F	P valor
Bloco	17	97,665	5,745	5,7810	2,960e-9 ***
Dia	3	8,925	2,975	2,9938	0,033900 *
Inulina	2	10,823	5,411	5,4453	0,005536 **
Dia x inulina	6	7,894	1,316	1,3239	0,252367
Resíduo	112	111,302	0,994		

TABELA 10A - Resumo dos coeficientes estimados (comportamento da aparência ao longo das doses de inulina).

Coefficientes	Estimativa	Erro padrão	Valor t	P valor
Intercepto	7,76241	0,10308	75,30	0,00845 **
Linear	-0,16489	0,03992	-4,13	0,15122

$R^2 = 88,93\%$

TABELA 11A - Resumo dos coeficientes estimados (comportamento da aparência ao longo dos dias).

Coefficientes	Estimativa	Erro padrão	Valor t	P valor
Intercepto	7,4741667	0,0641727	116,470	0,00547 **
Linear	-0,0289444	0,0068704	-4,213	0,14836
Quadrático	0,0007593	0,0001463	5,189	0,12119

$R^2 = 91,43\%$

TABELA 12A - Resumo da análise de variância com relação à cor.

FV	GL	SQ	QM	Valor F	P valor
Bloco	17	77,296	4,547	4,7520	1,755e-7
Dia	3	13,712	4,571	4,7770	0,003595
Inulina	2	0,184	0,092	0,0964	0,908214
Dia x inulina	6	7,188	1,198	1,2520	0,285495
Resíduo	112	107,165	0,957		

TABELA 13A - Resumo dos coeficientes estimados (comportamento da cor ao longo dos dias).

Coeficientes	Estimativa	Erro padrão	Valor t	P valor
Intercepto	7,9097222	0,0908104	87,102	0,00731 **
Linear	-0,0467593	0,0097222	-4,810	0,13051
Quadrático	0,0008951	0,0002070	4,323	0,14472

R² = 88,06%

TABELA 14A - Resumo da análise da variância (comportamento entre os dias analisados com relação ao sabor).

FV	GL	SQ	QM	Valor F	P valor
Bloco	17	211,626	12,449	9,6160	4,497e-15 ***
Dia	3	26,324	8,775	6,7780	0,0003055 ***
Inulina	2	3,429	1,715	1,3244	0,2700921
Dia x inulina	6	2,665	0,444	0,3431	0,9125440
Resíduo	112	144,992	1,295		

TABELA 15A - Resumo dos coeficientes estimados (comportamento do sabor ao longo dos dias).

Coeficientes	Estimativa	Erro padrão	Valor t	P valor
Intercepto	6,851806	0,131490	52,109	0,000368 ***
Linear	-0,014417	0,004686	-3,077	0,091385

R² = 73,84%

TABELA 16A - Resumo da análise de variância entre doses de inulina e dias, com relação à textura.

FV	GL	SQ	QM	Valor F	P valor
Bloco	17	171,742169	10,102481	8,115	0,0000***
Dia	3	7,017863	2,339288	1,879	0,1372ns
Inulina	2	1,790780	5,895390	4,735	0,0106*
Dia x inulina	6	28,305053	4,717509	3,789	0,0018**
Resíduo	112	139,434914	1,244955		

TABELA 17A - Resumo da análise de variância do desdobramento de dias para cada nível de inulina.

FV	GL	SQ	QM	Valor F	P valor
Dia /1	3	13,059131	4,353044	3,497	0,0178 *
Dia /2	3	3,302128	1,100709	0,884	0,4504
Dia /3	3	18,961658	6,320553	5,077	0,0024 **
Resíduo	112	139,434914	1,244955		

TABELA 18A - Resumo dos coeficientes estimados para a textura em função do tempo, na dose 0% de inulina.

Coeficientes	Estimativa	Erro padrão	Valor t	P valor
Intercepto	6,698750	0,32550088	20,580	0,0000***
Linear	0,083528	0,03484834	2,397	0,0182*
Quadrático	-0,001731	0,00074213	-2,333	0,0214*

$R^2 = 64,81\%$

TABELA 19A - Resumo dos coeficientes estimados para a textura em função do tempo, para dose 4% de inulina.

Coeficientes	Estimativa	Erro padrão	Valor t	P valor
Intercepto	7,482292	0,32550088	22,987	0,0000***
Linear	-0,103958	0,03484834	-2,983	0,0035**
Quadrático	0,001690	0,00074213	2,277	0,0247*

$R^2 = 99,57\%$

TABELA 20A - Resumo da análise de variância dos desdobramentos de inulina para cada nível de dias.

FV	GL	SQ	QM	Valor F	P valor
Inulina /1	2	6,811111	3,405556	2,735	0,0677
Inulina /2	2	20,041667	10,020833	8,049	0,0005***
Inulina /3	2	8,062500	4,031250	3,238	0,0419*
Inulina /4	2	5,180556	2,590278	2,081	0,1272
Resíduo	112	139,4349	1,244955		

TABELA 21A - Resumo da análise de variância entre as doses de inulina, nos tempos de 15 e 30 dias.

Coeficientes	Estimativa	Erro padrão	Valor t	P valor
Intercepto	7,770833	0,29403262	26,428	0.0000***
Linear	-0,427083	0,11387834	-3,750	0.0003***

$R^2 = 87,37\%$

TABELA 22A - Resumo de análise de regressão do tempo 30 dias.

Coeficientes	Estimativa	Erro padrão	Valor t	P valor
Intercepto	7,093750	0,36011494	19,699	0,0000***
Linear	-0,328125	0,13947192	-2,353	0,0204*

$R^2 = 85,47\%$

PRONTO - SOCORRO DO LIVRO
RUA ANÍBAL TEODORO, 330
PITANGUI - 37200-000 - LAVRAS - MG
TELEFONE (035) 3822 - 0198

