

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS ALIMENTOS**

**DESENVOLVIMENTO DE QUEIJO *COTTAGE*
SIMBIÓTICO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Carline Gass Parodia

Santa Maria, RS, Brasil

2010

DESENVOLVIMENTO DE QUEIJO *COTTAGE* SIMBIÓTICO

por

Carline Gass Parodia

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de Concentração Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

Orientador (a): Prof^a Dr^a Neila S. P. S. Richards

Santa Maria, RS, Brasil

2010

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

A Comissão Examinadora, Abaixo Assinada,
Aprova a Dissertação de Mestrado

DESENVOLVIMENTO DE QUEIJO *COTTAGE* SIMBIÓTICO

elaborada por
Carline Gass Parodia

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

COMISSÃO EXAMINADORA

Neila S.P.S. Richards, Dr^a (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Liris Kindlein, Dr^a (UFRGS)

Juliano Smanioto Barin, Dr (UFSM)

Santa Maria, 30 de Março de 2010.

*Dedico este trabalho a minha
família, especialmente aos meus pais,
Wilson e Ereni Parodia, que sempre
me mostraram que a maior herança
que se pode deixar para alguém é a
educação.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar meu caminho, guiar os meus passos e me carregar nos braços nos momentos mais difíceis, estando presente eternamente em minha vida, e que concede-me força para vencer todos os obstáculos.

À Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade da graduação e pós-graduação, acolhendo-me por mais de sete anos, e ainda por mais alguns.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos meus pais, Wilson e Ereni, por simplesmente ser o meu “porto seguro”. Agradeço por todo o apoio que vocês puderam e souberam me conceder, e que perpetuará por toda a eternidade.

Aos maiores e mais verdadeiros amores da minha vida, meus irmãos Dudo, Carol e Juca, obrigada por me mostrarem o sentido do mais puro e verdadeiro amor, e por cada dia me fazer aprender coisas que só vocês podem ensinar.

A minha “outra mãe”, Vó Jura. Obrigada por, ajudar a construir meus valores e princípios morais, pelo apoio, amor e ensinamentos desde sempre, e por me confortar quando eu “tinha” medo.

A todos os meus tios e tias, em especial a Márcia e ao tio James, por sempre me apoiarem na minha carreira profissional e alegrar a minha vida.

Ao Chico e a Tanea Severo, que sempre me apoiaram em todos os momentos. Obrigada pelo carinho, amizade e confiança.

Ao meu querido Professor Edgar Durante, que é um dos meus “anjos da guarda.” Nunca esquecerei o dia em que fui a sua sala pedir para participar de sua pesquisa, pois foi a partir deste momento que comecei a caminhada rumo ao mestrado. Você é um dos principais responsáveis por esta conquista, nossa amizade é um sentimento que o tempo nunca irá apagar. Agradeço por todo carinho, atenção e confiança.

À Professora Neila Richards, por aceitar me orientar e confiar em meu trabalho. Obrigada pelo apoio, amizade e atenção.

À amiga Marialene Manfio, que sempre foi mais um desses “anjos” que Deus colocou em meu caminho para me confortar com sábias e sinceras palavras. Muito obrigada pelo carinho, amizade e confiança, além da ajuda na realização das análises.

A minha adorada colega e amiga Ana Paula Rezer, pelo apoio, incentivo, carinho e atenção durante a realização deste trabalho. Que nossa amizade seja eterna.

A todas as minhas colegas e amigas para sempre, Tessa, Mariana, Mara Rúbia, Alice, Andréia, Cristiana... pelo apoio e momentos de descontração. Em especial à Jaqueline Piccolo que dedicou parte de seu tempo a me auxiliar no texturomêtro, e à Susana Mohr, pelo carinho, atenção e valorosos conselhos.

Aos colaboradores, estagiários e amigos de laboratório, Mateus, Diego, Carlos, Monique, Suelen, Carol, Camila, Fernanda, Marina e Dani Back... Em especial, à Paula Mattanna pela companhia, dedicação, apoio e colaboração durante a realização deste trabalho, e à Natiéle Piovesan pela disponibilidade e auxílio na realização das análises finais.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos e da Usina-Escola da UFSM por minha formação e auxílios prestados. Em especial, à Rosane, Liana, Moisés, Maria, Marta, Carlos e Velcir, pela amizade, auxílio e ensinamentos transmitidos.

Aos meus amados “quase racionais”, Sheik, Mag, Goda, Negga e Tigui, por nunca deixar que eu me sentisse só, mostrando que um gesto de carinho sincero vale mais que palavras.

Obrigada pela parceria, alegria e amizade fiel de todas as horas.

E por último, mas não menos importante, ao meu *amore*, Gustavo Severo de Severo, que como um “anjo” surgiu em minha vida. Obrigada pelo amor, carinho, amizade, incentivo e compreensão.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para concretização deste trabalho. Muito obrigada.

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer... a alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido, não na vitória propriamente dita.”

(Mahatma Gandhi, 1869-1948)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos
Universidade Federal de Santa Maria

DESENVOLVIMENTO DE QUEIJO *COTTAGE* SIMBIÓTICO

AUTORA: CARLINE GASS PARODIA
ORIENTADOR (A): NEILA S. P. S. RICHARDS
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 30 de Março de 2010.

A crescente popularidade dos alimentos funcionais tem promovido avanços nas pesquisas com novos produtos, principalmente no setor de laticínios. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência de diferentes concentrações de gordura e de prebiótico (inulina) sobre as características físico-químicas, sensoriais, cor e textura instrumental, bem como a viabilidade das culturas probióticas em queijo *cottage* adicionado de *Streptococcus termophilus*, *Lactobacillus acidophilus* La - 5 e *Bifidobacterium* Bb – 12, durante o armazenamento por 21 dias a 4 ± 1 °C. Doze ensaios de queijo *cottage* foram elaborados com diferentes concentrações de gordura e inulina planejados através do Delineamento Central Composto Rotacional com quatro repetições no ponto central. Foi observada mudança significativa ($p < 0,05$) nas características físico-químicas (acidez, proteína, gordura, cloretos, umidade e cinzas) conforme as variações dos teores de gordura e inulina dos queijos. A avaliação dos atributos sensoriais (aparência geral, aroma, textura, acidez e sabor) foi realizada através de teste com escala hedônica de 7 níveis e teste de ordenação. As superfícies de resposta geradas mostraram diferentes regiões com tendência à melhor aceitação, variando cada região conforme o atributo analisado, apesar de não ter sido encontrada diferença estatística pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$) nestas avaliações. Apenas o termo linear e de interação da regressão linear múltipla foram significativos ($p < 0,05$) para o atributo aroma; somente o intercepto da equação de cada atributo apresentou significância estatística ($p < 0,05$). Para o perfil lipídico, as diferenças significativas observadas foram atribuídas aos diferentes teores de gordura de cada formulação. A superfície de resposta foi elaborada para verificar a influência das diferentes concentrações de gordura e inulina sobre a acidez (expressa em ácido láctico) e o pH das formulações durante o armazenamento, tendo somente o termo linear da concentração de gordura e inulina apresentado significância ($p < 0,05$). O pH e acidez titulável das formulações influenciaram a viabilidade das culturas durante todo o armazenamento. Os *Streptococcus termophilus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis* apresentaram contagens acima de 7 UFC g^{-1} durante todo o período, garantindo a potencialidade probiótica de todas as formulações. A extensão da proteólise aumentou significativamente durante o armazenamento, mas esta mudança não reduziu a firmeza dos queijos. Os parâmetros de cor e textura instrumental variaram significativamente ($p < 0,05$) entre o 1º e 21º dia de armazenamento para a maioria das formulações, mas estes resultados não interferiram na aceitabilidade dos provadores.

Palavras-chave: *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus acidophilus*, gordura, inulina, queijo *cottage*.

ABSTRACT

Master's Dissertation

Graduate Program on Food Science and Technology

Federal University of Santa Maria

DEVELOPMENT OF SYMBIOTIC COTTAGE CHEESE

Author: CARLINE GASS PARODIA

Adviser: NEILA S. P. S. RICHARDS

Date and Place of Defense: Santa Maria, March 30th, 2010.

The growing popularity of functional foods, has promoted advances in the research of new products, specially in the dairy industry. The objective of this study was to evaluate the influence of different levels of fat and inulin on the physicochemical and sensorial characteristics, instrumental color and texture, and viability of probiotic cultures of cottage cheese with the addition of *Streptococcus termophilus*, *Lactobacillus acidophilus* La - 5 and *Bifidobacterium* Bb – 12, during storage for 21 days at 4 ± 1 °C. Twelve treatments of cottage cheese were elaborated with different fat and inulin concentrations according to a central composite design with 4 repetitions on the central point. Significant changes were observed on the physicochemical characteristics (tritable acidity, protein, fat, salt, moisture and ash) due to the different levels of fat and inulin in the cheeses. The assessment of the sensory attributes (global appearance, aroma, texture, acidity and taste) was carried out using a test with hedonic scale of 7 levels and an ordering test. The surface response showed different areas with tendency to better acceptance, varying according to the sensory attribute, in spite of no significant difference having been found by Tukey's test ($p > 0.05$). Only the linear and interaction of multiple linear regression terms were significant ($p < 0.05$) for the aroma sensory attribute; only the intercept of the equation of each attribute was significant ($p < 0.05$). The differences in the lipid profile were related to different fat levels in each formulation. The surface response was done to verify the influence of different levels of fat and inulin on pH and tritable acidity during storage; only linear terms of fat and inulin levels were significant ($p < 0.05$). The pH and tritable acidity affect the viability of the cultures during all the storage period. *Streptococcus termophilus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis* had counts above 7 UFC g^{-1} during all the period, assuring the probiotic potential in all the cottage cheese formulations. The extent proteolysis increased significantly during storage, but this change has no reduce the firmness of the cheeses. The parameters of instrumental color and texture vary significantly ($p < 0.05$) between 1 and 21 days of storage for most formulations, but these results did not affect the acceptability of the tasters.

Key words: *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus acidophilus*, inulin, fat, cottage cheese.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 Queijo <i>cottage</i>.....	12
2.2 Alimentos funcionais.....	13
2.3 Prebióticos.....	14
2.3.1 Inulina.....	15
2.4 Probióticos.....	16
2.4.1 Uso de bactérias probióticas em produtos lácteos.....	17
2.5 Influências do teor de lipídios dos queijos sobre a viabilidade de microrganismos probióticos	18
3 MANUSCRITOS.....	20
3.1 Manuscrito 1.....	21
3.2 Manuscrito 2.....	37
3.3 Manuscrito 3.....	62
4 DISCUSSÃO GERAL.....	83
5 CONCLUSÕES.....	85
REFERÊNCIAS.....	86
ANEXOS.....	98

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o mercado de alimentos funcionais tem se mostrado crescente e lucrativo, apresentando grande destaque no setor de laticínios. Na tentativa de obter produtos com alta qualidade sensorial associados à capacidade de oferecer benefícios à saúde do consumidor, bactérias probióticas e substâncias prebióticas têm sido amplamente aplicadas em derivados lácteos.

Apesar dos produtos a base de leite serem favoráveis quanto à presença de nutrientes importantes, a indústria de laticínios enfrenta o problema relacionado ao risco do alto consumo de gorduras saturadas, pois dietas gordurosas, especialmente de origem animal, têm sido consideradas como uma das maiores causas de risco à saúde, e estão relacionadas ao surgimento de diversos tipos de doenças (RYHÄNEN, PIHLANTO-LEPPÄLÄ, & PAHKALA, 2001). Com isso, alguns microrganismos probióticos e substâncias prebióticas, têm sido adicionados à elaboração de queijos frescos, pois este produto pode ser facilmente ajustado a baixas concentrações de gordura (VINDEROLA et al., 2000; HELLER et al., 2003; BURITI et al., 2005).

É conhecido que, devido à alta umidade, os queijos com baixo teor de gordura são caracterizados por apresentarem defeitos de textura, aroma e sabor (BANKS, 2004). Assim, a necessidade de aumentar a qualidade sensorial destes produtos, faz com que algumas estratégias de processos modificados, adição de culturas específicas e de substitutos de gordura, sejam adotadas na elaboração dos queijos com baixas concentrações de gordura (DRAKE & SWANSON, 1995).

Embora os queijos com baixo teores de gordura sejam classificados por alguns autores como produtos de baixa qualidade (MICHIDA et al., 2003; BANKS, 2004), meios com menores concentrações de gordura são favoráveis a multiplicação de bactérias probióticas (VINDEROLA et al., 2000; RYHÄNEN, PIHLANTO-LEPPÄLÄ, & PAHKALA, 2001). Dentre elas, os *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são os principais microrganismos probióticos empregados em alimentos (SHORTT E O'BRIEN, 2004). A adição destas bactérias em produtos lácteos pode conferir alterações de sabor, aroma e textura dos mesmos, devido a fenômenos bioquímicos de degradação e síntese de substâncias como parte do metabolismo

dessas culturas (AKALIN et al., 2004). No entanto, a eficácia dos probióticos pode estar condicionada a presença de substrato necessário para a fermentação e desenvolvimento de suas funções metabólicas.

Assim, a adição de um ingrediente prebiótico pode estimular o crescimento e colonização dos probióticos, auxiliando na manutenção da viabilidade destas culturas (UYSAL et al., 2003; BOYLSTON et al., 2004). Dentre os prebióticos, a inulina tem recebido grande atenção em virtude de sua capacidade bifidogênica, além de ser amplamente utilizada na indústria de alimentos como substituto de gordura em produtos de baixo valor calórico. Sendo assim, torna-se interessante estudar o comportamento de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium* Bb-12 em queijo *cottage*, com diferentes teores de gordura e inulina, bem como possíveis alterações nas características físico-químicas e sensoriais deste produto.

Neste contexto, o presente estudo foi realizado, tendo como objetivos:

- Investigar a possibilidade de produzir uma formulação de queijo *cottage* com reduzido teor de gordura, suplementado com inulina, e com populações satisfatórias de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium* Bb-12, visando produzir um produto considerado funcional;
- Analisar as características físico-químicas e microbiológicas das formulações;
- Avaliar a aceitação e preferência sensorial das formulações;
- Estudar a influência do teor de gordura e inulina sobre as culturas de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium* Bb-12, assim como os efeitos destas sobre o perfil lipídico, textura e cor das diferentes formulações de queijo *cottage*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Queijo *cottage*

A origem específica do queijo *cottage* é desconhecida, apesar de muitos autores afirmarem que este queijo surgiu na Grã-Bretanha, sendo difundido em todos os países de origem anglo-saxônica, a produção industrial começou nos Estados Unidos por volta de 1916. O nome “*cottage*” relaciona-se com suas origens, ou seja, é um queijo típico das vilas e aldeias (RODRIGUES, 1999; FARKYE, 2004).

O queijo *cottage* é um tipo de queijo fresco, levemente ácido, produzido pela coagulação ácida do leite desnatado pasteurizado. A característica inconfundível deste queijo é a textura granular da massa coalhada com partículas de tamanho relativamente uniforme, que pode ser misturada ou não a um líquido cremoso (*dressing*) (RODRIGUES, 1999). Pode ser fabricado através de três diferentes métodos, baseados no tempo de coagulação (curta, intermediária ou longa), com microrganismos *starter* ou por acidificação direta. O processo de fabricação, após a coagulação do leite, compreende as etapas de: tratamento térmico, resfriamento/lavagem da massa, drenagem, adição do *dressing* e embalagem (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

Atualmente, há diversas variedades de queijo *cottage*, com diferentes consistências, teores de gordura e umidade. No Brasil, este queijo é comercializado na forma de grãos secos, grãos misturados ao *dressing*, como também, na forma pastosa (tipo *petit-suisse*) (RODRIGUES, 1999). Segundo a legislação americana o limite máximo de gordura é de 0,5%, para grãos de coalhada seca, e 4% para *cottage* com *dressing* (FARKIE, 2004). A legislação brasileira, até o momento não possui padrões de identidade e qualidade específicos para queijo *cottage*, o que dificulta comparações, com base na legislação, entre diferentes marcas comerciais.

Por ter sabor suave e baixo teor de gordura, o queijo *cottage* permite várias combinações conforme a tendência cultural e gastronômica de cada país. Nos EUA é um tipo de queijo muito popular, onde representa aproximadamente 8% da produção total de queijo (DAIRY PRODUCTS, 2002). É consumido com frutas, saladas, sanduíches e compõe

diversos tipos de receitas doces e salgadas. No Brasil, apesar de seu consumo ainda ser baixo, este queijo vem conquistando espaço no mercado queijeiro (RODRIGUES, 1999). Em virtude da flexibilidade em diversificar seu sabor e forma, alta digestibilidade (em função da fermentação láctica), de baixo valor calórico em comparação com outros tipos de queijo, este produto se encaixa na tendência de consumo de lácteos da linha *light*, representando uma grande vantagem sob os demais.

2.2 Alimentos funcionais

Atualmente, há uma preocupação constante com relação à saúde, qualidade de vida e bem-estar da população. Considerando a alimentação como um fator principal que contribui para um estilo de vida mais saudável, podendo reduzir consideravelmente os riscos de doenças e obesidade, pesquisadores tem desenvolvido vários estudos na área de saúde e nutrição, principalmente com relação a alimentos funcionais.

O surgimento de pesquisas com alimentos funcionais ocorreu no Japão, no início da década de 80. Em 1991, a definição legal de alimento funcional foi estipulada de acordo com o Sistema “Alimento Destinado a Uso Específico de Saúde” (Food for Specific Health Use – FOSHU) (ROBERFROID, 2000; STATON et al., 2005). Alimentos funcionais são aqueles que, favorecem a saúde e bem estar do hospedeiro, além de fornecerem a nutrição básica. A definição refere-se a um alimento (semelhantes ao convencional) ou ainda a um ingrediente alimentar que proporcione benefícios médicos e/ou de saúde, prevenindo e auxiliando no tratamento de doenças crônico-degenerativas (SANDERS, 1998).

Nos últimos anos, devido à grande preocupação dos consumidores com relação à saúde e a forma física, a indústria de alimentos funcionais tem impulsionado pesquisadores a desenvolverem novos estudos com processos tecnológicos mais eficazes e com uma maior diversidade de produtos, como a adição de probiótico e prebióticos em alimentos (BETORET et al., 2003; ARVANITOYANNIS, HOWELINGEN-KOUKALIAROGLOU, 2005). Com isso, o mercado de alimentos funcionais tem se mostrado crescente e lucrativo, movimentando cerca de 50 bilhões de dólares anualmente, além de ser responsável por mais da metade dos investimentos publicitários na área alimentícia, e possuir expectativas de crescimento de 5% por ano (HARDY, 2000; STATON, et al., 2005).

2.3 Prebióticos

Prebióticos são definidos como ingredientes alimentares, como a inulina e a oligofrutose, não digeríveis pela maioria dos microrganismos do intestino humano, que promovem a multiplicação e/ou atividade de uma ou mais espécies de bactérias do cólon, garantindo o bem estar à saúde do hospedeiro (GILLILAND, 2001; ROBERFROID, 2005). Alguns oligossacarídeos como a lactulose, rafinose, fruto-oligossacarídeos (FOS), e polissacarídeos como a inulina e o amido resistente podem ser consideradas substâncias prebióticas (CONWAY, 2001). A inulina e os compostos a ela relacionados, como a oligofrutose e os fruto-oligossacarídeos (FOS), compõem a classe dos frutanos que se diferenciam entre si pelo grau de polimerização (DP), ou seja, número de unidades individuais de monossacarídeos na molécula. Possuem características funcionais por exercerem influência sobre os processos fisiológicos e bioquímicos no organismo, reduzindo os riscos de diversas doenças e melhorando à saúde. As principais fontes destes prebióticos estão na chicória e alcachofra de Jerusalém (CARABIN; FLAMM, 1999).

Segundo Roberfroid (2002), os principais efeitos benéficos atribuídos aos prebióticos são:

- Modulação de funções fisiológicas como absorção de cálcio e, possivelmente, no metabolismo lipídico;
- Redução do risco de câncer de cólon;
- Modulação da composição da microbiota intestinal exercendo funções essenciais na fisiologia gastrointestinal.

Pelo fato de na literatura não existir um consenso quanto à concentração mínima a ser ingerida para que inulina e oligofrutose exerçam seus efeitos benéficos já mencionados, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), descreve na Lista de Alegações de Propriedade Funcional, que a porção do produto pronto para o consumo deve fornecer, no mínimo, 3 g de inulina se o alimento for sólido ou 1,5 g se o alimento for líquido, para que possa ser especificado no rótulo que o produto contribui para o equilíbrio da flora intestinal (BRASIL, 2008).

2.3.1 Inulina

A inulina é um carboidrato de reserva de muitas plantas. Na alcachofra de Jerusalém, chicória, dália e yacon, as concentrações de inulina podem chegar até 20% do peso fresco, o que torna estes vegetais uma importante fonte de inulina (VORAGEN, 1998). Quimicamente é um polímero de D-frutose com grau de polimerização (DP) de 10-20 e cadeia de 2-60 unidades, contendo 6-10% de glicose, frutose e sacarose (CARPITA; KAMABUS; HOUSLEY, 1989). É extraída a altas temperaturas seguida de um processo de exclusão de íons, apresentando-se como um pó branco, amorfo, higroscópico, com odor e sabor neutros (HAULY & MOSCATTO, 2002; HENELLY et al., 2006). Em relação às propriedades fisiológicas, por ser resistente à digestão na porção superior do trato intestinal e alcançar o intestino grosso praticamente intacta, onde será fermentada pelas bactérias, a inulina possui características de fibra alimentar solúvel (HAULY & MOSCATTO, 2002). Assim, este prebiótico pode ser usado para enriquecer com fibras produtos alimentícios sem alterar o sabor e a aparência das formulações padrões.

Os ingredientes prebióticos e probióticos, quando adicionados simultaneamente em concentrações adequadas nos alimentos, possuem efeito sinérgico, e por isso são chamados de simbióticos. A presença de inulina e oligofrutose promoveu o crescimento e aumento de bifidobactéria e lactobacilos em queijo *Petit Suisse* suplementado com estes microrganismos (CARDARELLI et al., 2007). Buriti et al. (2007) avaliaram a viabilidade de inulina em queijo fresco cremoso adicionado de *Lactobacillus paracasei* em co-cultura com *Streptococcus thermophilus* e constataram a potencialidade deste produto como simbiótico, devido ao fato de que a inulina manteve-se inalterada, apresentando concentrações necessárias para o efeito prebiótico, assim como o microrganismo probiótico.

Do ponto de vista tecnológico, a inulina tem a habilidade de formar microcristais, imperceptíveis na boca, quando misturada a água ou leite. A interação entre estes microcristais promove uma textura finamente cremosa, semelhante a da gordura (NINESS, 1999). Em vários estudos com lácteos, a inulina tem sido utilizada como substituto da gordura. Em produtos como requeijão cremoso e queijo processado, a incorporação deste prebiótico aumenta a consistência, promove uma textura mais cremosa e um sabor mais balanceado (NINESS, 1999; ROBERFROID; SLAVIN, 2000; NEVEN, 2001).

2.4 Probióticos

O trato gastrointestinal é colonizado por aproximadamente 10^{14} células microbianas, com cerca de 500 a 1000 espécies diferentes (KELLY; KING; AMINOV, 2007), sendo o cólon a região mais densamente colonizada, com um total entre 10^{11} a 10^{12} células bacterianas por grama de tecido. Estes microrganismos influenciam inúmeras funções fisiológicas do hospedeiro, quando em equilíbrio, como a prevenção da proliferação dos microrganismos potencialmente patogênicos (PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2002; SALMINEN; ISOLAURI, 2006), promovendo assim o desenvolvimento de uma microbiota benéfica (LOSADA; OLLEROS, 2002). Dentre os diversos gêneros de microrganismos responsáveis pela manutenção da flora intestinal, destacam-se principalmente os gram-positivos anaeróbicos *Bifidobacterium*, *Bacteroides* e *Eubacterium*, e em menor número, os gêneros *Clostridium*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus* e *Lactobacillus* (HOLZAPFEL & SCHILLINGER, 2002).

Nas últimas décadas, inúmeras definições surgiram para estabelecer o termo probióticos. Entretanto, a definição atual é que probióticos são: microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001). Já alimento probiótico, é um produto processado que contém microrganismos probióticos viáveis e em concentrações suficientes (SANDERS, 2003). Isto significa que a viabilidade e a atividade metabólica dos microrganismos devem ser mantidas em todas as etapas de processamento do alimento, desde a fabricação até a ingestão pelo consumidor, além de sobreviver às condições adversas do estômago colonizando o intestino, por um determinado período (SANZ, 2007).

No Brasil, em julho de 2008, a ANVISA atualizou a Lista de Alegações de Propriedade Funcional, visto que, até então não havia legislação que preconizasse a concentração mínima de microrganismo probiótico que um alimento deveria apresentar para ser considerado probiótico. Assim, a legislação diz que a quantidade mínima viável de cultura probiótica deve ser de 8 a 9 UFC g^{-1} ou mL^{-1} na porção diária do produto pronto para consumo, conforme indicação do fabricante (BRASIL, 2008). Estas altas concentrações são sugeridas para compensar a possível redução no número de organismos probióticos durante a passagem pelo estômago e intestino (SHAH, 2000).

Com a introdução de probióticos pela alimentação ou com o consumo de suplemento alimentar prebiótico, é possível estimular a multiplicação de bactérias benéficas através do mecanismo de “exclusão competitiva”, no qual os probióticos impedem a colonização de microrganismos potencialmente patogênicos por meio de competição e com produção de compostos antimicrobianos (GUARNER & MALAGELADA, 2003). Alguns dos principais efeitos benéficos para a saúde, relacionados ao consumo de probióticos, são: produção de enzimas digestivas como a β -galactosidase; redução do colesterol LDL (lipoproteína de baixa densidade); estimulação do sistema imune; aumento da motilidade do intestino, com conseqüente redução da constipação; aumento da resistência à colonização de patógenos no intestino; manutenção da integridade da mucosa; proteção contra alguns tumores cancerígenos; proteção adicional contra doenças coronárias (HOLZAPFEL & SCHILLINGER, 2002; MATILLA-SANDHOLM & SAARELA, 2003).

2.4.1 Uso de bactérias probióticas em produtos lácteos

Algumas espécies de bactérias dos gêneros *Lactobacillos* e *Bifidobacterium* são mais comumente empregadas como probióticos em produtos lácteos por sua comprovada atividade funcional. Estes gêneros de microrganismos são comuns no trato gastrointestinal de humanos saudáveis, encontrados principalmente e respectivamente, no íleo terminal e cólon (CHARTERIS et al., 1998; BIELECKA, BIEDRZYCKA & MAJKOWSKA, 2002). Recentemente, alguns pesquisadores têm classificado *Streptococcus thermophilus* como uma cultura probiótica, por atuar como fonte de lactase no intestino delgado, e ser capaz de sobreviver ao trânsito intestinal (DROUAULT, ANBA & CORTHER, 2002; MATER et al., 2005), apesar de não possuir origem na microbiota intestinal humana sadia (SHAH, 2003).

Produtos lácteos são considerados um veículo ideal para condução de bactérias probióticas no trato gastrointestinal (ROSS et al., 2002). Por isso muitos estudos em relação à viabilidade probiótica durante o armazenamento encontram-se voltados para leites fermentados e iogurte. No entanto, Gardiner et al. (1999) alegam que estes produtos podem não ser ideais para a manutenção de altas concentrações das culturas probióticas devido ao baixo pH. O teor de gordura, a concentração e tipo de proteínas, açúcares e pH do produto, bem como a matriz alimentar, são alguns fatores importantes que podem afetar o crescimento e a sobrevivência de probióticos em alimentos (KAILASAPATHY & CHIN, 2000; RANADHEERA, BAINES & ADANS., 2009).

Vários tipos de queijos revelaram-se apropriados como veículos para cepas probióticas de *Lactobacillus* e de *Bifidobacterium*, dentre eles destacam-se os queijos Cheddar (DINAKAR & MISTRY, 1994; GARDINER et al., 1998), Gouda (GOMES & MALCATA, 1998), *Cottage* (BLANCHETTE et al., 1996), Crescenza (GOBBETTI et al., 1998) e queijo fresco (ROY, MAINVILLE & MONDOU., 1997; VINDEROLA, BAILO & REINHEIMER, 2000). Contudo, alguns estudos indicam que o queijo fresco apresenta-se como mais adequado para a incorporação de bactérias probióticas por ser um queijo não maturado. Assim, a sobrevivência e a multiplicação destas bactérias estariam relacionadas ao menor tempo de armazenamento, ao menor teor de sal, ao teor de umidade e atividade da água (HELLER et al., 2003; BURITI, 2005).

Kasimoglu, Göncüoglu & Akgün (2004) testaram *Lactobacillus acidophilus* em queijo branco fresco, garantindo a viabilidade do probiótico durante o armazenamento e melhora nos atributos sensoriais. Fritzen-Freire et al. (2010) adicionaram *Bifidobacterium* Bb-12 em queijo Minas frescal preparado através de acidificação direta com ácido láctico e obtiveram um produto com grande potencial funcional durante 28 dias a 5 °C. Buriti et al. (2008) adicionaram inulina ao queijo fresco cremoso suplementado com cepa potencialmente probiótica de *Lactobacillus paracasei* e obtiveram um produto simbiótico com características sensoriais agradáveis. A administração conjunta de um probiótico com um prebiótico específico pode favorecer o desenvolvimento *in situ* dos probióticos, aumentando a sobrevivência e a implantação destes no trato digestivo (ROBERFROID, 1998; ZIEMER; GIBSON, 1998).

2.5 Influências do teor de lipídios dos queijos sobre a viabilidade de microrganismos probióticos

Atualmente, o consumidor tem procurado alimentos que contribuam para a diminuição de riscos a doenças crônico-degenerativas. Isso tem incentivado o desenvolvimento de queijos probióticos com reduzido teor de gordura e sódio (CRUZ et al., 2009). Nos últimos anos, foram desenvolvidos alguns estudos sobre queijos probióticos, e muitos destes estudos estão relacionados, principalmente, aos efeitos que a introdução de culturas probióticas pode causar em alguns tipos de queijos comerciais. No entanto, poucos trabalhos têm relacionado à

viabilidade de cepas probióticas com níveis de gordura e sal destes queijos (RYHÄNEN et al., 2001).

Comparado ao iogurte, a dificuldade do queijo servir como veículo para probióticos é a alta concentração de gordura e sal presentes, o que faz com que a recomendação diária de consumo seja baixa. Porém, isso não se aplica a queijos frescos, como o *cottage*, pois estes podem ser facilmente ajustados a baixos teores de gordura e sal. Assim, queijo fresco com baixa concentração de gordura é o lácteo mais adequado para servir de veículo para os microrganismos probióticos (HELLER et al., 2003). Segundo Drake & Swanson (1995), queijos com menores teores de gordura contém mais umidade e, como a temperatura de cocção geralmente é mais baixa, as bactérias probióticas desenvolvem-se em altas concentrações nestes queijos. No entanto, alguns autores afirmam que a matriz sólida dos queijos e uma maior concentração de gordura podem proteger os microrganismos durante sua passagem pelo trato digestivo (GARDIER et al., 1998; STATON et al., 1998; BERGAMINI et al., 2005).

Em face disso, Ryhänen, Pihlanto-Leppälä, e Pahkala (2001) estudaram o comportamento de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* sp. em queijo Festivo com a redução da gordura em aproximadamente 11%. Os pesquisadores observaram que as bactérias probióticas permaneceram viáveis por até sete meses, com populações acima de 6 UFC g^{-1} e, além disso, obtiveram características sensoriais aceitáveis. Mäkeläinen et al. (2009) em estudo com objetivo de investigar se a matriz sólida do queijo afetaria a sobrevivência de *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, observaram que estas culturas probióticas quando adicionadas ao queijo sobrevivem a simulação da digestão gastrointestinal humana, e o número de lactobacilos total aumenta nas simulações de fermentação do cólon. Assim, os queijos com baixo teor de gordura são ideais a adição de culturas probióticas, de modo a obter um produto classificado como alimento funcional (CRUZ et al., 2009).

3 MANUSCRITOS

3.1 Manuscrito 1

Manuscrito em fase final de revisão pelos autores para ser submetido à Revista Ciência Rural

(Configuração conforme as normas da Revista – Anexo D)

Aceitabilidade e caracterização de queijo *cottage* com diferentes teores de gordura e inulina

Acceptability and characterization of cottage cheese with different fat and inulin

Carline Gass Parodia^a

^a Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa

Maria, Av. Roraima, 1000, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil

RESUMO

Doze formulações de queijo *cottage* foram elaboradas com diferentes concentrações de gordura e inulina conforme planejadas através do delineamento central composto rotacional, com o objetivo de avaliar a aceitabilidade sensorial e as características físico-químicas deste produto. A avaliação sensorial foi realizada por 20 provadores semi-treinados utilizando o teste com escala hedônica (7 níveis) quanto aos atributos sensoriais de aparência geral, aroma, textura, acidez e sabor. Com os dados obtidos foram elaboradas as superfícies de resposta para estes atributos. Não foi detectada diferença estatística pelo teste de Tukey ($p > 0,05$) na avaliação por escala hedônica, mas as superfícies de resposta apontam diferentes regiões com tendência à melhor aceitação, variando cada região conforme o atributo analisado.

Palavras-chave: gordura; inulina; queijo *cottage*; análise sensorial.

ABSTRACT

Twelve treatments of cottage cheese were elaborated with fat and inulin concentration according to central composite design with objective of the evaluate acceptance sensorial and physicochemical characteristics of this product. The sensory analysis was performed by 20 semi-trained panelists using hedonic scale test (7 levels) as to global appearance, aroma, texture, acidity and taste. The surface plots of the same sensory parameters were obtained with the same data. No statistical difference was detected by Tukey's test ($p > 0.05$) in the hedonic scale test, but the surface plots suggest different areas with tendency to better acceptance, varying according to the sensory attribute.

Keywords: fat; inulin; cottage cheese; sensory analysis.

INTRODUÇÃO

Atualmente os produtos lácteos, principalmente os mais gordurosos, têm sido associados ao aumento das taxas de colesterol. Com isso, os consumidores, preocupados com a saúde e a forma física, têm buscado alimentos que apresentem benefícios múltiplos, associados a características sensoriais. Dentre estes alimentos, os lácteos funcionais vêm ganhando grande destaque, pois além da presença de nutrientes importantes, como cálcio, proteínas, ácido linoléico, vitaminas A e D, estes ainda contêm quantidades satisfatórias de microrganismos probióticos e outras substâncias benéficas a saúde.

O queijo fresco tem-se revelado um alimento funcional promissor, por ser um alimento versátil, pode ser facilmente ajustado a baixas concentrações de gordura e sal, além de permitir a adição de diversos ingredientes, incluindo fibras prebióticas como a inulina e

bactérias probióticas (HELLER et al., 2003; BURITI, 2005). Os probióticos são microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo, desde que a quantidade mínima ingerida seja de 6 a 7 UFC 100 g^{-1} ou 100 mL^{-1} de produto (GOMES & MALCATA, 1999), ou de 8 a 9 UFC g^{-1} ou mL^{-1} de produto (BRASIL, 2008). Dentre os microrganismos probióticos comumente estudados, destacam-se; *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri*), *Bifidobacterium* (*B. longum*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. animalis*), *Streptococcus* e *Enterococcus* (SCHEINBACH, 1998).

Para o aumento de microrganismos benéficos no trato digestivo, tem-se adicionado aos alimentos probióticos, os prebióticos, definidos como componentes alimentares que não são absorvidos nem degradados pelo trato gastrintestinal superior, mas são fermentados no intestino estimulando o desenvolvimento e/ou atividade de um número limitado de microrganismos no cólon, em especial *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, propiciando saúde ao hospedeiro (KIMURA, 2002). Um dos prebióticos mais utilizados na indústria de alimentos é a inulina, um carboidrato encontrado como material de reserva em algumas plantas. Além de seu potencial prebiótico, a inulina tem a habilidade de formar microcristais quando misturada em água ou leite. Estes microcristais interagem para formar uma textura finamente cremosa que promovem, na boca, uma sensação semelhante a da gordura (NINESS, 1999). Sendo assim, este prebiótico pode ser usado para substituir a gordura e reduzir o valor calórico dos alimentos.

Cottage é um tipo de queijo fresco, elaborado com leite pasteurizado desnatado. Ao *dressing*, líquido cremoso misturado a massa de queijo, pode ser adicionado diversos ingredientes. Por ter baixo teor de gordura (0 a 4%) e sabor semelhante ao queijo minas frescal, o queijo *cottage* tem conquistado espaço no mercado queijeiro brasileiro. Contudo, alguns parâmetros sensoriais podem ser afetados devido às variações no teor de gordura e

inulina. Assim, objetivou-se verificar a aceitabilidade sensorial e as características físico-químicas de queijo *cottage* probiótico com diferentes concentrações de gordura e inulina.

MATERIAL E MÉTODOS

Elaboração do queijo cottage

Para o preparo das 12 formulações de queijo *cottage* com diferentes teores de gordura e inulina (T1 a T12), seguiu-se a técnica descrita por SOUZA (1986) com alteração no preparo do *dressing*. Os queijos foram elaborados em quatro blocos, um para cada sessão sensorial. Em tanque para queijos utilizou-se 20 litros de leite pasteurizado desnatado (0,02% de gordura) aquecido a 32 °C, adicionados 0,25% (v/v) de coalho líquido comercial (Ha-La®, Chr. Hansen, Valinhos, SP) e 5% (p/v) de cultura *starter* mesofílica DVS (mistura de *Lactococcus lactis subsp. lactis e Lactococcus lactis subsp. cremoris*) (Chr. Hansen, Dinamarca). A fermentação ocorreu por aproximadamente 1h; após, o coágulo foi cortado e aqueceu-se lentamente a massa coalhada (durante 1 hora até a temperatura atingir 54 °C) em banho-maria e com a substituição de 15% (em relação ao volume inicial de leite) do soro liberado por água potável a 80 °C. Posteriormente, a coalhada foi dessorada e lavada por três vezes com água potável a 1 °C para o resfriamento da massa; em seguida foi feita a drenagem da coalhada em dessorador de queijos e mantida em refrigeração a 4 ± 1 °C por aproximadamente 45 minutos. Após a pesagem da coalhada, o volume total foi dividido em quatro porções de mesmo peso (600 g cada), sendo destinada uma porção para cada tratamento do bloco. Em seguida, foi preparado o *dressing* (líquido cremoso) utilizando-se creme de leite pasteurizado adicionando-se leite desnatado UHT para padronizar o teor de gordura (calculada através do Quadrado de Pearson) de acordo com cada formulação (Tabela 1). A este foram misturados os demais ingredientes: 1,5% (p/p) de sal de cozinha (Salsul®,

Rio Grande, RS); 0,15% (p/p) de sorbato de potássio; 1% de culturas superconcentradas de *Streptococcus termophilus*, *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium* Bb-12 (Bio Rich®, Chr. Hansen, Dinamarca), em concentrações iguais para todos os tratamentos. As concentrações de inulina (Raftline®, Orafti, Bélgica) foram adicionadas a cada tratamento de acordo com a Tabela 1, assim como o teor de gordura do *dressing*. Para preparo da cultura-mãe dos microrganismos probióticos, 5 g da cultura foram diluídos em 30 mL de leite UHT divididos em alíquotas de 1 mL. Os queijos foram acondicionados em embalagens plásticas de 250 g, e mantidos sob refrigeração a 4 ± 1 °C.

Análises físico-químicas

A composição físico-química dos queijos foi determinada em triplicata. A umidade foi determinada em 5 g de amostra por secagem, em estufa a 105 °C, até peso constante; o teor de cinzas foi obtido por gravimetria pelo aquecimento de 2 g de amostra isenta de umidade em mufla a 550 °C até completa incineração (AOAC, 2005). Para obtenção da fração protéica foi utilizado o método de Kjeldahl (fator de correção de 6,38); a porcentagem de lipídios foi determinada através do método butirométrico para queijos em butirômetro de leite; o teor de cloretos foi determinado através do método argentométrico (BRASIL, 2006). A acidez titulável (expressa em porcentagem de ácido láctico) foi obtida por titulação com NaOH 0,1N (AOAC, 2005).

Análise sensorial

A caracterização sensorial do queijo *cottage* realizou-se em quatro sessões sensoriais de três tratamentos cada, sempre contendo uma formulação do ponto central. A análise foi conduzida segundo o delineamento de blocos ao acaso com 20 provadores semi-treinados,

empregando-se o teste de escala hedônica de 7 níveis (1- desgostei muitíssimo, 4-indiferente, 7- gostei muitíssimo). Os atributos sensoriais analisados foram: aparência global, aroma, textura, acidez e sabor (DUTCOSKY, 1996).

Planejamento experimental e análise estatística

As formulações foram planejadas de acordo com o delineamento Composto Central Rotacional (BOX et al., 1978), sendo a concentração de gordura (X1) e de inulina (X2) os fatores independentes (Tabela 1). As variáveis dependentes (Y) foram os atributos sensoriais (aroma, acidez, sabor, aparência global e textura) cujas superfícies de resposta foram geradas a partir das médias das notas de cada atributo. Os tratamentos foram numerados de 1 a 12 (Tabela 1), sendo os tratamentos T5, T6, T11 e T12 as repetições do ponto central (RODRIGUES & IEMMA, 2005). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de significância. A variável resposta (Y) foi a média das notas de cada atributo sensorial. A Regressão Linear Múltipla (RLM) foi usada para obter os termos linear, quadrático e de interação do modelo matemático abaixo (Equação 1):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_1^2 + \beta_4 X_2^2 + \beta_5 X_1 X_2 \text{ (Equação 1)}$$

Onde somente os termos com significância acima de 95% foram considerados significativos. As superfícies de resposta foram obtidas utilizando o pacote estatístico Statistica® 6.0 for Windows.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Composição físico-química

Atualmente, a legislação brasileira não dispõe de padrões de identidade e qualidade específicos para queijo tipo *cottage*. No entanto, os dados obtidos da composição físico-química de todas as amostras elaboradas assemelham-se aos encontrados por outros autores (BLANCHETTE et al., 1996; FARKYE, 2004; FRANCISQUETI et al., 2009) e as amostras comerciais (Tabela 2). Os valores de acidez titulável ($0,62\% \pm 0,29$ a $0,81\% \pm 0,20$) e proteína ($11,39\% \pm 0,53$ a $13,17\% \pm 0,22$) são similares aos encontrados por FRANCISQUETI et al. (2009) em estudo com queijo *cottage* produzido por método tradicional e enzimático. O teor de gordura das formulações variou de $0,42\% (\pm 0,01)$ a $0,60\% (\pm 0,32)$, valores semelhantes aos relatados por FARKYE (2004) para o mesmo produto. O teor de cloretos variou de $0,97\% (\pm 0,005)$ a $1,08\% (\pm 0,005)$, enquanto que a composição média relatada por BLANCHETTE et al. (1996) para o mesmo produto foi de $0,65\%$ a $0,73\%$. Muitos autores descrevem que a concentração de sal de cozinha adicionada ao queijo *cottage* pode ser entre $0,6\%$ a $3,0\%$ (p/p); neste estudo optou-se por um valor intermediário ($1,5\%$) a fim de não afetar a aceitação sensorial pelos painelistas.

Os teores de umidade ($72,40\% \pm 0,29$ a $76,05\% \pm 0,13$), e cinzas ($2,30\% \pm 0,06$ a $2,58\% \pm 0,06$) são superiores aos encontrados por FRANCISQUETI et al. (2009) para queijo *cottage* produzido por método semelhante a este estudo. Devido à maior concentração de inulina, observa-se que o queijo T8 ($1,7\%$ de inulina e 16% de gordura) apresentou menor valor de cinzas quando comparado com T10 ($0,3\%$ de inulina e 16% de gordura). Em geral, as diferenças significativas ($p < 0,05$) observadas entre as formulações devem-se a diferentes teores de inulina e gordura, já que, de acordo com ONG et al. (2006), o uso de bactérias probióticas não modifica a composição dos queijos.

Avaliação sensorial

Através dos resultados das médias das notas de cada parâmetro sensorial avaliado (dados não mostrados), não foi detectada diferença significativa entre os níveis de gordura e inulina dos tratamentos pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). O intercepto (β_0) do modelo de regressão múltipla (dados não mostrados), da concentração de gordura e inulina foi significativo ($p < 0,05$) para todas as variáveis dependentes, e apenas o termo linear (β_1) da concentração de gordura (X_1) para o atributo aroma foi significativo ($\beta_1 X_1 = 0,40$; $p < 0,05$). Apesar disso, ao plotar o gráfico (Figura 1) de superfície de resposta para as mesmas médias verifica-se diferentes interações entre os fatores e os parâmetros sensoriais.

A superfície de resposta para o parâmetro aroma (Figura 1a) aponta uma tendência de melhor aceitação para as formulações com 22% de gordura e com 0,3% a 1% de inulina. Sabe-se que, os principais fatores determinantes para o aroma dos queijos é o teor de lipídios, que serve como substrato de várias reações bioquímicas responsáveis pela formação de compostos aromáticos, como também os microrganismos presentes nesses queijos (SAINT-EVE et al., 2009). DRUNKLER (2009) observou que o aumento na concentração de inulina apresentou efeito negativo sobre o aroma de requeijão cremoso simbiótico.

Para o atributo acidez (Figura 1b) o gráfico revela duas regiões distintas com tendência de melhor aceitação, uma com níveis de inulina a 0,3% e gordura a 10%; e outra com concentração de 1,7% de prebiótico e gordura na faixa de 22%. VINDEROLA et al. (2000) afirmam que o teor reduzido de gordura favorece a multiplicação e sobrevivência de bactérias próbióticas. E o incremento destes microrganismos geralmente deixa os queijos mais ácidos e com sabores mais amargos, pois causam mudanças químicas específicas, liberando compostos voláteis com grupamento carbonil, como ácido lático e acético, acetaldeído, cetonas e diacetil (BERGAMINI et al., 2005; TAMIME & ROBINSON, 2007). Por outro lado, a combinação de níveis mais elevados destas variáveis está de acordo com

CARDARELLI et al. (2008), que afirmam que a inulina, em queijo *petit-suisse*, é capaz de interferir na percepção da acidez. Apesar disso, neste estudo, os queijos elaborados com menor e maior concentração de gordura e prebiótico mostraram a mesma tendência de aceitação tanto para o sabor, como para a acidez.

Na avaliação do sabor (Figura 1c), igualmente o gráfico revela duas regiões distintas com tendência de melhor aceitação, uma com níveis de inulina a 0,3% e gordura a 10%; e outra com concentração de 1,7% de prebiótico e gordura na faixa de 22%. DEVEREUX et al. (2003) afirmam que a percepção do sabor é abrandada em alimentos com menor teor de gordura, quando comparados aos seus similares sem a redução do teor lipídico. Isso ocorre devido à ausência de alguns compostos lipossolúveis que são liberados durante a mastigação e que contribuem para o sabor geral do alimento (SBAMPATO et al., 2000; DEVEREUX et al., 2003).

Para a aparência global (Figura 1d), as maiores notas concentram-se na faixa de 22% de gordura e 1,5% a 1,7% de inulina. É esperado que, tanto a inulina quanto a gordura, promovam corpo aos derivados lácteos. Segundo KIP et al. (2006), a inulina, mesmo em baixas concentrações, é capaz de interferir no aspecto do produto, melhorando a cremosidade e viscosidade. No caso do queijo *cottage*, as altas concentrações de gordura e inulina contribuíram para melhorar a aparência global.

O diagrama do atributo textura (Figura 1e) indica que as menores concentrações de prebiótico e lipídios tenderam a melhor aceitação, oposto ao relatado por BURITI et al. (2008) para queijo cremoso simbiótico. Já KOCA & METIN (2004) verificaram redução da firmeza de queijo Kashar com baixo teor de gordura adicionado de inulina durante 90 dias de armazenamento. Contudo, a menor concentração de lipídios pode ter favorecido o desenvolvimento dos probióticos proteolíticos, melhorando, assim, a textura do queijo, pois a hidrólise da caseína pode ser responsável pelo abrandamento da textura em queijos (ONG et al., 2007).

CONCLUSÃO

A adição de diferentes concentrações de gordura e inulina, neste produto, não afetaram significativamente ($p > 0,05$) a percepção sensorial dos provadores. No entanto, os gráficos de superfície de resposta para cada parâmetro sensorial avaliado mostraram áreas de interação entre alguns níveis das variáveis que indicam maior aceitação. Deste modo, pode-se reduzir a concentração de gordura e variar o teor de inulina no queijo *cottage*, aos níveis estudados, sem afetar a aceitação do produto.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Usina Escola de Laticínios (UNI-UFSM) pelo fornecimento das culturas lácticas utilizadas na elaboração do produto e apoio técnico durante a elaboração deste estudo; à Clariant-Brasil pela doação de inulina e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

COMITÊ DE ÉTICA

A avaliação sensorial deste trabalho foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM. Número do protocolo: 0234.0243.000-09.

REFERÊNCIAS

AOAC. **Official methods of analysis of AOAC**. 18th. ed. Washington: Association of Official Analytical Chemistry, 2005.

- BERGAMINI, C.V. et al. Probiotic bacteria as adjunct starters: influence of addition methodology on their survival in a semi-hard Argentinian cheese. **Food Research. International**, v. 38, n. 5, p. 597-604, 2005.
- BLANCHETTE, L. et al. Production of cottage cheese using dressing fermented by bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 1, p. 8-15, 1996.
- BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. **Statistics for experimenters: an introduction to design data analysis and model building**. New York: Wiley, 1978. 653p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006 (D. O. U. 14/ 12/ 2006)**. Dispõe dos Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos**. IX - Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas, 2008. Disponível em: http://www.ANVISA.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em 07 jan. 2010.
- BURITI, F.C.A.; ROCHA, J.S.; SAAD, S.M.I. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 38, p. 173-180, 2005.
- BURITI, F.C.A. et al. Textura instrumental e avaliação sensorial de queijo fresco simbiótico: implicações da adição de *Lactobacillus paracasei* e inulina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 1, p. 75-84, 2008.
- CARDARELLI, H.R. et al. Inulin and oligofrutose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially symbiotic petit-suisse cheese. **LWT- Food Science and Technology**, v. 41, n. 6, p. 1037-1046, 2008.

- CHR. HANSEN. Method for counting probiotic bacteria. *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacteria* in milk products made with nutrish cultures. Horsholm, Dinamarca, 1999. 9p. [Guideline].
- DEVEREUX, H.M. et al. Consumer acceptability of low fat foods containing inulin and oligofructose. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 5, p. 1850-1854, 2003.
- DRUNKLER, D.A. **Produção de requeijão simbiótico**. 2009. 180p. Tese (Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná (UFPR).
- DUTCOSKI, S.D. **Análise sensorial de alimentos**. Curitiba: Champagnat, 1996. 122p.
- FARKYE, N.Y. Cheese technology. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, n. 2/3, p. 91-98, may./ aug. 2004.
- FRANCISQUETI, F.V.; BRAGA, C.P.; GOMES, M.I.F.V. Diferenças nutricionais entre queijos *cottage* produzidos por método tradicional e enzimático, avaliação da preferência e ingestão média de leite e derivados por parcela da população. **Revista simbio-logias**, v. 2, n. 1, p. 102-113, mai. 2009.
- GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, Oxford, v. 10 n. 4/5, p. 139-157, 1999.
- HELLER, K.J. et al. Cheese and its potential as a probiotic food. In: FARNWORTH, E.R., (Ed.). **Handbook of fermented functional foods**. Boca Raton: CRC Press, 2003. p. 203-225.
- KIMURA, Y.O. Alimentos simbióticos. **Revista Indústria de Laticínios**, São Paulo, n. 40, p. 22-23, jul./ ago. 2002.
- KIP, P. et al. Inulins improve sensoric and textural properties of low-fat yoghurts. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 9, p. 1098-1103, 2006.
- KOCA, N.; METIN, M. Textural, melting and sensory properties of low-fat fresh kashar cheeses produced by using fat replacers. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 365-373, 2004.

NINESS, K.R. Nutritional and health benefits of inulin and oligofructose. **Journal of Nutrition**, Wallingford, n. 129, p. 1402-1406, 1999.

ONG, L. et al. 2006. Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *L. Casei*, *L. paracasei* and *Bifidobacterium* spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 446–456.

ONG, L.; HENRIKSSON, A.; SHAH, N.P. Chemical analysis and sensory evaluation of Cheddar cheese produced with *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* or *Bifidobacterium* sp. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 8, p. 937-345, 2007.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 1. ed. Campinas: Casa do Pão Editora, 2005.

SAINT-EVE, A. et al. Reducing salt and fat content: Impact of composition, texture and cognitive interactions on the perception of flavoured model cheeses. **Food Chemistry**, v. 116, n. 1, p. 167-175, 2009.

SBAMPATO, C.G.; ABREU, L.R.; FURTADO, M.M. Queijo gorgonzola fabricado com leite pasteurizado por ejetor de vapor e HTST: Parâmetros físico-químicos e sensoriais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 1, p. 191-200, 2000.

SCHEINBACH, S. Probiotics: functionality and commercial status. **Biotechnology Advanced**, v. 16, n. 3, p. 581-608, 1998.

SOUZA, G. **Tecnologia do queijo cottage por processo modificado**. Instruções técnicas, n. 21. São Paulo: ITAL, 1986. 37p.

TAMIME, A.Y.; ROBINSON, R.K. **Tamime and Robinson's yoghurt: science and technology**. 3. ed. Cambridge: CRC, 2007. 791p.

VINDEROLA, C.G. et al. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian fresco cheese. **Journal Dairy Science**, v. 83, n. 9, p. 1905-1911, 2000.

Tabela 1 - Delineamento experimental para formulação de queijo *cottage* probiótico com diferentes teores de gordura e inulina.

Tratamento	Variáveis codificadas		Variáveis reais	
	X_1^*	X_2^{**}	X_1^*	X_2^{**}
1	-1	-1	12	0,5
2	-1	1	12	1,5
3	1	-1	20	0,5
4	1	1	20	1,5
5	0	0	16	1,0
6	0	0	16	1,0
7	1,414	0	22	1,0
8	0	1,414	16	1,7
9	-1,414	0	10	1,0
10	0	-1,414	16	0,3
11	0	0	16	1,0
12	0	0	16	1,0

Variáveis Independentes	Níveis codificados				
	-1,414	-1	0	1	1,414
X_1^* (%)	10	12	16	20	22
X_2^{**} (%)	0,3	0,5	1,0	1,5	1,7

* X_1 = teor de gordura (%).

** X_2 = teor de inulina (%).

Tabela 2 – Composição físico-química de queijo *cottage* comercial e queijos *cottage* probióticos com diferentes concentrações de gordura e inulina armazenados a 4 ± 1 °C.

Amostra	Acidez*	Cloretos*	Umidade*	Gordura*	Proteína*	Cinzas*
T1	0,62±0,05 ^A	1,08±0,005 ^A	75,19±0,29 ^{BC}	0,46±0,016 ^{EF}	13,14±0,02 ^A	2,58±0,06 ^A
T2	0,66±0,21 ^A	1,04±0,02 ^{ABC}	74,72±0,27 ^{BC}	0,42±0,009 ^F	11,39±0,53 ^D	2,46±0,01 ^{AB}
T3	0,62±0,26 ^A	1,02±0,01 ^{BCD}	75,02±0,12 ^{BC}	0,46±0,033 ^{EF}	11,57±0,05 ^{CD}	2,40±0,00 ^{BC}
T4	0,64±0,21 ^A	0,97±0,005 ^D	75,21±1,70 ^B	0,58±0,019 ^{BC}	11,61±0,02 ^{CD}	2,30±0,06 ^C
T5	0,81±0,21 ^A	1,05±0,01 ^{ABC}	73,94±0,29 ^C	0,54±0,009 ^{CD}	12,16±0,36 ^{BCD}	2,45±0,05 ^B
T6	0,82±0,20 ^A	1,05±0,01 ^{ABC}	73,96±0,30 ^C	0,54±0,009 ^{CD}	12,19±0,35 ^{BCD}	2,43±0,04 ^B
T7	0,67±0,25 ^A	1,07±0,02 ^{AB}	72,40±0,29 ^D	0,60±0,032 ^B	13,17±0,22 ^A	2,56±0,05 ^B
T8	0,70±0,33 ^A	1,00±0,005 ^{CD}	75,25±0,07 ^{BC}	0,52±0,037 ^{DE}	12,42±0,31 ^{ABC}	2,33±0,02 ^C
T9	0,71±0,26 ^A	1,04±0,005 ^{ABC}	76,05±0,13 ^B	0,47±0,022 ^{DEF}	12,64±0,06 ^{AB}	2,41±0,01 ^{BC}
T10	0,75±0,27 ^A	1,02±0,03 ^{BCD}	75,13±0,14 ^{BC}	0,46±0,006 ^{DEF}	12,27±0,03 ^{ABCD}	2,50±0,03 ^{AB}
T11	0,80±0,19 ^A	1,05±0,01 ^{ABC}	73,96±0,30 ^C	0,54±0,009 ^{CD}	12,16±0,36 ^{BCD}	2,45±0,04 ^B
T12	0,79±0,20 ^A	1,05±0,01 ^{ABC}	73,96±0,230 ^C	0,54±0,009 ^{CD}	12,20±0,35 ^{BCD}	2,44±0,04 ^B
C	0,39±0,002 ^B	0,55±0,041 ^E	81,1±0,07 ^A	3,90±0,05 ^A	11,42±0,61 ^D	1,17±0,01 ^D

* Médias (n= 3) e respectivos desvios padrões de resultados expressos em g 100 g⁻¹ de amostra.

^{A, B} Letras sobrescritas diferentes em cada coluna indicam diferenças significativas (p< 0,05).

C – Amostra comercial.

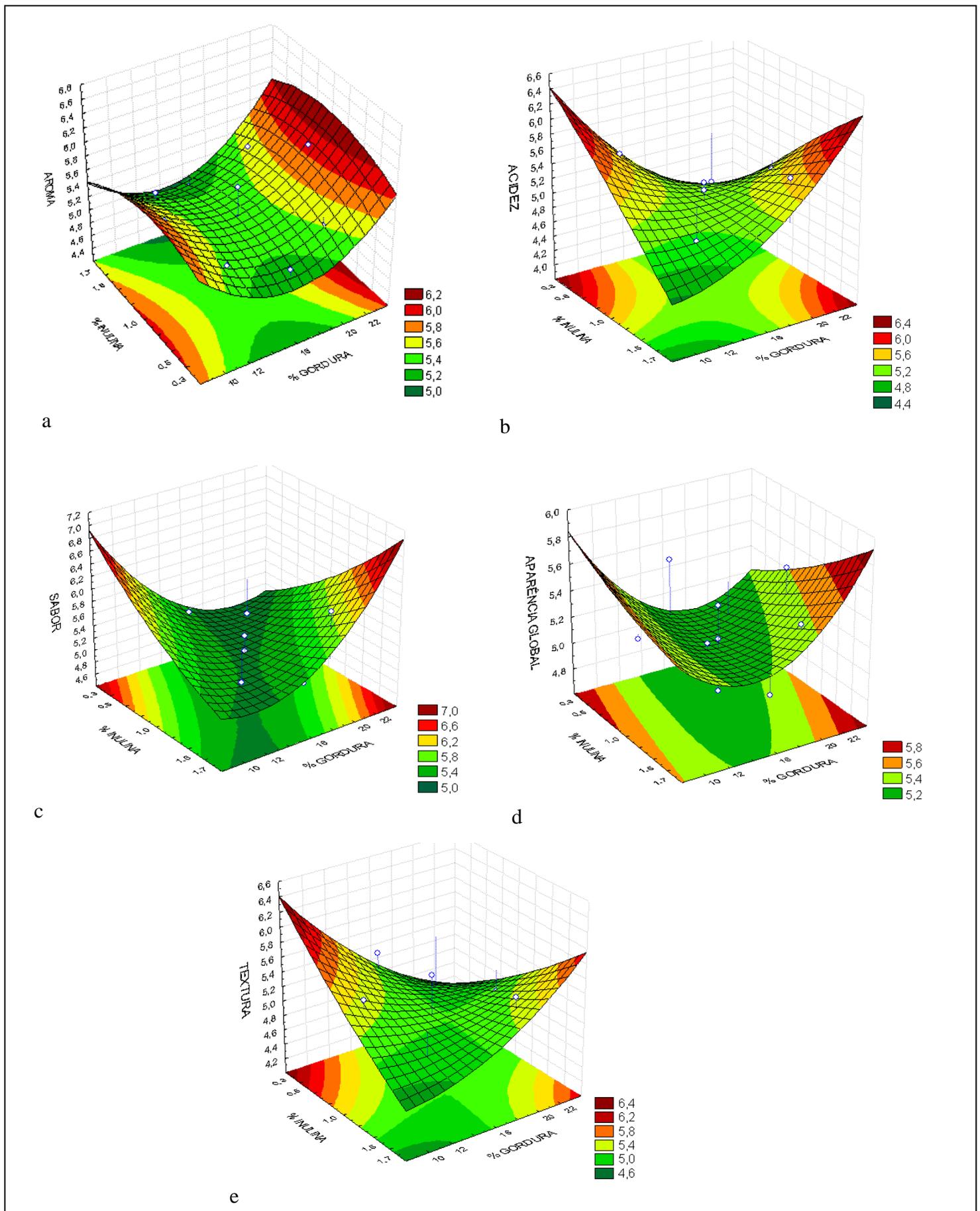


Figura 1- Superfície de resposta para avaliação sensorial de queijo *cottage* probiótico com diferentes teores de gordura e inulina. (a) aroma; (b) acidez; (c) sabor; (d) aparência global; (e) textura.

3.2 Manuscrito 2

Manuscrito em fase final de revisão pelos autores para ser submetido à International Dairy

Journal

(Configuração conforme as normas da Revista – Anexo E)

Influência de diferentes concentrações de gordura e inulina nas propriedades funcionais de queijo *cottage* suplementado com *Streptococcus termophilus*, *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium* Bb -12

Carline Gass Parodia^a

^a *Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa*

Maria, Av. Roraima, 1000, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil

Resumo

O objetivo deste estudo foi de investigar a influência de diferentes concentrações de gordura e de prebiótico (inulina) sobre as características físico-químicas e de viabilidade das culturas probióticas (*Streptococcus termophilus*, *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium* Bb-12) adicionadas em queijos *cottage* durante o armazenamento por 21 dias a 4 ± 1 °C. O delineamento central composto rotacional foi adotado, totalizando doze tratamentos. Apenas o termo linear ($p < 0,05$) da concentração de gordura e inulina influenciou na acidez titulável e pH durante o armazenamento. *S. termophilus* apresentou alta viabilidade para todos os tratamentos (mínimo 7 UFC g⁻¹ e máximo 7,91 UFC g⁻¹). As culturas probióticas de *Lactobacillus acidophilus* (8,12 a 8,87 UFC g⁻¹) e *Bifidobacterium animalis* (7,78 a 8,81 UFC g⁻¹) mantiveram-se acima de 7 UFC g⁻¹ em todas as formulações durante o período de armazenagem. A viabilidade dos probióticos foi atribuída às

características de umidade, acidez titulável, pH e quantidade de substrato disponível para a fermentação e desenvolvimento das funções metabólicas destes microrganismos. Os queijos *cottage* elaborados nas condições deste estudo podem ser considerados funcionais.

Palavras-chave: queijo fresco, alimento funcional, *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus acidophilus*.

1. Introdução

Os consumidores estão cada vez mais atentos a estreita relação existente entre a saúde e a alimentação, buscando produtos que ofereçam benefícios à saúde aliados a baixos teores de gordura e valor calórico, e com sabor agradável (Oliveira et al., 2009). Em consequência disso, o setor lácteo tem investido em pesquisas relacionadas à incorporação de microrganismos probióticos e ingredientes prebióticos em produtos derivados de leite, a fim de aumentar o apelo nutricional destes.

As culturas probióticas são definidas como microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro pelo alívio de sintomas de intolerância à lactose, tratamento da diarreia, redução da taxa de colesterol no sangue, aumento da absorção de cálcio, da síntese de vitaminas (principalmente do complexo B e folato) e prevenção de alguns tumores (Sanders, 2003; Shortt e O'Brien, 2004; Shah, 2007). O consumo de bactérias probióticas a uma concentração acima de 7 UFC g⁻¹ ou mL⁻¹ de produto, é necessário para conferir efeitos terapêuticos. Isto significa que a atividade metabólica destes microrganismos deve ser mantida em todas as etapas operacionais do processamento do alimento, desde a fabricação até a ingestão pelo consumidor, além de sobreviver no trato gastrointestinal (Sanz, 2007).

Os principais microrganismos probióticos empregados em alimentos pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Shortt e O'Brien, 2004). Vários fatores podem afetar a multiplicação e viabilidade destas culturas, como a presença de oxigênio, peróxido de hidrogênio, quantidade excessiva de ácidos orgânicos e quantidade suficiente de substrato para desenvolvimento de suas funções metabólicas (Uysal et al., 2003; Boylston et al., 2004; Akalin, Fenderya e Akbulut, 2004). Com isso, a adição de prebióticos, como a inulina e as oligofruoses, tem-se destacado pelo fato de estimular seletivamente o crescimento dos probióticos. Deste modo, quando existe uma associação de um prebiótico com *Bifidobacterium* e/ou *Lactobacillus*, nas concentrações adequadas, em um mesmo produto, este permitirá um efeito simbiótico (Uysal et al., 2003; Boylston et al., 2004).

O queijo fresco é o produto mais adequado como veículo para estes microrganismos, quando comparados aos demais tipos de queijos, pois a alta umidade e sua curta vida-de-prateleira beneficiam a sobrevivência das culturas, além de permitir ajustes em sua formulação (Vinderola, et al., 2000; Buriti, Rocha e Saad, 2005). Segundo Drake e Swanson (1995), os queijos com baixos teores de gordura mostram-se mais apropriados ao desenvolvimento de probióticos, em razão de possuírem maior teor de umidade e elaboração com baixas temperaturas de cocção.

O queijo *cottage*, por ser um tipo de queijo fresco elaborado com leite pasteurizado desnatado, possui baixo teor de gordura e permite inúmeras combinações. Ao *dressing*, podem ser adicionadas diversas substâncias, além de apresentar características desejáveis à adição de inulina e culturas probióticas o teor de gordura pode ser padronizado.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes teores de gordura e inulina no queijo *cottage* sobre a viabilidade das culturas de *Lactobacillus acidophilus* La-5, *Bifidobacterium* Bb-12 e *S. thermophilus*, durante 21 dias de armazenamento a 4 ± 1 °C.

2. Materiais e Métodos

2.1. Elaboração do queijo cottage

A elaboração do queijo *cottage* foi realizada segundo a técnica descrita por Souza (1986) com adaptações no preparo do *dressing*. Foram preparadas doze formulações de queijo *cottage* com diferentes teores de gordura e inulina (T1 a T12) em duplicata. Em tanque para queijos, utilizou-se 20 litros de leite pasteurizado desnatado (0,02% de gordura) aquecido a 32 °C, adicionados 0,25% (v/v) de coalho líquido comercial (Ha-La®, Chr. Hansen, Valinhos, SP) e 5% (p/v) cultura *starter* mesofílica DVS (mistura de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) (Chr. Hansen, Dinamarca). A fermentação ocorreu por aproximadamente 1h; após, o coágulo foi cortado e aqueceu-se lentamente a massa coalhada (durante 1 hora até a temperatura atingir 54 °C) em banho-maria e com a substituição de 15% (em relação ao volume inicial de leite) do soro liberado por água a 80 °C. Posteriormente a coalhada foi dessorada e lavada por três vezes com água a 1 °C para o resfriamento da massa; em seguida foi feita a drenagem da coalhada em dessorador de queijos e mantida em refrigeração a 4 ± 1 °C por aproximadamente 45 minutos. Cada duplicata de massa coalhada foi dividida em doze porções, uma para cada tratamento (Tabela 1). Em seguida, foi preparado o *dressing* (líquido cremoso), em duplicata, utilizando-se creme de leite pasteurizado adicionando de leite desnatado UHT para padronizar o teor de gordura (calculada através do Quadrado de Pearson) de acordo com cada formulação (Tabela 1). A cada duplicata do *dressing* foram misturados os demais ingredientes: 1,5% (p/p) de sal de cozinha (Salsul®, Rio Grande, RS); 0,15% (p/p) de sorbato de potássio; 1% de culturas superconcentradas de *Lactobacillus acidophilus* La-5, *Bifidobacterium* Bb-12 e *S. thermophilus* (BioRich®, Chr. Hansen, Dinamarca), em concentrações iguais para todos os tratamentos. As concentrações de inulina (Raftline®, Orafti, Bélgica) foram adicionadas a

cada tratamento de acordo com a Tabela 1, assim como o teor de gordura do *dressing*. Os queijos foram acondicionados em embalagens plásticas de 150 g, e mantidos sob refrigeração a 4 ± 1 °C durante 21 dias.

2.2. Análise físico-química dos queijos cottage

A caracterização físico-química (gordura, proteína, umidade e cinzas) dos queijos *cottage* foi realizada em triplicata. Para determinação do teor de gordura, foi utilizado o butirômetro de Gerber. A proteína foi estimada pelo método de Kjeldahl utilizando o fator de correção de 6,38 (Brasil, 2006). A umidade foi obtida por secagem de 5 g de amostra em estufa a 105 °C, até peso constante, e o teor de cinzas determinado por gravimetria pelo aquecimento de 2 g de amostra isenta de umidade em mufla a 550 °C até completa incineração (AOAC, 2005). A acidez titulável (% de ácido láctico) foi determinada de acordo com a AOAC (2005) e os valores de pH foram determinados com pHmetro digital (Digimed DM3020, SP Labor, Presidente Prudente, SP, Brasil) (AOAC, 2005) previamente calibrado. As análises de acidez titulável e pH foram realizadas semanalmente em triplicata, para que pudesse ser feita uma comparação com a viabilidade das culturas neste período.

2.3. Extração e esterificação da gordura

A extração e esterificação da gordura do queijo *cottage* foram realizadas em triplicata. Adotou-se o método proposto por Bligh e Dyer (1959), corrigindo a proporção de água conforme a umidade de cada tratamento de queijo *cottage*. Foram utilizadas 5 g de amostra. Metil-ésteres de ácidos graxos foram preparados com NaOH / metanol (1,5 mL, 0,5 N) em banho-maria a 100 °C durante 5 minutos. Após o resfriamento a temperatura ambiente, foram adicionados 2 mL de BF₃, seguido de incubação a 100 °C por 30 min. Depois de frio, foram

realizadas duas extrações com isooctano (2 x 1mL), passando a fase superior para outro tubo. O isooctano foi então evaporado em nitrogênio gasoso e hexano grau cromatográfico (1 mL) foi adicionado à gordura esterificada como solvente.

2.4. Perfil de ácidos graxos

Os metil-ésteres de ácidos graxos foram separados por cromatografia gasosa (CG) usando aparelho Agilent Technologies, série 6890N, equipado com coluna capilar (HP Innowax) de sílica fundida (30 m de comprimento x 250 µm diâmetro interno x 0,25 µm de espessura do filme) e detector por ionização de chama (FID). A coluna foi aquecida a 120 °C, após aumentou-se 20 °C por minuto até atingir 250 °C, por 13,5 minutos, totalizando a corrida em 20 minutos. Nitrogênio foi usado como gás de arraste a 0,9 mL min⁻¹. O volume de amostra injetada (modo split) foi de 1 µL. A temperatura usada para o detector (FID) foi de 280 °C. Os ácidos graxos foram identificados por comparação com os tempos de retenção de padrões de referência (Supelco 37 FAME Mix, Sigma, Bellefonte, EUA). Os tempos de retenção e as áreas foram computados automaticamente pelo software GC Solution.

No queijo *cottage* probiótico foram identificados os ácidos graxos saturados (C6:0, C8:0, C10:0, C11:0, C12:0, C13:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0), monoinsaturados (C14:1, C15:1, C16:1, C17:1, C18:1n-9) e poliinsaturados (C18:2n-6, C18:3n-3).

2.5. Análise microbiológica dos queijos *cottage*

A viabilidade dos microrganismos foi avaliada semanalmente durante 21 dias. Todas as análises foram realizadas em duplicata, segundo métodos oficiais. A enumeração de células viáveis das culturas de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis* foi determinada em uma alíquota de 1 mL pela técnica *pour plate*.

Para *S. thermophilus*, utilizou-se o meio M 17 ágar (Fluka Biochemika, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Suíça) e adição de 5% de solução de lactose a 10%, seguida de incubação aeróbica a 37 °C/ 48 horas (IDF, 1997). Para a contagem de *L. acidophilus* foi utilizado o meio MRS-ágar (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia) com 10% de solução de maltose 20% (IDF, 1999). *Bifidobacterium animalis* foi enumerada utilizando MRS-ágar (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia) com adição de 100 mL de solução de glicose a 20%, 5 mL de solução de dicloxacilina a 0,01%, 10 mL de solução de cloreto de lítio a 11,11% e 5 mL de solução de cloreto de cisteína a 10% para cada 1000 mL de meio de cultura. Posterior a inoculação, as placas foram incubadas invertidas em jarras contendo gerador de anaerobiose Anaerobac (Probac) a 37 °C por 72 horas (Chr, Hansen, 1999).

2.6. Delineamento experimental e análise estatística

As diferentes preparações de queijo *cottage* foram elaboradas com variação nas concentrações de gordura (X1) e inulina (X2), adicionados ao *dressing* do queijo *cottage* de acordo com o Delineamento Central Composto Rotacional (Box, Hunter e Hunter, 1978). O total de formulações foi 12 (T1 a T12), onde T5, T6 T11 e T12 representam as formulações do ponto central (Rodrigues e Iemma, 2005).

As variáveis dependentes (Y) foram acidez (% ácido láctico) e pH, cujas superfícies de resposta foram geradas a partir das médias entre os dias de análise (1, 7, 14 e 21 dias). Os coeficientes de regressão para os termos linear, quadrático e de interação foram determinados pelo uso de regressão linear múltipla, sendo considerados significativos quando $p < 0,05$.

Os dados foram tratados por análise de variância (ANOVA) e as diferenças estatísticas obtidas pelo Teste de Tukey a 5% de significância. Todos os cálculos e gráficos foram gerados utilizando-se o pacote estatístico Statistica 6.0 for Windows.

3. Resultados e Discussão

3.1. Avaliação da acidez titulável e pH

A Figura 1 mostra a média dos dados de acidez titulável e pH dos queijos, durante 21 dias de armazenamento. Conforme pode ser observado na Tabela 2, apenas o termo linear da concentração de inulina e gordura influenciou na acidez titulável e pH ($p < 0,05$). A variação de pH está diretamente relacionada à acidez, pois verifica-se que proporcionalmente ao aumento da acidez ocorre a queda do pH dos tratamentos durante o período de armazenamento (Figura 1). Tal fato está relacionado à atividade metabólica dos microrganismos, que por meio da fermentação de diversos açúcares, produzem ácidos que se acumulam no queijo (Fox, et al., 2000; Marín-Diana et al., 2003; Buriti, Rocha, e Saad, 2005). Assim, pode-se inferir que os diferentes teores de gordura e inulina adotados neste estudo influenciaram as funções metabólicas dos microrganismos.

3.2. Composição físico-química

Na avaliação físico-química das formulações de queijo *cottage* (dados não mostrados), o teor de umidade está diretamente relacionado com a variação da concentração de lipídios. O tratamento com baixo teor de gordura (T9) apresentou alto teor de umidade ($76,05\% \pm 0,13$), assim como a formulação com maior concentração desta variável (T7) apresentou umidade ($72,40\% \pm 0,29$) significativamente ($p < 0,05$) inferior aos demais. Alves (2009) em estudo com *cream cheese* simbiótico, observou que os tratamentos que continham maior teor de inulina apresentaram umidade inferior, em função de o prebiótico aumentar a concentração de sólidos totais. Para o teor de gordura, não foi observada influencia do prebiótico, sendo que as diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os resultados estão

relacionadas com a adição de diferentes teores de gordura em cada formulação. Por outro lado, a adição de altas concentrações (5 a 8%) de inulina pode reduzir o teor de gordura em produtos lácteos (Buriti et al., 2007; Cardarelli et al., 2008).

Para o teor de cinzas, observou-se uma tendência de redução nesta fração nos tratamentos com maiores teores de inulina. O mesmo foi observado por Buriti et al. (2007) em estudo com queijo cremoso simbiótico.

O valor protéico dos queijos *cottage* variou significativamente ($p < 0,05$) de 11,39% ($\pm 0,53$) a 13,17% ($\pm 0,22$), para os tratamentos T2 e T7, respectivamente. No entanto, não foi detectada influência da adição de diferentes teores de gordura e inulina nesta fração. Akalin et al., (2007) afirmam que a adição de 2% de prebiótico em iogurtes probióticos não alterou o valor protéico deste produto. Em contrapartida, Buriti et al. (2007) obtiveram teores mais baixos de lipídios, proteínas e cinzas para as amostras adicionadas de inulina comparativamente às amostras probióticas e controle de queijo cremoso frescal. As diferenças estatísticas para proteína encontradas no queijo *cottage* podem ter ocorrido devido à atividade proteolítica dos microrganismos.

3.3. Perfil de ácidos graxos

A maior parte dos ácidos graxos no queijo *cottage* (Tabela 3) é representada em todos os tratamentos pela sua fração saturada (AGS), pois ácidos graxos de cadeia curta e elevada proporção de ácidos graxos saturados são os mais presentes na gordura do leite bovino. Em lácteos, a adição de probióticos pode aumentar a porção saturada dos ácidos graxos (Yadav, Jain e Sinha, 2007).

O ácido oléico (C18:1n9) é o principal representante dos ácidos graxos monoinsaturados em queijos, sendo que seu teor na gordura do leite bovino é cerca de 28,5%. A quantidade média de ácidos graxos insaturados (monoinsaturados e poliinsaturados) no

queijo *cottage* (Tabela 3) variou de 32,04% ($\pm 1,48$) a 35,77% ($\pm 1,40$), sendo que o teor médio do ácido oléico variou de 27,8% ($\pm 0,98$) a 29,07% ($\pm 1,46$). Ekinci et al. (2008) não observaram influência de diferentes culturas probióticas em cremes de leite no teor de ácido oléico. Alves (2009) observou que alguns tratamentos de *cream cheese* com diferentes concentrações de cultura probiótica (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis* e *S. thermophilus*) e inulina, tenderam a reduzir a quantidade de ácidos graxos insaturados.

Por outro lado, alguns ácidos graxos presentes no leite podem afetar o crescimento de bifidobacterias. Ácidos graxos saturados como o láurico (C12) e mirístico (C14) em concentrações de 3,6% a 10,5% no leite inibem o crescimento de bifidobacteria. No entanto, a maior predominância no leite de ácidos graxos saturados como butírico (C4), palmítico (C16) e esteárico (C18) com níveis acima de 8,5%, 23,5% e 10% respectivamente, favorece o crescimento deste probiótico (Walstra et al., 1999).

Assim, pode-se dizer que os valores dos ácidos graxos láurico, mirístico, palmítico e esteárico (com exceção do ácido butírico que não foi quantificado neste estudo) encontrados no queijo *cottage* (Tabela 3) favoreceram a viabilidade de *B.animalis*.

3.4. Viabilidade de *S. thermophilus*, *L. acidophilus* e *B.animalis* durante o armazenamento do queijo *cottage*

A população de *Streptococcus thermophilus* manteve níveis acima de 7 UFC g⁻¹ para todos os tratamentos (Tabela 4) durante 21 dias de armazenagem do queijo *cottage*. Esta cultura é capaz de liberar ácidos para o meio pela degradação da lactose além de sintetizar β -galactosidase (Shah, 1995; Martín-Diana et al., 2003). Souza e Saad (2009) afirmam que a redução no teor de gordura de queijo Minas frescal, produzido com *S. thermophilus* e *L. acidophilus*, não impediu que a cultura de *S. thermophilus* se multiplicasse durante a vida de prateleira do produto. De acordo com Drouault, Anba e Corthier, (2002) e Mater et al. (2005),

S. thermophilus é considerada uma cepa probiótica por atuar como fonte de lactase no intestino delgado e sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal. Porém, não possui origem na microbiota intestinal humana sadia (Sanders, 2003).

A contagem de *L. acidophilus* (Tabela 5) apresentou níveis acima de 8,12 UFC g⁻¹ até o fim do período de estocagem para todos os tratamentos. Sendo que, a quantidade mínima diária de microrganismos viáveis ingeridos para efeitos terapêuticos é de 8 a 9 UFC g⁻¹ ou mL⁻¹ (Brasil, 2008) ou 6 a 7 UFC 100 g⁻¹ ou 100 mL⁻¹ (Gomes e Malcata, 1999). Assim, o consumo diário de uma pequena porção dos queijos desenvolvidos neste trabalho é suficiente para garantir efeitos benéficos à saúde. Vinderola et al. (2000) obtiveram 8,56 UFC g⁻¹ de *L. acidophilus* adicionado em co-cultura com bifidobactéria e *L. casei* em queijo fresco argentino. Desai, Powell e Shah, (2004) observaram que cepas de *Lactobacillus* (*Lactobacillus casei* ASCC 1520, CSCC 2607, ASCC 290 e ASCC 279, *L. paracasei* ASCC 292, *Lactobacillus rhamnosus* ASCC 1521 and *L. zae* ATCC 15820) obtiveram melhor viabilidade em leite desnatado reconstituído suplementado com 5% de inulina. Em contrapartida, Alves (2009) em pesquisa com *cream cheese* elaborado com inulina, *S. thermophilus*, *L. acidophilus* e *B. animalis*, observou uma alta redução na viabilidade da cultura de *L. acidophilus* a níveis de 3,1 UFC g⁻¹ devido à elevada concentração de *S. thermophilus* a níveis de 9,28 UFC g⁻¹ ao longo de 45 dias.

Os níveis de *Bifidobacterium animalis* (Tabela 6) mantiveram-se acima de 8 UFC g⁻¹ na maioria dos tratamentos durante o período de armazenagem. Para o T1, T9 e T10 a viabilidade desta cultura em algumas semanas reduziu a níveis de 7,78 UFC g⁻¹ (Tabela 6). Esse fato pode estar relacionado à combinação de baixos teores de gordura e prebiótico e o uso de mais de um microrganismo, pois estes fatores podem resultar na redução significativa de todos os microrganismos como consequência da maior competição pelo mesmo substrato necessário para a fermentação e desenvolvimento de suas funções metabólicas (Oliveira et al., 2009). Segundo Gomes e Malcata (1999), além da glicose, as bifidobactérias podem também

fermentar galactose, lactose e, usualmente, frutose; e algumas espécies utilizam carboidratos complexos, bem como certos lipídios. Alguns autores afirmam que a inulina é capaz de contribuir para a sobrevivência de microrganismos probióticos durante o processamento e armazenagem de produtos lácteos (Desai et al., 2004; Özer, Akin, e Özer, 2005; Capela, Hay, e Shah, 2006).

Apesar de alguns autores afirmarem que queijos com baixas concentrações de gordura são favoráveis à multiplicação e sobrevivência de bactérias probióticas (Vinderola et al., 2000; Ryhänen, Pihlanto-Leppälä e Pahkala, 2001), neste estudo os tratamentos com níveis mais baixos de gordura (T1 e T9) não foram mais significativos em relação as outras formulações quanto a viabilidade de *B. animalis* (Tabela 6) em alguns períodos durante a armazenagem. O fato de a lactose ser reduzida no processamento do queijo *cottage*, devido às lavagens, pode ter contribuído para a baixa viabilidade do probiótico nestas formulações (Araújo et al., 2010). Por outro lado a lavagem da massa coalhada reduz a acidez, o que manteve os níveis de pH (Figura 1b) na faixa de 5,1 a 5,2, sendo que o pH ótimo de sobrevivência deste bactéria é de 5,0 a 7,0 (Dave e Shah, 1997; Shah, 2000; Kailasapathy, 2006). Adicionalmente, em razão da moderada taxa de multiplicação de *S. thermophilus* com conseqüente baixa redução de pH, além de sua possível capacidade de reduzir a tensão de oxigênio do meio, favoreceram a multiplicação das bactérias probióticas na grande maioria dos tratamentos (Saarela et al., 2000).

4. Conclusões

Todas as formulações de queijo *cottage* apresentaram potencial probiótico, uma vez a concentração de *L. acidophilus* e *B. animalis* mantiveram-se acima de 7 UFC g⁻¹ durante todo o período de armazenamento. Os resultados também indicam a qualidade físico-química do produto, revelando que a quantidade a ser ingerida de queijo *cottage* pode ser maior que a dos

queijos que possuem altos teores de sal e gordura. Assim, o consumo de queijo *cottage* desenvolvido neste estudo, pode desempenhar efeitos benéficos ao organismo por possuir baixos teores de sal, gordura e alta potencialidade funcional.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Usina Escola de Laticínios (UNI-UFSM) pelo fornecimento das culturas lácticas utilizadas na elaboração do produto e apoio técnico durante a elaboração deste estudo, à Clariant-Brasil pela doação de inulina e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil, pela concessão de bolsa de mestrado ao primeiro autor.

Referências

- Akalin, A.S., Fenderya, S., Akbulut, N., 2004. Viability and activity of bifidobacteria in yoghurt containing fructooligosaccharide during refrigerate storage. *International Journal of Food Science and Technology* 39, 613-621.
- Akalin, A.S., Tokusoglu, Ö., Göngu, S., Aycan, S., 2007. Occurrence of conjugated linoleic acid in probiotic yoghurts supplemented with fructooligosaccharide. *International Dairy Journal* 17, 1089-1095.
- Alves, L.L., 2009. *Desenvolvimento de cream cheese simbiótico: caracterização e perfil lipídico com ênfase em ácido linoléico conjugado*, 128p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) Universidade Federal de Santa Maria, Brasil.
- AOAC, 2005. *Official methods of analysis*. 18th. ed. Association of Official Analytical Chemistry, Washington, DC, USA.

- Araújo, E.A., Carvalho, A.F., Leandro, E.S., Furtado, M.M., Moraes, C.A., 2010. Developmente of a symbiotic cottage cheese added with *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 na inulin. *Jornal of Funtional Foods* 2, 85-87.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal Biochemistry Physiology* 27, 911-917.
- Boylston, T.D., Vinderola, C.G., Ghoddusi, H.B., Reinheimer, J.A., 2004. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. *International Dairy Journal* 14, 375-387.
- Brasil., 2006. *Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006 (D. O. U. 14/ 12/ 2006).
- Brasil., 2006. *Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos*. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. IX - Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas, 2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissões/tecno_lista_alega.htm. Acesso em 07 jan. 2010.
- Buriti, F.C.A., Rocha, J.S., Saad, S.M .I., 2005. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. *International Dairy Journal* 38, 173-180.
- Buriti, F.C.A., Cardarelli, H.R., Filisetti, T.M.C.C., Saad, S.M.I., 2007. Synbiotic potential of fresh cream cheese supplemented with inulin and *Lactobacillus paracasei* in co-culture with *Streptococcus termophilus*. *Food Chemistry* 104, 1605-1610.
- Capela, P., Hay, T.K.C., Shah, N.P., 2006. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Research International* 39, 203–211.

- Cardarelli, H.R., Buriti, F.C.A., Castro, I.A., Saad, S.I., 2008. Inulin and oligofructose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially symbiotic petit suisse cheese. *LWT* 41, 1037-1046.
- Christian Hansen, 1999. *Method for counting probiotic bacteria. Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei* and Bifidobacteria in milk products made with nutrish cultures. 5p. [Analytical Proceedment].
- Dave, R.I., Shah, N.P., 1997. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. *International Dairy Journal* 7, 31-41.
- Desai, A.R., Powell, I.B., Shah, N.P., 2004. Survival and activity of probiotic lactobacilli in skim milk containing prebiotic. *Journal of Food Science* 69, 57–60.
- Drake, M.A., Swanson, B.G., 1995. Reduced and low-fat cheese technology: a review. *Trends in Food Science & Technology* 6, 366-369.
- Ekinci, F.Y., Okur, O.D., Ertekin, B., Guzel-Seydim, Z., 2008. Effects of probiotic bacteria and oils on fatty acid profiles of cultured cream. *European Journal of Lipid Science and Technology* 110, 216-224.
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., Mcseweeney, P.L.H., 2000. *Fundamentals of cheese science*. USA: Aspen Publications.
- Gomes, A.M.P., Malcata, F.X., 1999. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science e Technology* 10, 139-157.
- IDF, 1997. *Yogurt: enumeration of characteristic microorganisms*. International Dairy Federation Standard. 5 p.
- IDF, 1999. *Detection and enumeration of Lactobacillus acidophilus*. Bulletin of the International Dairy Federation 306, 23-33.
- Kailasapathy, K., 2006. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. *LWT - Food Science and Technology* 39, 1221–1227.

- Martín-Diana, A.B., Janer, C., Peláez, C., Requena, T., 2003. Development of a fermented goat's milk containing probiotic bacteria. *International Dairy Journal* 13, 827-833.
- Mater, D.D.G., Bretigny, L., Firmesse, O., Flores, M.J., Mogenet. A., Bresson, J.L., Corthier, G., 2005. *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* survive gastrointestinal transit of healthy volunteers consuming yogurt. *Fems Microbiology Letters* 250, 185-187.
- Oliveira, R.P.S., Florence, A.C.R., Silva, R.C., Perego, P., Converti, A., Gioielli, L.A., Oliveira, M.N., 2009. Effect of different prebiotics on the fermentation kinetics, probiotic survival and fatty acids profiles in nonfat symbiotic fermented milk. *International Journal of Food Microbiology* 128, 467-472.
- Özer, D., Akin, S., Özer, B., 2005. Effect of inulin and lactulose on survival of *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-02 in acidophilus-bifidus yoghurt. *Food Science and Technology International* 11, 19-26.
- Rodrigues, M.I., Iemma, A.F., 2005. *Planejamento de experimentos e otimização de processos*. 1.ed. Casa do Pão Editora, Campinas, Brazil.
- Ryhänen, E.L., Pihlanto-Leppälä, A., Pahkala, E., 2001. A new type of ripened, low-fat cheese with bioactive properties. *International Dairy Journal* 11, 441-447.
- Saarela, M., Mogense.N.G., Fondém. R., Mättö. J., Mattila-Sandholm. T., 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology* 84, 197-215.
- Sanders, M.E., 2003. Probiotics: considerations for human health. *Nutrition. Review*, New York 61, 91-99.
- Sanz, Y., 2007. Ecological and functional implications of the acidadaptation ability of *Bifidobacterium*: a way of selecting improved probiotic strains. *International Dairy Journal* 17, 1284-1289.

- Shah, N.P., 2007. Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal* 17, 1262-1277.
- Shah, N.P., Lankaputhra, W., Britz, M.L., Kyle, W.S.A., 1995. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. *International Dairy Journal* 5, 515-521.
- Shah, N.P., 2000. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science* 83, 894-907.
- Shortt, C., O'Brien, J., 2004. *Handbook of functional dairy products*. CRC Press, Washington. 294pp.
- Souza, C.H.B., Saad, S.M.I., 2009. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La-5 added solely or in co-culture with a yoghurt starter culture and implications on physico-chemical and related properties of Minas fresh during storage. *LWT-Food Science and Technology* 42, 633-640.
- Souza, G., 1986. *Tecnologia do queijo cottage por processo modificado - Instruções técnicas*. São Paulo: Instituto de Tecnologia de Alimentos. 37p.
- Uysal, H., Kilic, S., Kavas, G., Akbulut, N., Kesencas, H., 2003. Some properties of set yoghurt made from caprine milk and bovine-caprine milk mixtures fortified by ultrafiltration or the addition of skim milk powder. *International Journal of Dairy Technology* 56, 177-181.
- Vinderola, C.G., Prosello, W., Ghiberto, D., Reinheimer, J.A., 2000. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian fresco cheese. *Journal of Dairy Science* 83, 1905-1911.
- Walstra, P., Geurts, T.J., Noomen, A., Jellema, A., Van Boekel, M.A.J.S., 1999. Milk components. In *Dairy technology: Principles of milk properties and processes* (pp. 27-105). New York: Marcel Dekker, Inc.

Yadav, H., Jain, S., Sinha, P.R., 2007. Production of free fatty acids and conjugated linoléico acid in probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* during fermentation and storage. *International Dairy Journal* 17, 1006-1010.

Tabela 1

Delineamento experimental para formulação de queijo *cottage* com diferentes teores de gordura e inulina suplementado com *Streptococcus termophilus*, *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium* Bb -12.

Tratamento	Variáveis codificadas		Variáveis reais		
	X ₁ [*]	X ₂ ^{**}	X ₁ [*]	X ₂ ^{**}	
1	-1	-1	12	0,5	
2	-1	1	12	1,5	
3	1	-1	20	0,5	
4	1	1	20	1,5	
5	0	0	16	1,0	
6	0	0	16	1,0	
7	1,414	0	22	1,0	
8	0	1,414	16	1,7	
9	-1,414	0	10	1,0	
10	0	-1,414	16	0,3	
11	0	0	16	1,0	
12	0	0	16	1,0	
Variáveis independentes	Níveis codificados				
	-1,414	-1	0	1	1,414
X ₁ [*] (%)	10	12	16	20	22
X ₂ ^{**} (%)	0,3	0,5	1	1,5	1,7

*X₁ = teor de gordura (%).

**X₂ = teor de inulina (%).

Tabela 2

Coefficientes de regressão múltipla dos modelos matemáticos^a para as variáveis resposta de acidez titulável e pH durante o armazenamento (4 ± 1 °C) de queijo *cottage* com diferentes teores de gordura e inulina suplementado com *Streptococcus termophilus*, *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium* Bb -12.

Coeficiente		Acidez Titulável	pH
	β_0	0,65*	5,12*
Linear	β_1	0,08*	0,2*
	β_2	0,40*	0,25*
Quadrático	β_{11}	-0,003	0,02
	β_{22}	-0,20	0,06
Interação	β_{12}	-0,004	0,008
R_2		0,93	0,89

^a $Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_1 X_1^2 + \beta_2 X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \varepsilon$, onde Y= acidez titulável ou pH,

X_1 = concentração de gordura e X_2 = concentração de inulina.

* = significativo a $p < 0,05$.

Tabela 3

Perfil de ácidos graxos (expressos em %) * em queijo *cottage* com diferentes teores de gordura e inulina suplementado com *Streptococcus termophilus*, *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium* Bb -12 armazenados a 4 ± 1 °C.

Amostra	AGS	AGI	C14	C16	C18	C18: n9	C12
T1	64,97±1,38 ^B	33,52±1,69 ^D	10,82±0,42 ^B	32,51±1,77 ^B	14,73±0,98 ^A	27,97±1,56 ^B	2,56±0,006 ^C
T2	64,86±1,15 ^{BC}	34,90±1,26 ^B	11,00±1,17 ^A	32,05±1,95 ^C	14,08±1,67 ^{CDE}	27,11±1,00 ^E	2,62±0,004 ^{BC}
T3	63,81±1,23 ^E	35,08±0,97 ^C	10,76±1,85 ^B	31,86±0,85 ^C	14,06±0,93 ^{DE}	27,35±1,85 ^{CD}	2,60±0,070 ^C
T4	64,30±1,68 ^C	34,35±1,75 ^C	10,43±1,90 ^C	31,63±1,15 ^D	14,21±0,56 ^{CD}	27,36±1,63 ^{CD}	2,44±0,006 ^D
T5	66,13±1,68 ^A	32,04±1,48 ^E	11,08±0,89 ^A	11,08±0,89 ^A	14,65±1,57 ^A	29,07±1,46 ^A	2,67±0,005 ^B
T6	66,13±1,68 ^A	32,04±1,48 ^E	11,08±0,89 ^A	11,08±0,89 ^A	14,65±1,57 ^A	28,07±1,46 ^A	2,67±0,005 ^B
T7	63,94±1,03 ^D	35,11±0,24 ^{AB}	10,80±1,87 ^B	31,92±1,28 ^C	13,99±1,50 ^E	27,08±0,98 ^E	2,60±0,054 ^{BC}
T8	64,55±1,85 ^C	33,95±1,39 ^D	10,46±1,44 ^C	31,51±1,80 ^D	14,18±0,35 ^{BC}	27,20±1,64 ^{DE}	2,46±0,004 ^D
T9	63,80±1,12 ^E	35,77±1,40 ^A	11,17±0,19 ^A	32,30±1,18 ^B	14,14±1,27 ^{BCD}	27,50±1,69 ^C	2,75±0,005 ^A
T10	64,35±1,45 ^C	34,87±1,05 ^B	10,80±1,13 ^B	31,96±1,90 ^C	14,11±1,42 ^{BCD}	27,97±1,93 ^E	2,62±0,001 ^{BC}
T11	66,13±1,68 ^A	32,04±1,48 ^E	11,08±0,89 ^A	34,02±1,19 ^A	14,65±1,57 ^A	29,07±1,46 ^A	2,67±0,005 ^B
T12	66,13±1,68 ^A	32,04±1,48 ^E	11,08±0,89 ^A	11,08±0,89 ^A	14,65±1,57 ^A	29,07±1,46 ^A	2,67±0,005 ^B

* Os valores são as médias (n= 3) ± DP. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística pelo Teste de Tukey (p< 0,05). AGS:

∑ácidos graxos saturados; AGI: ∑ácidos graxos insaturados.

Tabela 4

Contagens de *Streptococcus termophilus* (\log_{10} UFC g^{-1})^{*} em queijo *cottage* com diferentes concentrações de gordura e inulina durante o armazenamento por 21 dias a 4 ± 1 °C.

	X ₁ ^{**}	X ₂ ^{***}	Dias de armazenamento			
			1	7	14	21
T1	12	0,5	7,44±0,16 ^{BCa}	7,68±0,05 ^{ABa}	7,38±0,19 ^{Cd}	7,91±0,028 ^{Aa}
T2	12	1,5	7,32±0,16 ^{Cab}	7,80±0,03 ^{Aa}	7,62±0,03 ^{ABabc}	7,47±0,03 ^{BCd}
T3	20	0,5	7,08±0,00 ^{Cbcd}	7,69±0,06 ^{Aa}	7,57±0,07 ^{Abcd}	7,38±0,13 ^{Bd}
T4	20	1,5	7,00±0,04 ^{Cd}	7,53±0,04 ^{Ba}	7,56±0,03 ^{Bbcd}	7,69±0,06 ^{Abc}
T5	16	1,0	7,33±0,01 ^{Dab}	7,84±0,03 ^{Aa}	7,67±0,03 ^{Babc}	7,51±0,09 ^{Ccd}
T6	16	1,0	7,33±0,01 ^{Dab}	7,84±0,03 ^{Aa}	7,67±0,03 ^{Babc}	7,51±0,09 ^{Ccd}
T7	22	1,0	7,30±0,13 ^{ABab}	7,21±0,55 ^{Ba}	7,83±0,08 ^{Aa}	7,73±0,02 ^{ABab}
T8	16	1,7	7,23±0,04 ^{ABabc}	7,17±0,49 ^{Ba}	7,56±0,11 ^{ABbcd}	7,76±0,05 ^{Aab}
T9	10	1,0	7,00±0,10 ^{Ccd}	7,59±0,08 ^{ABa}	7,71±0,07 ^{Aab}	7,42±0,14 ^{Bd}
T10	16	0,3	7,01±0,13 ^{Accd}	7,24±0,55 ^{Aa}	7,46±0,10 ^{Adc}	7,50±0,13 ^{Adc}
T11	16	1,0	7,33±0,01 ^{Dab}	7,84±0,03 ^{Aa}	7,67±0,03 ^{Babc}	7,51±0,09 ^{Ccd}
T12	16	1,0	7,33±0,01 ^{Dab}	7,84±0,03 ^{Aa}	7,67±0,03 ^{Babc}	7,51±0,09 ^{Ccd}

* Médias (n= 4) e respectivos desvios padrões.

^{A-B} Para cada linha letras maiúsculas sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) obtidas entre os diferentes períodos de armazenamento para cada tratamento.

^{a-b} Para cada coluna letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) obtidas entre os diferentes tratamentos para um mesmo período de armazenamento.

** X1 = Concentração de gordura (%).

*** X2 = Concentração de inulina (%).

Tabela 5

Contagens de *Lactobacillus acidophilus* (\log_{10} UFC g^{-1})^{*} em queijo *cottage* com diferentes concentrações de gordura e inulina durante o armazenamento por 21 dias a 4 ± 1 °C.

	X ₁ ^{**}	X ₂ ^{***}	Dias de armazenamento			
			1	7	14	21
T1	12	0,5	8,34±0,07 ^{Aa}	8,31±0,10 ^{Aab}	8,26±0,07 ^{AcD}	8,25±0,06 ^{Ae}
T2	12	1,5	8,35±0,05 ^{BCa}	8,18±0,05 ^{Cb}	8,45±0,11 ^{ABabc}	8,57±0,14 ^{AcD}
T3	20	0,5	8,24±0,02 ^{Bab}	8,39±0,11 ^{ABab}	8,43±0,11 ^{ABabc}	8,54±0,11 ^{AcD}
T4	20	1,5	8,12±0,07 ^{Cb}	8,23±0,10 ^{BCb}	8,33±0,09 ^{Bbcd}	8,87±0,07 ^{Aa}
T5	16	1,0	8,30±0,07 ^{Ba}	8,47±0,10 ^{Aa}	8,54±0,08 ^{Aa}	8,40±0,05 ^{ABde}
T6	16	1,0	8,30±0,07 ^{Ba}	8,47±0,10 ^{Aa}	8,54±0,08 ^{Aa}	8,40±0,05 ^{ABde}
T7	22	1,0	8,30±0,09 ^{Ba}	8,38±0,09 ^{ABab}	8,49±0,07 ^{Aab}	8,57±0,09 ^{AcD}
T8	16	1,7	8,24±0,08 ^{BCab}	8,33±0,12 ^{Bab}	8,16±0,04 ^{Cd}	8,62±0,03 ^{Abc}
T9	10	1,0	8,28±0,05 ^{Bab}	8,18±0,02 ^{Cb}	8,15±0,06 ^{Cd}	8,79±0,01 ^{Aab}
T10	16	0,3	8,32±0,08 ^{Aa}	8,35±0,05 ^{Aab}	8,27±0,08 ^{AcD}	8,41±0,08 ^{Ade}
T11	16	1,0	8,30±0,07 ^{Ba}	8,47±0,10 ^{Aa}	8,54±0,08 ^{Aa}	8,40±0,05 ^{ABde}
T12	16	1,0	8,30±0,07 ^{Ba}	8,47±0,10 ^{Aa}	8,54±0,08 ^{Aa}	8,40±0,05 ^{ABde}

* Médias (n= 4) e respectivos desvios padrões.

^{A-B} Para cada linha letras maiúsculas sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) obtidas entre os diferentes períodos de armazenamento para cada tratamento.

^{a-b} Para cada coluna letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) obtidas entre os diferentes tratamentos para um mesmo período de armazenamento.

** X₁ = Concentração de gordura (%).

*** X₂ = Concentração de inulina (%).

Tabela 6

Contagens de *Bifidobacterium animalis* (\log_{10} UFC g^{-1})^{*} em queijo *cottage* com diferentes concentrações de gordura e inulina durante o armazenamento por 21 dias a 4 ± 1 °C.

	X ₁ ^{**}	X ₂ ^{***}	Dias de armazenamento			
			1	7	14	21
T1	12	0,5	8,36±0,05 ^{Aab}	8,33±0,04 ^{Aab}	7,96±0,12 ^{Bbcd}	7,95±0,03 ^{Bf}
T2	12	1,5	8,31±0,21 ^{ABab}	8,21±0,04 ^{ABabc}	8,15±0,12 ^{Bab}	8,44±0,03 ^{Ac}
T3	20	0,5	8,25±0,11 ^{Bab}	8,39±0,11 ^{ABa}	8,19±0,05 ^{Ba}	8,54±0,11 ^{ABcd}
T4	20	1,5	8,23±0,09 ^{Bab}	8,13±0,03 ^{Babc}	8,13±0,03 ^{Bab}	8,77±0,08 ^{Aa}
T5	16	1,0	8,35±0,07 ^{Aab}	8,34±0,05 ^{Aab}	8,08±0,08 ^{Babc}	8,24±0,06 ^{Ae}
T6	16	1,0	8,35±0,07 ^{Aab}	8,34±0,05 ^{Aab}	8,08±0,08 ^{Babc}	8,24±0,06 ^{Ae}
T7	22	1,0	8,14±0,12 ^{Bb}	8,20±0,11 ^{Babc}	8,28±0,07 ^{Ba}	8,62±0,15 ^{ABbc}
T8	16	1,7	8,40±0,06 ^{ABa}	8,10±0,24 ^{Cbc}	8,16±0,04 ^{BCab}	8,66±0,07 ^{ABab}
T9	10	1,0	8,35±0,05 ^{Bab}	7,95±0,17 ^{Cc}	7,78±0,10 ^{Cd}	8,81±0,05 ^{Aa}
T10	16	0,3	8,40±0,08 ^{Aab}	8,23±0,05 ^{Babc}	7,88±0,10 ^{Ccd}	8,36±0,05 ^{ABde}
T11	16	1,0	8,35±0,07 ^{Aab}	8,34±0,05 ^{Aab}	8,08±0,08 ^{Babc}	8,24±0,06 ^{Ae}
T12	16	1,0	8,35±0,07 ^{Aab}	8,34±0,05 ^{Aab}	8,08±0,08 ^{Babc}	8,24±0,06 ^{Ae}

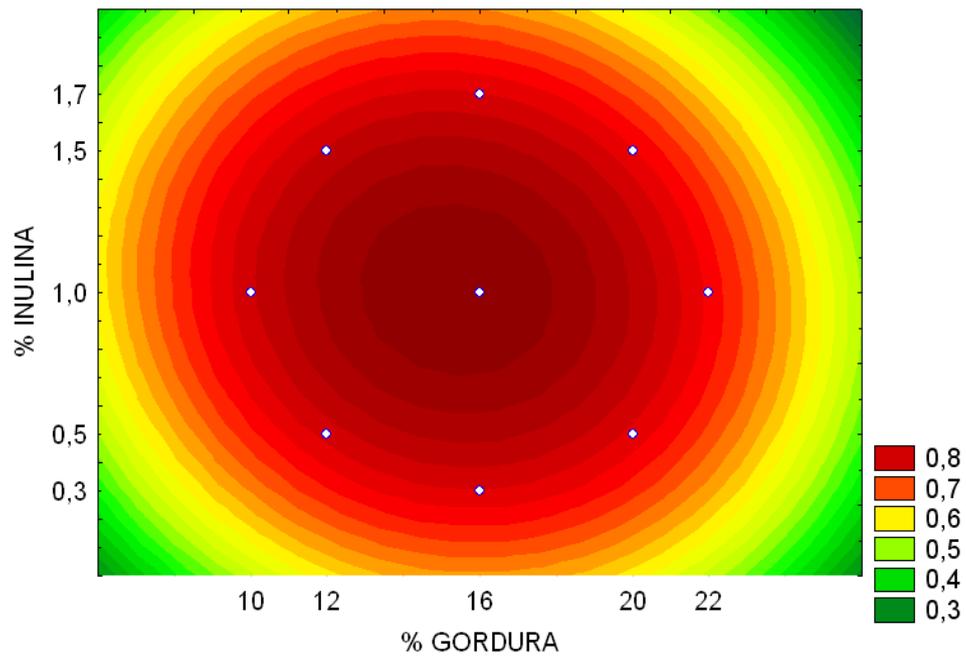
* Médias (n= 4) e respectivos desvios padrões.

^{A-B} Para cada linha letras maiúsculas sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) obtidas entre os diferentes períodos de armazenamento para cada tratamento.

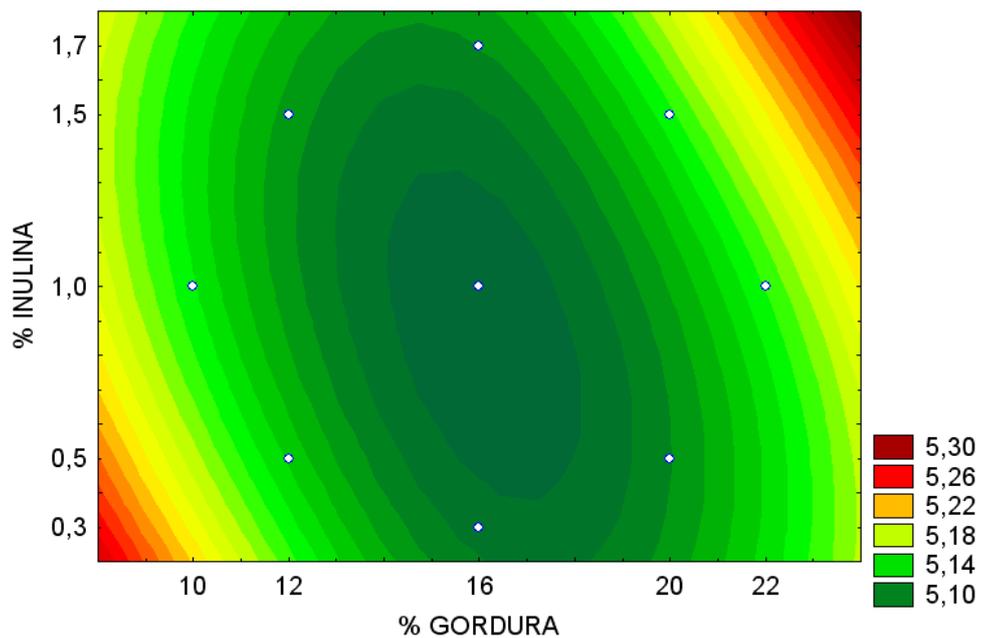
^{a-b} Para cada coluna letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) obtidas entre os diferentes tratamentos para um mesmo período de armazenamento.

** X1 = Concentração de gordura (%).

*** X2 = Concentração de inulina (%).



(a)



(b)

Fig. 1. Superfície de resposta para % de acidez titulável (a) e pH (b) de queijo *cottage* contendo *Streptococcus termophilus*, *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium* Bb - 12 e diferentes concentrações de gordura e inulina. A figura é relativa à média entre os dias de armazenamento (1, 7, 14 e 21 dias).

3.3 Manuscrito 3

Manuscrito em fase final de revisão pelos autores para ser submetido à Food Chemistry

(Configuração conforme as normas da Revista – Anexo F)

Avaliação das características tecnológicas e sensoriais de queijo *cottage* simbiótico

Carline Gass Parodia^a

^a *Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa*

Maria, Av. Roraima, 1000, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil

Resumo

Os produtos lácteos têm se mostrado bons carreadores de bactérias probióticas. O objetivo deste estudo foi avaliar as características sensoriais, índice da extensão da proteólise, textura e cor instrumental das formulações de queijo *cottage* com diferentes teores de gordura e inulina, suplementado com *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium* Bb -12 durante o período de armazenamento. Doze formulações de queijo *cottage* foram planejadas através do delineamento central composto rotacional. Foram realizadas análise de cor e textura instrumental, determinação do índice de extensão da proteólise (IEP) e avaliação sensorial utilizando o teste de ordenação e escala hedônica (7 níveis). Não foi detectada diferença estatística pelo teste de Tukey ($p > 0,05$) no teste por escala hedônica, tampouco por ordenação ($p > 0,01$). As amostras apresentaram maiores valores para os parâmetros de cor, textura e IEP ao final do período de armazenagem, diferindo significativamente ($p < 0,05$) entre o 1º e 21º de armazenamento.

Palavras-chave: queijo simbiótico, queijo *cottage*, textura, cor.

1. Introdução

Nos últimos anos, muitos estudos têm mostrado que os queijos são eficientes em termos de viabilidade de culturas probióticas, devido às características físico-químicas e sensoriais que tornam estes produtos favoráveis à adição destes microrganismos (Vinderola, Prosello, Ghiberto & Reinheimer, 2000; Kasimoglu, Göncüoglu & Akgün, 2004). Contudo, o impacto dos probióticos sobre as propriedades sensoriais dos tipos de queijos, bem como as variações nas formulações, tem sido pouco explorado em relação à aceitabilidade do produto pelo consumidor, assim como o uso associado destes com os prebióticos (Bergamini, Hynes, Palma, Sabbag & Zalazar, 2009).

Um dos prebióticos mais estudados é a inulina, polímero que ocorre como material de reserva em plantas e que possui atividade prebiótica especialmente quando associada à *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, além de ser um modificador reológico, pois quando utilizado em baixas concentrações, pode aumentar a viscosidade do produto (Murphy, 2001). Um alimento que possua essa associação, entre inulina e *Bifidobacterium* e/ou *Lactobacillus* nas concentrações adequadas, atende a definição de simbiótico (Aragon-Alegro, Alegro, Cardarelli, Chiu & Saad, 2007).

Durante a maturação dos queijos, várias reações bioquímicas são potencializadas por diversas enzimas, decorrentes da adição de microrganismos, enzimas e/ou processos utilizados, tendo como substrato carboidratos, lipídios e proteínas. Estas reações são responsáveis por mudanças ocorridas na massa durante este período, conferindo alterações de aroma, textura e sabor, que definem as características sensoriais do produto (Souza, Ardo & Mcsweeney, 2001; Santos & Koblitz, 2008). Embora os queijos frescos não sofram

maturação, alguns eventos bioquímicos como a proteólise, podem ocorrer durante o período de armazenamento.

Queijos com baixas concentrações de gordura têm maiores níveis de umidade, e são classificados por alguns autores como produtos de qualidade inferior, pois a textura, sabor e aroma dos queijos podem ser afetados significativamente, uma vez que a alta umidade destes produtos enfraquece a rede de proteínas, resultando em queijos menos firmes (Mistry & Anderson, 1993; Mistry, 2001).

A proteólise pode ser catalisada por enzimas provenientes do resíduo de coagulante, as quais sua atividade depende: do pH do leite, pH do soro, bem como a temperatura atingida durante o cozimento; e entre outros fatores como a adição de culturas ácido lácticas (Bergamini et al., 2009). As modificações de textura, sabor e aroma são resultantes, principalmente, da ação das proteases que geram peptídios, aminoácidos, aminas, compostos sulfurados e tiol-ésteres; lipases que produzem cetonas, lactonas, e ácidos graxos, sendo que, estes peptídeos e aminoácidos livres, gerados pela ação das proteases, são precursores de sabor (Santos & Koblitz, 2008).

Diversos autores relatam que algumas culturas probióticas têm influenciado na proteólise primária de alguns tipos de queijo (Corbo, Albenzio, De Angelis, Sevi & Gobbetti, 2001; Gobbetti, Corsetti, Smacchi, Zocchetti & De Angelis, 1998; Kasimöglu et al., 2004; Ong, Henriksson & Shah 2007). No entanto, poucos estudos têm mostrado o efeito da mistura de culturas probióticas na qualidade dos queijos (Ong et al., 2007).

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar as características sensoriais, índice de extensão da proteólise, textura e cor instrumental das formulações de queijo *cottage* com diferentes teores de gordura e inulina, suplementado com *Streptococcus termophilus*, *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium* Bb -12.

2. Materiais e Métodos

2.1. Elaboração do queijo cottage

Foram preparadas doze formulações de queijo *cottage* com diferentes teores de gordura e inulina (T1 a T12) em duplicata. A elaboração do queijo *cottage* foi realizada segundo a técnica descrita por Souza (1986) com modificações no preparo do *dressing*. Em tanque para queijos utilizou-se 20 litros de leite pasteurizado desnatado (0,02% de gordura) aquecido a 32 °C, adicionados 0,25% (v/v) de coalho líquido comercial (Ha-La®, Chr. Hansen, Valinhos, SP) e 5% (p/v) cultura *starter* mesofílica DVS (mistura de *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris*) (Chr. Hansen, Dinamarca). A fermentação ocorreu por aproximadamente 1 h; após, o coágulo foi cortado e aqueceu-se lentamente a massa coalhada (durante 1 hora até a temperatura atingir 54 °C) em banho-maria e com a substituição de 15% (em relação ao volume inicial de leite) do soro liberado por água a 80 °C. Posteriormente a coalhada foi dessorada e lavada por três vezes com água a 1 °C para o resfriamento da massa; em seguida foi feita a drenagem da coalhada em dessorador de queijos e mantida em refrigeração a 4 ± 1 °C por aproximadamente 45 minutos. Cada duplicata de massa coalhada foi dividida em doze porções, uma para cada tratamento (Tabela 1). Em seguida, foi preparado o *dressing* (líquido cremoso), em duplicata, utilizando-se creme de leite pasteurizado adicionando de leite desnatado UHT para padronizar o teor de gordura (calculada através do Quadrado de Pearson) de acordo com cada formulação (Tabela 1). A cada duplicata do *dressing* foram misturados os demais ingredientes: 1,5% (p/p) de sal de cozinha (Salsul®, Rio Grande, RS); 0,15% (p/p) de sorbato de potássio; 1% de culturas superconcentradas de *Lactobacillus acidophilus* La-5, *Bifidobacterium* Bb-12 e *S. thermophilus* (BioRich®, Chr. Hansen, Dinamarca), em concentrações iguais para todos os

tratamentos. As concentrações de inulina (Raftline®, Orafti, Bélgica) foram adicionadas a cada tratamento de acordo com a Tabela 1, assim como o teor de gordura do *dressing*. Os queijos foram acondicionados em embalagens plásticas de 150 g, e mantidos sob refrigeração a 4 ± 1 °C durante 21 dias.

2.2. Análise sensorial

A avaliação sensorial do queijo *cottage* foi realizada em quatro sessões sensoriais de três tratamentos cada, sempre contendo uma formulação do ponto central. A análise foi conduzida segundo o delineamento de blocos ao acaso com 20 provadores semi-treinados, que realizaram, simultaneamente, teste de escala hedônica de 7 níveis (1- desgostei muitíssimo, 4-indiferente, 7- gostei muitíssimo) para os atributos de aparência global, aroma, textura, acidez e sabor, e teste de ordenação. A partir do teste de ordenação foram obtidas as três formulações mais “preferidas” de cada sessão conforme a Tabela de Newell e MacFarlane (Dutcosky, 1996). Uma quinta sessão sensorial, aplicando somente o teste de ordenação, foi realizada com quatro amostras, uma amostra de queijo *cottage* comercial e três formulações “preferidas” nas sessões anteriores, para descobrir qual seria a amostra mais “preferida” entre as formulações deste estudo e a amostra comercial.

2.3. Determinação da cor instrumental

A cor instrumental foi determinada nas amostras de queijo *cottage* no 1º e 21º dias de armazenamento (4 ± 1 °C), através do colorímetro Minolta (modelo CR-300), utilizando o sistema de escala de cor $L^* a^* b^*$ (CIE LAB), previamente calibrado. Os parâmetros $L^* a^* e$

b^* foram determinados de acordo com a International Commission on Illumination (CIE, 1976).

2.4. Determinação do índice de extensão da proteólise

O índice de extensão da proteólise foi determinado após o 1º e o 21º dia de armazenamento do queijo *cottage* (4 ± 1 °C), a fim de verificar a possível alteração proteolítica causada pelas culturas nas diferentes formulações, entre o início e o fim do armazenamento dos queijos. Foram determinadas as frações de nitrogênio solúvel a pH 4,6 e nitrogênio total, ambas através do método de micro-Kjeldahl (Brasil, 2006), para todas as formulações do produto em triplicata. O índice de extensão da proteólise (IEP) é dado pela porcentagem de nitrogênio solúvel, em relação ao nitrogênio total (Souza, Ardö & Mcsweeney, 2001), e pode ser calculado através da equação 1 (Isepon, 1999):

$$\text{IEP} = \left[\frac{\text{nitrogênio solúvel}}{\text{nitrogênio total}} \right] \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

2.5. Análise do perfil textura instrumental

As propriedades de textura instrumental no queijo *cottage* foram determinadas em 1 e 21 dias de armazenamento (4 ± 1 °C). O perfil de textura dos tratamentos (T1 a T12), foi determinado através de teste de dupla compressão com velocidade de 1 mm/s e distância de 35 mm, em amostras de queijo *cottage* com 30 mm de altura e 65 mm de diâmetro, utilizando *probe* cilíndrico de alumínio com extremidade plana e raio com 36 mm de diâmetro (P36), em

analisador de textura TA.XTplus / 50 (Stable Micro Systems, Haslemere, Reino Unido). Os dados dos parâmetros de firmeza, elasticidade e adesividade foram coletados através do Software Texture Exponent 32 (Stable Micro Systems).

2.6. Planejamento experimental e análise estatística

As diferentes formulações foram elaboradas com variação nas concentrações de gordura (X1) e inulina (X2), adicionados ao *dressing* do queijo *cottage* de acordo com o Delineamento Central Composto Rotacional (Box, Hunter & Hunter, 1978). O total de formulações foi 12 (Tabela 1), onde T5, T6, T11 e T12 representam as formulações do ponto central (Rodrigues & Iemma, 2005).

Os dados foram tratados por análise de variância (ANOVA) e as diferenças estatísticas obtidas pelo Teste de Tukey a 5% de significância. Todos os cálculos e gráficos foram gerados utilizando-se o pacote estatístico Statistica 6.0 for Windows.

As variáveis dependentes (Y) foram índice de extensão da proteólise no 1º e 21º dia de armazenamento, cujas superfícies de resposta foram geradas. Os coeficientes de regressão para os termos linear, quadrático e de interação foram determinados pelo uso de regressão linear múltipla, sendo considerados significativos quando $p < 0,05$.

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização sensorial dos queijos *cottage*

Através das médias das notas de cada parâmetro sensorial avaliado no teste de escala hedônica, não foi detectada diferença significativa entre os níveis de gordura e inulina pelo

teste de Tukey ($p > 0,05$) para os parâmetros de aparência global, aroma, acidez, sabor, textura e cor (Tabela 2). A falta de hábito de consumo de queijo *cottage* pode ter dificultado a percepção das diferenças entre os tratamentos por parte dos provadores.

No teste de ordenação, as três formulações mais preferidas nas sessões sensoriais foram T4, T7 e T9, conforme o escore de pontuação (1º lugar = 1 ponto; 4º lugar = 4 pontos). No entanto, as diferenças entre os somatórios dos tratamentos dentro de cada sessão sensorial não foram significativas pela Tabela de Newell e Mac Farlane ($p > 0,01$). Estes tratamentos (T4, T7 e T9) foram novamente preparados e submetidos aos testes sensoriais juntamente com a amostra comercial. Esta quinta sessão igualmente não detectou diferença estatística ($p > 0,01$) entre os tratamentos. Ainda assim, o T7 obteve o menor escore de pontuação, considerado como preferido, seguido do T4, amostra comercial, e T9 que obteve maior escore.

Pelo fato do T7 ser a amostra com maior concentração de gordura, isso reafirma a influência da gordura sobre as características físicas do produto, e a sua contribuição para formação de compostos responsáveis pelo *flavor* dos queijos (Corbo et al., 2001; Gobbetti et al., 1998; Kasimöglu et al., 2004; Ong et al., 2007).

3.2. Avaliação de cor instrumental

A Tabela 3 mostra os resultados obtidos da avaliação da cor. Para todas as amostras o parâmetro a^* apresentou valores negativos, indicando a tendência das amostras à cor verde, enquanto que para o parâmetro b^* os valores foram positivos, indicando uma tendência à coloração amarela.

Os glóbulos de gordura dispersam as radiações de comprimento de onda da faixa do visível, mesmo com a homogeneização, pois esta reduz o tamanho dos glóbulos, mas aumenta

consideravelmente o seu número. Com isso a cor da gordura do leite, é mais significativa do que a cor das outras partículas. A tendência à cor amarelada é devido a pigmentos lipossolúveis, naturalmente presente em sua estrutura, como os carotenóides e xantofilas (Gaucher, Mollé, Gagnaire & Gaucheron, 2008).

Os valores do parâmetro b^* foram significativamente ($p < 0,05$) maiores para o 21º dia de armazenamento em relação ao 1º dia, em todas as formulações. Isso indica que pode ter ocorrido oxidação lipídica das formulações. No entanto, a oxidação não foi avaliada neste estudo, pelo fato de dificilmente apresentar níveis detectáveis em queijos frescos e com baixos teores de gordura (Gaucher et al., 2008).

A luminosidade (L) variou para os diferentes tratamentos, provavelmente em virtude do ressecamento das amostras.

A variação da cor observada para as amostras de queijo *cottage* mostram que o teor de gordura láctea pode influenciar a coloração dos produtos durante o período de armazenamento.

3.3. Índice de extensão da proteólise

Com a média dos dados do índice de proteólise após 1º e 21º dia foram elaboradas as superfícies de resposta, representadas na Figura 1. Conforme pode ser observado na Tabela 4 apenas o intercepto das concentrações de gordura e inulina foram significativos para o índice de proteólise do 1º e 21º dia ($p < 0,05$).

Embora o queijo *cottage* seja um produto fresco, transformações bioquímicas podem ocorrer durante o armazenamento. No presente estudo, a proteólise pode ter ocorrido em consequência do metabolismo de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus acidophilus*, que mantiveram níveis acima de 7 UFC g⁻¹ (dados não mostrados) durante todo o período de

armazenamento. No entanto, a proteólise primária foi mais acentuada nas formulações com maiores concentrações de gordura e inulina (Figura 1a). Segundo Bergamini et al., (2009), as cepas de *L. acidophilus*, *L. paracasei* e *B. latis* adicionadas, misturadas ou isoladas, em queijo semi-duro não influenciaram a proteólise primária. Em contrapartida, diversos autores afirmam que algumas culturas tenham influência sobre a proteólise primária em outros tipos de queijo (Gobbetti et al., 1998; Corbo et al., 2001; Kasimoglu, Göncüoğlu e Akgün, 2004; Ong et al., 2007).

Contudo, a proteólise do queijo *cottage* no último dia de armazenamento foi elevada e similar entre todos os tratamentos (Figura 1b). Isso pode estar relacionado à atividade proteolítica dos microrganismos probióticos (*Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium*), que atingiram níveis acima de 8 UFC g⁻¹ no 21º de armazenamento na maioria das formulações. Resultados similares a este estudo foram obtidos por Souza (2006), na avaliação de queijo minas frescal de reduzido teor de gordura, suplementado com *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus acidophilus* La-5. Bergamini et al. (2009) sugerem que, culturas *starters* e probióticas sejam misturadas, pois a interação sinérgica que ocorre entre estas bactérias pode promover altas populações do probiótico quando inoculadas juntas em substrato.

3.4. Avaliação do perfil textura instrumental dos queijos

A Tabela 5 mostra os resultados obtidos na avaliação da textura instrumental. Durante o armazenamento (4 ± 1 °C), houve um aumento significativo ($p < 0,05$) nos valores de todos os parâmetros analisados para todas as formulações de queijo *cottage*. A proteólise que ocorre durante o armazenamento dos queijos resulta em modificações na textura deste produto, devido à quebra na sua matriz protéica (Fox, Guinee, Cogan & Mcsweeney, 2000). Assim, a

proteólise está relacionada com o decréscimo nos valores dos parâmetros de textura, entre eles a firmeza e a elasticidade (Tunick, Cooke, Malin, Smith & Holsinger, 1997). Entretanto, no presente trabalho apesar de todas as formulações terem apresentado aumento na proteólise entre o 1º e 21º dia de armazenamento (Figura 1), os valores para o parâmetro firmeza em todas as amostras de queijo foram significativamente ($p < 0,05$) maiores ao final do armazenamento. Estes altos valores de firmeza podem estar relacionados com a diminuição da umidade. Segundo Fox, Guinee, Cogan e Mcsweeney, (2000) o soro do queijo que fica presente entre as micelas de caseína atua como um lubrificante, com a perda de umidade a massa de queijo fica mais elástica e firme. Kavas, Oysun, Kinik e Uysal, (2004) observaram que a diminuição nos teores de gordura dos queijos revelou aumento da firmeza destes produtos ao longo do armazenamento. Stampanoni e Noble (1991) obtiveram um aumento na firmeza e na elasticidade de queijos ao longo do armazenamento, quando o pH apresentou queda de aproximadamente 1,2 níveis. Em contrapartida, Lee e Klostermeyer (2001), relataram que queijos com menores valores de pH apresentaram menor elasticidade. Contudo, neste estudo o pH das amostras de queijo *cottage* apresentaram um pequeno decréscimo de 0,2 níveis, em média (dados não mostrados), durante o período de armazenagem, não estabelecendo relação entre as variações de pH com valores de elasticidade.

A produção de polissacarídeos extracelulares pelo *S. thermophilus*, como parte do metabolismo, pode afetar a textura dos queijos (Hols et al., 2005). Ahmed, El Soda, Hassan e Frank (2005) obtiveram menores valores de adesividade e firmeza em queijos com adição de *S. thermophilus*, do que em queijos produzidos sem a adição de culturas produtoras de polissacarídeos extracelulares.

No entanto, apesar das diferenças entre os resultados de textura instrumental, na análise sensorial a média das notas para o atributo textura das formulações de queijo *cottage* não diferiram significativamente entre si, sendo aceitas pelos provadores.

4. Conclusões

As formulações de queijo *cottage* obtiveram boa aceitação sensorial, não apresentando diferenças significativas entre os tratamentos para todos os atributos avaliados. Através do teste de ordenação, a formulação com maior concentração de gordura foi a mais “preferida”, apesar de não diferir significativamente das demais. Apesar das diferenças detectadas para os parâmetros de cor e textura, no período de armazenagem das amostras, os resultados são aceitáveis para este produto. No entanto não foi detectada influência da proteólise sobre as características dos queijos, sugerindo mais estudos sobre o assunto.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Usina Escola de Laticínios (UNI-UFSM) pelo fornecimento das culturas lácticas utilizadas na elaboração do produto e apoio técnico durante a elaboração deste estudo, à Clariant-Brasil pela doação de inulina e à Extralab Brasil Ltda pelo auxílio prestado.

Referências

- Ahmed, N.H., Elsoda, M., Hassan, A.N., Frank, J., 2005. Improving the textural proprieties of on acid coagulated (Karish) cheese using exopolysacharide producing cultures. *LWT - Food Science and Technology*, 38(8), 843-847.
- Aragon-Alegro, L.C. Alegro, J.H.A., Cardarelli, H.R., Chih Chiu, M., Saad, S.M.I., 2007. Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. *LWT - Food Science and Technology*, 40(4), 669-675.

- Bergamini, C.V., Hynes, E.R., Palma, S.B., Sabbag, N.G., Zalazar, C.A., 2009. Proteolytic activity of three probiotic strains in semi-hard cheese as single and mixed cultures: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium lactis*. *International Dairy Journal*, 19, 467-475.
- Box, G.E.P., Hunter, W.G., Hunter, J.S., 1978. *Statistics for experimenters. An introduction to design data analysis and model building*. New York, Wiley.
- Brasil, 2006. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006 (D. O. U. 14/ 12/ 2006). Dispõe dos Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos.
- CIE - Commission Internationale de l'Eclairage., 1996. *Colorimetry*. Vienna: CIE publication, 2 ed.
- Corbo, M.R., Albenzio, M., De Angelis, M., Sevi, A., Gobbetti, M., 2001. Microbiological and biochemical properties of Canestrato Pugliese hard cheese supplemented with bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, 84, 551–561.
- Dutcoski, S.D., 1996. *Análise sensorial de alimentos*. Curitiba: Champagnat, 122p.
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., Mcsweeney, P.L.H., 2000. *Fundamentals of cheese science*. Gaithersburg: Aspen. 587p.
- Gaucher, I., Mollé, D., Gagnaire, V., Gaucheron, F., 2008. Effects of storage temperature on physico-chemical characteristics of semi-skimmed UHT milk. *Food Hydrocolloids*, 22(1), 130-143.
- Gobbetti, M., Corsetti, A., Smacchi, E., Zocchetti, A., De Angelis, M., 1998. Production of Crescenza cheese by incorporation of bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, 81, 37–47.
- Hols, P., Hancy, F., Fointaine, L., Grossiord, B., Prozzi, D., Leblond-Borguet, N., Decaris, B., Bolotin, A., Delorme, C., Ewreich, D., Guédon, E., Monnet, V., Renault, P., Kleerebezem,

- M., 2005. New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 435-463.
- Isepon, J.S., 1999. Variação no índice de proteólise e aceitabilidade do queijo tipo Minas frescal. São Paulo 110p. Tese de doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- Kasimoglu, A., Göncüoglu, M., Akgün, S., 2004. Probiotic white cheese with *Lactobacillus acidophilus*. *International Dairy Journal*, 14, 1067–1073.
- Lee, S.K. & Klostermeyer, H., 2001. The effect of pH on the rheological properties of reduced-fat model processed cheese spreads. *LWT - Food Science and Technology* 34, 288-292.
- Mistry, V.V. & Anderson, D.L., 1993. Composition and microstructure of commercial full-fat and low-fat cheeses. *Food Structure*, 12, 259–266.
- Mistry, V.V., 2001. Low fat cheese technology. *International Dairy Journal* 11, 413-422.
- Murphy, O., 2001. Non-polyol low-digestible carbohydrates: food applications and functional benefits. *Brazilian Journal Nutrition*, 85(1), 47-53.
- Ong, L., Henriksson, A., Shah, N.P., 2007. Proteolytic pattern and organic acid profiles of probiotic Cheddar cheese as influenced by probiotic strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. paracasei*, *Lb. casei* or *Bifidobacterium* sp. *International Dairy Journal*, 17, 67–78.
- Rodrigues, M.I. & Iemma, A.F., 2005. Planejamento de experimentos e otimização de processos. 1. ed. Casa do Pão Editora, Campinas, Brazil.
- Santos, L.F. & Koblitz, M.G.B., 2008. Proteases. In P. Koblitz, M.G.B. (Ed.), *Bioquímica de Alimentos. Teoria e Aplicações práticas*: Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.77-106.
- Sousa, M.J., Ardo, Y., Mcsweeney, P.L.H., 2001. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 11, 327-345.
- Souza, G., 1986. Tecnologia do queijo *cottage* por processo modificado - Instruções técnicas. São Paulo: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 21, 37p.

- Souza, C.H.B., 2006. Influência de uma cultura starter termofílica sobre a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e as características de queijo minas frescal probiótico. 110p. Dissertação (Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica). Universidade de São Paulo.
- Stampanoni, C.R. & Noble, A.C., 1991. The influence of fat and salt on the perception of selected taste and texture attributes of cheese analogs. A scalar study. *Journal of Texture Studies*, 22, 367-380.
- Tunick, M.H., Cooke, P.H., Malin, E.L., Smith, P.W., Holsinger, V.H., 1997. Reorganization of casein Submicelles in Mozzarella cheese during storage. *International Dairy Journal*, 7, 149-155.
- Vinderola, C.G., Prosello, W., Ghiberto, D., Reinheimer, J.A., 2000. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian fresco cheese. *Journal of Dairy Science*, 83, 1905-1911.

Tabela 1Delineamento experimental para formulação do queijo *cottage* simbiótico.

Tratamento	Variáveis codificadas		Variáveis reais		
	X ₁ [*]	X ₂ ^{**}	X ₁ [*]	X ₂ ^{**}	
1	-1	-1	12	0,5	
2	-1	1	12	1,5	
3	1	-1	20	0,5	
4	1	1	20	1,5	
5	0	0	16	1,0	
6	0	0	16	1,0	
7	1,414	0	22	1,0	
8	0	1,414	16	1,7	
9	-1,414	0	10	1,0	
10	0	-1,414	16	0,3	
11	0	0	16	1,0	
12	0	0	16	1,0	
Variáveis independentes	Níveis codificados				
	-1,414	-1	0	1	1,414
X ₁ [*] (%)	10	12	16	20	22
X ₂ ^{**} (%)	0,3	0,5	1	1,5	1,7

*X₁ = teor de gordura (%).**X₂ = teor de inulina (%).

Tabela 2

Médias (n= 20) das notas da avaliação sensorial por escala hedônica do queijo *cottage* simbiótico.

Tratamento	Parâmetros Sensoriais*					
	Aparência Global	Aroma	Acidez	Sabor	Textura	Cor
T1	5,05 ^a	5,30 ^a	5,55 ^a	5,65 ^a	5,25 ^a	5,40 ^a
T2	5,40 ^a	5,30 ^a	5,00 ^a	5,30 ^{ab}	4,85 ^a	5,70 ^a
T3	4,65 ^a	5,35 ^a	4,85 ^a	5,15 ^{ab}	4,75 ^a	5,10 ^a
T4	5,35 ^a	5,50 ^a	5,50 ^a	5,95 ^a	5,35 ^a	5,35 ^a
T5	5,15 ^a	5,20 ^a	4,80 ^{ab}	5,15 ^{ab}	4,75 ^a	5,15 ^a
T6	4,75 ^a	5,05 ^a	5,30 ^a	4,95 ^{ab}	4,80 ^a	5,40 ^a
T7	5,55 ^a	4,90 ^a	5,25 ^a	5,45 ^{ab}	5,00 ^a	5,70 ^a
T8	5,00 ^a	4,95 ^a	5,00 ^{ab}	5,20 ^{ab}	4,95 ^a	5,35 ^a
T9	5,35 ^a	5,55 ^a	5,30 ^a	5,55 ^{ab}	5,45 ^a	5,30 ^a
T10	5,50 ^a	5,20 ^a	5,00 ^{ab}	5,25 ^{ab}	5,35 ^a	5,50 ^a
T11	5,40 ^a	5,65 ^a	5,20 ^{ab}	5,40 ^{ab}	5,50 ^a	5,40 ^a
T12	5,65 ^a	5,20 ^a	4,85 ^{ab}	5,15 ^{ab}	4,80 ^a	5,45 ^a
DP**	1,1424	1,0359	1,2274	1,2114	1,1476	0,9483

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

** Desvio padrão.

Tabela 3

Médias (n= 6) da avaliação dos parâmetros de cor no 1º e 21º dia de armazenamento (4 ± 1 °C) do queijo *cottage* simbiótico.

Tratamentos	Parâmetros					
	1º Dia			21º Dia		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
T1	99,36 ^{Aa}	-1,61 ^{Aa}	+20,26 ^{Babc}	96,35 ^{Bab}	-2,93 ^{Bbc}	+29,86 ^{Abc}
T2	97,18 ^{Aab}	-1,77 ^{Aa}	+20,52 ^{Bab}	95,42 ^{Abc}	-3,17 ^{Bc}	+28,92 ^{Ac}
T3	92,39 ^{Ab}	-1,61 ^{Aa}	+20,43 ^{Bab}	88,42 ^{Bd}	-2,55 ^{Bab}	+30,98 ^{Ab}
T4	95,80 ^{Aab}	-1,58 ^{Aa}	+20,91 ^{Ba}	92,80 ^{Bbc}	-2,30 ^{Ba}	+24,26 ^{Ae}
T5	93,30 ^{Ab}	-1,80 ^{Aa}	+18,95 ^{Be}	99,40 ^{Aa}	-3,17 ^{Bc}	+33,69 ^{Aa}
T6	93,25 ^{Ab}	-1,85 ^{Aa}	+18,95 ^{Be}	98,00 ^{Aa}	-3,17 ^{Bc}	+33,69 ^{Aa}
T7	94,00 ^{Ab}	-1,91 ^{Aa}	+20,84 ^{Ba}	92,70 ^{Abc}	-2,65 ^{Babc}	+28,53 ^{Ac}
T8	93,04 ^{Ab}	-1,75 ^{Aa}	+20,06 ^{Babc}	91,31 ^{Acd}	-2,62 ^{Babc}	+31,00 ^{Ab}
T9	94,36 ^{Ab}	-1,60 ^{Aa}	+19,28 ^{Bde}	94,13 ^{Abc}	-2,45 ^{Bab}	+26,50 ^{Ad}
T10	96,70 ^{Aab}	-1,90 ^{Aa}	+19,82 ^{Bbcd}	92,33 ^{Abcd}	-2,57 ^{Bab}	+28,80 ^{Ac}
T11	93,24 ^{Ab}	-1,87 ^{Aa}	+18,95 ^{Be}	98,00 ^{Aa}	-3,17 ^{Bc}	+33,69 ^{Aa}
T12	93,27 ^{Ab}	-1,85 ^{Aa}	+18,95 ^{Be}	98,80 ^{Aa}	-3,17 ^{Bc}	+33,69 ^{Aa}

^{A, B} Para cada linha letras maiúsculas sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) obtidas entre os diferentes períodos de armazenamento para cada tratamento.

^{a, b} Para cada coluna letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) obtidas entre os diferentes tratamentos para um mesmo período de armazenamento.

Tabela 4

Coefficientes de regressão múltipla dos modelos matemáticos^a para a variável resposta de índice de extensão da proteólise (IEP) do 1º e 21º dia de armazenamento (4 ± 1 °C) do queijo *cottage* simbiótico.

Coeficiente	IEP		
		1º DIA	21º DIA
	β_0	1,48*	- 7,63*
Linear	β_1	0,30	- 1,15
	β_2	- 0,42	- 4,92
Quadrático	β_{11}	0,006	0,03
	β_{22}	0,27	2,52
Interação	β_{12}	0,09	0,03
R_2		0,91	0,88

^a $Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \varepsilon$, onde Y= Índice de extensão da proteólise do 1º ou 21º dia de armazenamento;

X_1 = concentração de gordura e X_2 = concentração de inulina;

* = significativo a $p < 0,05$.

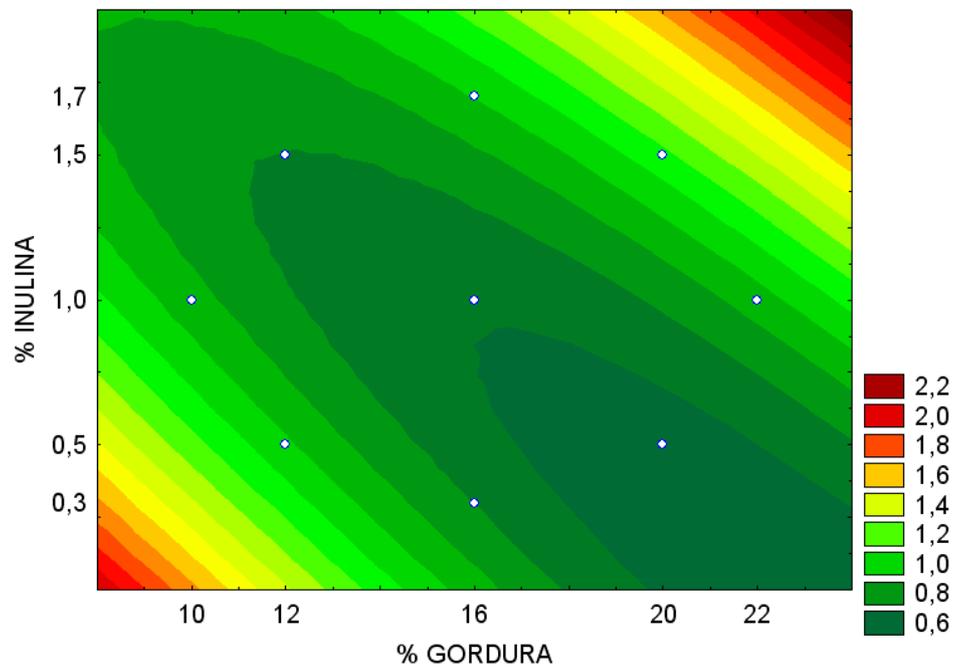
Tabela 5

Médias (n= 8) da avaliação dos parâmetros de textura instrumental no 1º e 21º dia de armazenamento (4 ± 1 °C) do queijo *cottage* simbiótico.

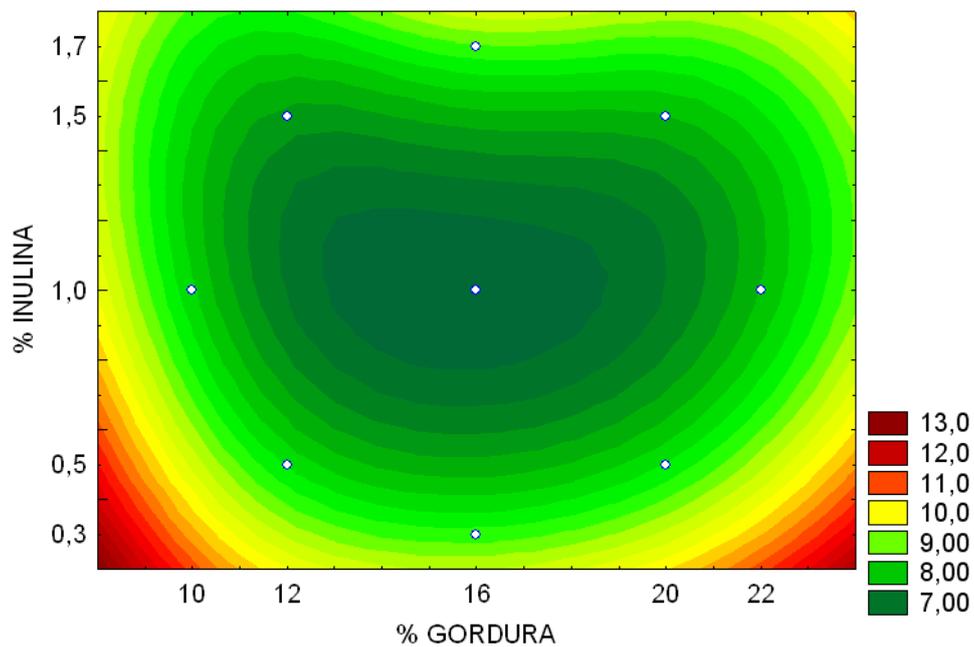
Amostras	Parâmetros					
	1º Dia			21º Dia		
	Firmeza (N)	Elasticidade	Adesividade (N s)	Firmeza (N)	Elasticidade	Adesividade (N s)
T1	1,478 ^{Bab}	0,840 ^{Bab}	-0,01,14 ^{Bab}	2,681 ^{Aa}	0,940 ^{Aa}	-1,021 ^{Bb}
T2	1,723 ^{Aa}	0,830 ^{Aab}	-0,0130 ^{Bab}	1,455 ^{Aa}	0,930 ^{Aa}	-0,151 ^{Ba}
T3	1,138 ^{Bbc}	0,870 ^{Aa}	-0,0127 ^{Bab}	2,453 ^{Aa}	0,950 ^{Aa}	-0,181 ^{Ba}
T4	0,985 ^{Bcd}	0,760 ^{Bab}	-0,0168 ^{Babc}	1,258 ^{Aa}	0,910 ^{Aa}	-0,522 ^{Bab}
T5	0,689 ^{Bd}	0,790 ^{Bab}	-0,0303 ^{Bc}	2,277 ^{Aa}	0,940 ^{Aa}	-3,910 ^{Bd}
T6	0,689 ^{Bd}	0,790 ^{Bab}	-0,0303 ^{Bc}	2,277 ^{Aa}	0,940 ^{Aa}	-3,910 ^{Bd}
T7	1,139 ^{Bbd}	0,720 ^{Bb}	-0,0049 ^B	1,613 ^{Aa}	0,960 ^{Aa}	-0,722 ^{Bab}
T8	0,943 ^{Bcd}	0,770 ^{Bab}	-0,0140 ^{Bab}	2,246 ^{Aa}	0,970 ^{Aa}	-1,909 ^{Bc}
T9	0,835 ^{Bcd}	0,770 ^{Bab}	-0,0212 ^{Bbc}	1,978 ^{Aa}	0,960 ^{Aa}	-0,605 ^{Bab}
T10	0,968 ^{Acđ}	0,740 ^{Bab}	-0,0130 ^{Bab}	1,333 ^{Aa}	0,970 ^{Aa}	-0,249 ^{Bc}
T11	0,689 ^{Bd}	0,790 ^{Bab}	-0,0303 ^{Bc}	2,277 ^{Aa}	0,940 ^{Aa}	-3,910 ^{Bd}
T12	0,689 ^{Bd}	0,790 ^{Bab}	-0,0303 ^{Bc}	2,277 ^{Aa}	0,940 ^{Aa}	-3,910 ^{Bd}

^{A, B} Para cada linha letras maiúsculas sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) obtidas entre os diferentes períodos de armazenamento para cada tratamento.

^{a, b} Para cada coluna letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) obtidas entre os diferentes tratamentos para um mesmo período de armazenamento.



(a)



(b)

Figura 1 – Superfície de resposta para o índice de extensão da proteólise (IEP) no 1º dia (a) e 21º dia (b) de armazenamento (4 ± 1 °C) do queijo *cottage* simbiótico.

4 DISCUSSÃO GERAL

O desenvolvimento e a procura por alimentos que possuam além das funções básicas nutricionais, benéficos múltiplos à saúde, têm apresentado grande destaque junto à indústria alimentícia e aos consumidores. Isso tem levado o conceito de alimentos funcionais a estender-se aos mais variados produtos, sendo que o setor lácteo apresenta a maior parte destes.

O leite e seus derivados destacam-se por ser uma importante fonte de nutrientes e vitaminas essenciais à dieta humana. Em contrapartida, nas últimas décadas o alto consumo de gordura de origem animal tem sido associado a doenças como câncer, obesidade, diabetes, problemas cardiovasculares e pressão alta. Assim, com a crescente procura por produtos lácteos com reduzido teor de gordura aliado a propriedades terapêuticas e qualidades sensoriais, torna-se necessário o desenvolvimento de novas pesquisas, visando à obtenção de novos produtos e técnicas para lácteos funcionais com baixo teor de gordura.

Com base no exposto acima, ressalta-se a importância de se desenvolver um produto lácteo com baixo teor de gordura adicionado de ingredientes com potencialidade funcional e sem perder as qualidades sensoriais. Assim, desenvolveu-se o presente estudo na tentativa de desenvolver uma formulação de queijo *cottage* com reduzido teor de gordura, suplementado com inulina, e com populações satisfatórias de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium* Bb-12, resultando em um produto seguro, saudável e funcional. Além de avaliar as características físico-químicas, microbiológicas, aceitação sensorial, perfil lipídico, verificar a possível influência do teor de gordura e inulina sobre as culturas de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium* Bb-12, bem como os prováveis efeitos destas sobre a textura, cor e preferência dos consumidores, nas diferentes formulações de queijo *cottage*.

Os resultados mostraram que as diferentes concentrações de gordura e inulina do queijo *cottage* influenciaram alguns parâmetros físico-químicos. Estas diferenças não afetaram a qualidade do produto, pois os resultados foram semelhantes a alguns estudos com o mesmo produto referenciados na literatura, e a amostras comerciais. Por não existir na legislação brasileira padrões específicos de identidade e qualidade para queijo *cottage*, a

comparação dos dados obtidos neste estudo, restringe-se aos de amostras comerciais e de outras pesquisas científicas com o mesmo tipo de queijo ou produtos similares. No entanto, existem poucas pesquisas relacionadas à viabilidade probiótica de queijo *cottage*, tornando restritas as comparações dos resultados deste estudo com outros trabalhos envolvendo este produto.

A viabilidade dos microrganismos foi garantida pelas propriedades físico-químicas do produto, pois estes mantiveram o número de células viáveis acima de 7 UFC g⁻¹ em todas as formulações durante os 21 dias de armazenamento. O destaque maior é dado às culturas probióticas de *Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus acidophilus*, que atingiram populações com níveis acima de 8 UFC g⁻¹ por todo o período de armazenamento na grande maioria dos tratamentos. Apesar das diferenças nos teores de gordura e inulina adotados, isso pouco influenciou as concentrações de ácidos graxos saturados e insaturados, além da quantidade de alguns destes ácidos ter favorecido a viabilidade das bifidobactérias. Estes resultados são importantes, pois mesmo com reduções nas concentrações de gordura e inulina, todas as formulações apresentaram a quantidade mínima satisfatória de probióticos recomendada para se obter efeitos benéficos à saúde.

Os parâmetros de cor e textura instrumental variaram significativamente ($p < 0,05$) durante o período de armazenamento para a maioria das formulações, provavelmente devido aos diferentes teores de gordura das formulações e a redução da umidade. Apesar disso, a qualidade sensorial do produto não foi afetada pelas diferentes concentrações das variáveis. Contudo, apesar dos gráficos de superfície de resposta verificar a interação entre os diferentes níveis de gordura e inulina e os parâmetros sensoriais, e apenas o termo linear de regressão múltipla ter sido significativo ($p < 0,05$) para o atributo aroma, há regiões nos gráficos que apontam maior aceitação para cada parâmetro. Assim, pode-se reduzir a concentração de gordura e variar o teor de inulina no queijo *cottage*, aos níveis estudados, sem afetar a aceitação geral do produto.

5 CONCLUSÕES

- O queijo *cottage* com reduzido teor de gordura, suplementado com inulina, é um produto que apresenta condições favoráveis a sobrevivência de culturas probióticas, pois manteve, durante todo o período de armazenamento, os níveis de *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium* Bb-12 acima da quantidade mínima recomendada para um produto probiótico.
- Apesar de ter ocorrido algumas diferenças significativas ($p < 0,05$), a adição de diferentes teores de gordura e inulina não afetaram as características físico-químicas, sensoriais e do perfil lipídico das formulações. Os diferentes teores de gordura das formulações podem ter influenciado a cor e textura instrumental dos queijos, mas apesar disso, mostraram-se adequadas para este tipo de queijo.
- Os diferentes teores de gordura e inulina, aos níveis estudados, não afetaram a viabilidade das culturas de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium* Bb-12 adicionadas ao queijo *cottage*. Igualmente, não foi observado efeito direto das culturas probióticas sobre a cor e textura instrumental.
- Pode-se inferir que é possível elaborar queijo *cottage*, nas condições deste estudo, com redução no teor de gordura e alta potencialidade funcional sem comprometer significativamente seus atributos sensoriais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, N.H. et al. Improving the textural proprieties of on acid coagulated (Karish) cheese using exopolysaccharide producing cultures. **LWT - Food Science and Technology**, Oxford, v. 38, n. 8, p. 843-847, 2005.

AKALIN, A.S.; FENDERYA, S.; AKBULUT, N. Viability and activity of bifidobacteria in yoghurt containing fructooligosaccharide during refrigerate storage. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 39, n. 6, p. 613-621, 2004.

AKALIN, A.S. et al. Occurrence of conjugated linoleic acid in probiotic yoghurts supplemented with fructooligosaccharide. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 9, p. 1089-1095, 2007.

ALVES, L.L. **Desenvolvimento de cream cheese simbiótico: caracterização e perfil lipídico com ênfase em ácido linoléico conjugado**. 2009. 128 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

AOAC. **Official methods of analysis**. 18th. ed. Washington, DC, USA: Association of Official Analytical Chemistry, 2005.

ARAGON-ALEGRO, L.C. et al. Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. **LWT - Food Science and Technology**, Oxford, v. 40, n. 4, p. 669-675, 2007.

ARAÚJO, E.A. et al. Developmente of a symbiotic cottage cheese added with *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 na inulin. **Jornal of Funtional Foods**, v. 2, n. 1, p. 85-87, 2010.

ARVANITOYANNIS, I.S.; VAN HOUWELINGEN-KOUKALIAROGLOU, M. Functional foods: a survey of health claims, pros and cons, and current legislation. **Food Science Nutrition**. v. 45, p. 385-404, 2005.

BANKS, J.M. The technology of low-fat cheese manufacture. **International Journal of Dairy**, v. 57, n. 4, p. 199-207, 2004.

BERGAMINI, C.V. et al. Probiotic bactéria as adjunt starters: influence of the addition methodology on their survival in a semi-hard Argentinean cheese. **Food Research International**, v. 38, p. 597-604, 2005.

BERGAMINI, C.V. et al. Proteolytic activity of three probiotic strains in semi-hard cheese as single and mixed cultures: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium lactis*. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 467-475, 2009.

BETORET, N. et al. Development of probiotic-enriched dried fruits by vacuum impregnation. **Journal of Food Engineering**, v. 56, p. 273-277, 2003.

BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA, A. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. **Food Research International**, v. 35, n. 2/3, p. 123-131, 2002.

BLANCHETTE, L. et al. Production of cottage cheese using dressing fermented by bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 1, p. 8-15, 1996.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal Biochemistry Physiology**, v. 27, p. 911-917, 1959.

BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. **Statistics for experimenters**. An introduction to design data analysis and model building. New York: Wiley, 1978. 653 p.

BOYLSTON, T.D. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 5, p. 375-387, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n. 68, de 12 de dezembro de 2006 (D. O. U. 14/ 12/ 2006)**. Dispõe dos Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Brasília, [20--?].

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n. 68, de 12 de dezembro de 2006 (D. O. U. 14/ 12/ 2006)**. Dispõe dos Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Brasília, [20--?].

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos**. IX - Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas, 2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_al_ega.htm. Acesso em 07 jan. 2010.

BURITI, F.C.A. **Desenvolvimento de queijo fresco cremoso simbiótico**. São Paulo, 2005. 86 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Área de Tecnologia de Alimentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

BURITI, F.C.A.; CARDARELLI, H.R.; SAAD, S.M.I. Textura instrumental e avaliação sensorial de queijo fresco cremoso simbiótico: implicações da adição de *Lactobacillus paracasei* e inulina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 1, p. 75-84, 2008.

BURITI, F.C.A. et al. Synbiotic potential of fresh cream cheese supplemented with inulin and *Lactobacillus paracasei* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*. **Food Chemistry**, v. 104, n. 4, p. 1605-1610, 2007.

BURITI, F.C.A.; ROCHA, J.S.R.; SAAD, S.M.I. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 12, p. 1279-1288, 2005a.

BURITI, F.C.A.; ROCHA, J.S.R.; SAAD, S.M.I. Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with addition of *Lactobacillus paracasei*. **LWT- Food Science and Technology**, v. 38, n. 2, p. 173-180, 2005b.

CARABIN, I. G.; FLAMM, W. G. Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fiber. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, San Diego, v. 30, p. 268-282, 1999.

CARDARELLI, H.R. et al. Functional petit-suisse cheese: measure of the prebiotic effect. **Anaerobe**, v. 13, n. 5/6, p. 200-207, 2007.

CARDARELLI, H.R. et al. Inulin and oligofructose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially synbiotic petit-suisse cheese. **LWT- Food Science and Technology**, v. 41, n. 6, p. 1037-1046, 2008.

CARABIN, I.G.; FLAMM, W.G. Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fiber. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, San Diego, v. 30, p. 268-282, 1999.

CHARTERIS, W.P. et al. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. **International Journal of Dairy Technology**, v. 51, n. 4, p. 123-136, 1998.

CHRISTIAN HANSEN. **Method for counting probiotic bacteria.** *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and Bifidobacteria in milk products made with nutritive cultures. [S.l.:s.n.], 1999. 5 p. **Analytical Proceedment.**

CIE - **Commission Internationale de l'Eclairage. Colorimetry.** 2. ed. Vienna: CIE publication, 1996.

CONWAY, P. Prebiotics and human health: the state of the art and future perspectives. **Scandinavian Journal of Clinical Nutrition**, v. 45, p. 13-21, 2001.

CORBO, M.R. et al. Microbiological and biochemical properties of Canestrato Pugliese hard cheese supplemented with bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 551–561, 2001.

CRUZ, A.G. et al. Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, n. 8, p. 344-354, 2009.

DAIRY PRODUCTS. United States Department of Agriculture. **National Agriculture Statistics Service**, USA, 2002.

DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. **International Dairy Journal**, v. 7, n. 5, p. 31-41, 1997.

DESAI, A.R.; POWELL, I.B.; SHAH, N.P. Survival and activity of probiotic lactobacilli in skim milk containing prebiotic. **Journal of Food Science**, v. 69, p. 57–60, 2004.

DEVEREUX, H.M. et al. Consumer acceptability of low fat foods containing inulin and oligofructose. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 5, p. 1850-1854, 2003.

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

DRAKE, M.A.; SWANSON, B.G. Reduced and low-fat cheese technology: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, n. 11, p. 366-369, 1995.

DROUAULT, S.; ANBA, J.; CORTIER, G. *Streptococcus thermophilus* is able to produce a β -galactosidase active during its transit in the digestive tract of germ-free mice. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 2, p. 938-941, 2002.

DRUNKLER, D.A. **Produção de requeijão simbiótico**. 2009. 180 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, 2009

DUTCOSKI, S.D. **Análise sensorial de alimentos**. Curitiba: Champagnat, 1996. 122 p.

EKINCI, F.Y et al. Effects of probiotic bacteria and oils on fatty acid profiles of cultured cream. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, p. 216-224, 2008.

FARKYE, N.Y. Cheese technology. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, n. 2/3, p. 91-98, 2004.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, 2001. 34 p. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf>. Acesso em: dez. 2009. [Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation].

FOX, P.F. et al. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen Publications, 2000, 587 p.

FRANCISQUETI, F.V.; BRAGA, C.P.; GOMES, M.I.F.V. Diferenças nutricionais entre queijo *cottage* produzido por método tradicional e enzimático, avaliação da preferência e ingestão média de leite e derivados por parcela da população. **Revista simbio-logias**, v. 2, n. 1, p. 102-113, 2009

FRITZEN-FREIRE, C.B. et al. The influence of *Bifidobacterium* Bb-12 and lactic acid incorporation on the properties of Minas Frescal cheese. **Journal of Food Engineering**, v. 96, n. 4, p. 621–627, 2010.

GARDINER, G. et al. Development of a probiotic cheddar cheese containing human-derived *Lactobacillus paracasei* strains. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 2192-2199, 1998.

GARDINER, G. et al. Evaluation of cheddar cheese as a food carrier for delivery of a probiotic strain to the gastrointestinal tract. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 7, p. 1379-1387, 1999.

GILLILAND, S.E. Probiotics and Prebiotics. In: MARTH, E. H.; STEELE, J. L. (Eds.). **Applied Dairy Microbiology**. New York: Marcel Dekker, 2001. p. 327-343

GOBBETTI, M. et al. Production of Crescenza cheese by incorporation of bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 37–47, 1998.

GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, Oxford, v. 10, n. 4/5, p. 139-157, 1999.

GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. Development of probiotic cheese manufactured from goat milk: response surface analysis via technological manipulation. **Journal Dairy Science**, v. 81, n. 6, p. 1492-1507, 1998.

GUARNER, F.; MALAGELADA, JR. Gut flora in health and disease. **The Lancet**, v. 360, p. 512-519, 2003.

HARDY, J.X. Nutraceuticals and functional foods: introduction and meaning. **Nutrition**, v. 16, p. 688-697, 2000.

HELLER, K.J. et al. Cheese and its potential as a probiotic food. In: FARNWORTH, E.R. (Ed.). **Handbook of fermented functional foods**. Boca Raton: CRC Press, 2003. p. 203-225.

HENNELLY, P.J. et al. Textural, rheological and microstructural properties of imitation cheese containing inulin. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 75, n. 3, p. 388-395, 2006.

HOLS, P. et al. New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. **FEMS Microbiology, Reviews**, v. 29, n. 3, p. 435-463, 2005.

HOLZAPFEL, W.H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. **Food Research International**, v. 35, n. 2/3, p. 109-116, 2002.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Detection and enumeration of *Lactobacillus acidophilus***. [S.l.: s.n.], 1999. p. 23-33. (Bulletin of the IDF, 306).

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Yogurt: enumeration of characteristic microorganisms**. [S.l.]: IDF/ISO Standard, 1997. 5 p.

ISEPON, J. S. **Variação no índice de proteólise e aceitabilidade do queijo tipo Minas frescal**. São Paulo, 1999. 110 f.. Tese de doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

KAILASAPATHY, K. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, n. 10, p. 1221-1227, 2006.

KAILASAPATHY, K.; CHIN, J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. **Immunology & Cell Biology**, v. 78, n. 1, p. 80–88, 2000.

KASIMOGLU, A.; GÖNCÜOĞLU, M; AKGÜN, S. Probiotic white cheese with *Lactobacillus acidophilus*. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 12, p. 1067-1073, 2004.

KELLY, D.; KING, T.; AMINOV, R. Importance of microbial colonization of the gut in early life to the development of immunity. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 622, n. 1/2, p. 58-69, 2007.

KIP, P. et al. Inulins improve sensoric and textural properties of low-fat yoghurts. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 9, p. 1098-1103, 2006.

KIMURA, Y.O. Alimentos simbióticos. **Revista Indústria de Laticínios**, São Paulo, n. 40, p. 22-23, 2002.

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

LEE, S.K.; KLOSTERMEYER, H. The effect of pH on the rheological properties of reduced-fat model processed cheese spreads. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 34, p. 288-292, 2001.

LOSADA, M.A.; OLLEROS, T. Towards a healthier diet for the colon: the influence of fructooligosaccharides and lactobacilli on intestinal health. **Nutrition Research**, Ontário, v. 22, n. 1/2 p. 71-84, 2002.

MÄKELÄINEN, H. et al. Probiotic lactobacilli in a semi-soft cheese survive in the simulated human gastrointestinal tract. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 11, p. 675-683, 2009.

MARTÍN-DIANA, A.B. et al. Development of a fermented goat's milk containing probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 10, p. 827-833, 2003.

MATER, D. D. G. et al. *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* survive gastrointestinal transit of healthy volunteers consuming yogurt. **Fems Microbiology Letters**, v. 250, n. 2, p. 185-187, 2005.

MATTILA-SANDHOLM, T.; SAARELA, M. **Functional Dairy Products**. New York: CRS Press, 2003. 395 p.

MICHIDA, H. et al. Effect of cereal extract and cereal fiber on viability of *Lactobacillus plantarum* under gastrointestinal tract conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 28, p. 73-78, 2006

MISTRY, V.V. Low fat cheese technology. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 413-422, 2001.

MISTRY, V.V.; ANDERSON, D.L. Composition and microstructure of commercial full-fat and low-fat cheeses. **Food Structure**, v. 12, p. 259–266, 1993.

HAULY, M. C. O.; MOSCATTO, J. A. Oligofruktoses: uma revisão sobre propriedades funcionais, efeito prebiótico e importância na indústria de alimentos **Semina: Ciências Exatas e Tecnológica**, Londrina, v. 23, n. 1, p. 105-118, 2002.

MURPHY, O. Non-polyol low-digestible carbohydrates: food applications and functional benefits. **Brazilian Journal of Nutrition**, v. 85, n. 1, p. 47-53, 2001.

NEVEN, E. Inulina e oligofruktose – ingredientes multifuncionais para o desenvolvimento de produtos lácteos. **Leite e Derivados**, São Paulo, n. 61, p. 32-37, 2001.

NINESS, K. R. Inulin and oligofruktose: what are they? **Journal of Nutrition**, v. 129, p. 1402-1406, 1999.

OLIVEIRA, R.P.S. et al. Effect of different prebiotics on the fermentation kinetics, probiotic survival and fatty acids profiles in nonfat symbiotic fermented milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, n. 3 p. 467-472, 2009.

OLIVEIRA, R.P.S. et al. Effect of inulin on growth and acidification performance of different probiotic bacteria in co-cultures and mixed culture with *Streptococcus thermophilus*. **Journal of Food Engineering**, v. 91, n. 1, p. 133-139, 2009.

ONG, L. et al. Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *L. Casei*, *L. paracasei* and *Bifidobacterium* spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 446–456, 2006.

ONG, L.; HENRIKSSON, A.; SHAH, N.P. Proteolytic pattern and organic acid profiles of probiotic Cheddar cheese as influenced by probiotic strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. paracasei*, *Lb. casei* or *Bifidobacterium* sp. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 1, p. 67–78, 2007.

ÖZER, D.; AKIN, S.; ÖZER, B. Effect of inulin and lactulose on survival of *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-02 in acidophilus-bifidus yoghurt. **Food Science and Technology International**, v. 11, n. 1, p. 19-26, 2005.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R. et al. Development of functional ingredients for gut health. **Trends in Food Science and Technology**, v. 13, p. 3-11, 2002.

RANADHEERA, R.D.C.S.; BAINES, S.K.; ADAMS, M.C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, v. 43, n.1, p. 1-7, 2009.

REID, G. et al. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 37, n. 2, p. 105-118, 2003.

ROBERFROID, M.B. Prebiotics and synbiotics: concepts and nutritional properties. **British Journal Nutrition**, v. 80, p. 197-202, 1998.

ROBERFROID, M.; SLAVIN, J. Nondigestible oligosaccharides. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, n. 6, p. 461-480, 2000.

ROBERFROID, M.B. **Functional food concept and its application to prebiotics**. Digestive and Liver Disease. Rome, v. 34, p. 105-110, 2002

ROBERFROID, M. **Inulin-type fructans: functional food ingredients**. New York: CRC Press, 2005

RODRIGUES, F.C. **Lácteos especiais**. Juiz de Fora: Concorde Editora Gráfica, 1999. 151 p.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 1. ed. Campinas: Casa do Pão Editora Brasil, 2005.

ROSS, R.P. et al. Cheese delivering biocultures-probiotic cheese. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 57, n. 2, p. 71–78, 2002.

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

RYHÄNEN, E.L.; PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A.; PAHKALA, E. A new type of ripened low-fat cheese with bioactive properties. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 4/7 p. 441-447, 2001.

SAARELA, M. et al. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v. 84, n. 3, p. 197-215, 2000.

SAINT-EVE, A. et al. Reducing salt and fat content: Impact of composition, texture and cognitive interactions on the perception of flavoured model cheeses. **Food Chemistry**, v. 116, n. 1, p. 167-175, 2009.

SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Intestinal colonization, microbiota, and probiotics. **Journal of Pediatric**, New York, v. 149, p. 115-120, 2006.

SANDERS, M.E.; KLAENHAMMER, T.R. Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NcFM functionality as a probiotic. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 319-331, 2001.

SANDERS, M.E. **Probiotics**: considerations for human health. Nutrition. Review, New York, v. 61, n. 3, p. 91-99, 2003.

SANTOS, L.F.; KOBLITZ, M.G.B., Proteases. In: KOBLITZ, M.G.B. (Ed.). **Bioquímica de Alimentos**: teoria e aplicações práticas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 77-106.

SANZ, Y. Ecological and functional implications of the acidadaptation ability of *Bifidobacterium*: a way of selecting improved probiotic strains. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 11, p. 1284-1289, 2007.

SBAMPATO, C.G.; ABREU, L.R.; FURTADO, M.M. Queijo gorgonzola fabricado com leite pasteurizado por ejetor de vapor e HTST: Parâmetros físico-químicos e sensoriais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 1, p. 191-200, 2000.

SCHEINBACH, S. Probiotics: functionality and commercial status. **Biotechnology Advanced**, v. 16, n. 3, p. 581-608, 1998

SHAH, N.P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 11, p. 1262-1277, 2007.

SHAH, N.P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 4, p. 894-907, 2000.

SHAH, N.P. et al. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. **International Dairy Journal**, v. 5, n. 5, p. 515-521, 1995.

SHORTT, C.; O'BRIEN, J. **Handbook of functional dairy products**. Washington: CRC Press, 2004. 294 p.

SOUSA, M.J.; ARDO, Y.; MCSWEENEY, P.L.H. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 4/7, p. 327-345, 2001.

SOUZA, C.H.B; SAAD, S.M.I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La-5 added solely or in co-culture with a yoghurt starter culture and implications on physico-chemical and related properties of Minas fresh during storage. **LWT-Food Science and Technology**, v. 42, n. 2 p. 633-640, 2009.

SOUZA, G. **Tecnologia do queijo cottage por processo modificado**. São Paulo: ITAL, 1986. 37 p. (Instruções técnicas, n. 21).

SOUZA, C.H.B. **Influência de uma cultura starter termofílica sobre a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e as características de queijo minas frescal probiótico**. 2006. 110 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) Universidade de São Paulo. São Paulo, 2006.

STAMPANONI, C.R.; NOBLE, A.C. The influence of fat and salt on the perception of selected taste and texture attributes of cheese analogs. A scalar study. **Journal of Texture Studies**, v. 22, p. 367-380, 1991.

STATON, C. et al. Probiotic cheese. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 491-497, 1998.

STATON, C. et al Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, p. 198-203, 2005.

TAMIME, A.Y.; ROBINSON, R.K. **Tamime and Robinson's yoghurt: science and technology**. 3. ed. Cambridge: CRC, 2007. 791 p.

TUNICK, M.H. et al. Reorganization of casein Submicelles in Mozzarella cheese during storage. **International Dairy Journal**, v. 7, n. 2/3, p. 149-155, 1997.

UYSAL, H. et al. Some properties of set yoghurt made from caprine milk and bovine-caprine milk mixtures fortified by ultrafiltration or the addition of skim milk powder. **International Journal of Dairy Technology**, v. 56, n. 3. p. 177-181, 2003.

VINDEROLA, C.G. et al. Viability of probiotic *Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* and nonprobiotic microflora in Argentinian fresco cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 9, p. 1905-1911, 2000.

VINDEROLA, C.G.; BAILO, N.; REINHEIMER, J.A. Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. **Food Research. International**, Amsterdam, v. 33, p. 97-102, 2000.

VORAGEN, A.G.J. Technological aspects of functional food-related carbohydrates. **Trends Food Science & Technology**, v. 9, p. 328-335, 1998.

WALSTRA, P. et al. Milk components. **In Dairy technology: principles of milk properties and processes**. New York: Marcel Dekker, 1999. p. 27-105.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J.T.M.; GEURTS, T.J. **Dairy science and technology**. 2. ed. New York: Taylor & Francis, 2006. cap. 5, p. 175-202.

YADAV, H.; JAIN, S.; SINHA, P.R. Production of free fatty acids and conjugated linoléico acid in probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* during fermentation and storage. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 8, p. 1006-1010, 2007.

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, p. 473-479, 1998.

ANEXOS

**ANEXO A – Carta de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa -
UFSM**

 <p align="center">MINISTÉRIO DA SAÚDE Conselho Nacional de Saúde Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)</p>	<p align="center">UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa Comitê de Ética em Pesquisa - CEP- UFSM REGISTRO CONEP: 243</p> 
--	---

CARTA DE APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa – UFSM, reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – (CONEP/MS) analisou o protocolo de pesquisa:

Título: Desenvolvimento e caracterização de queijo cottage suplementado com prebiótico e probiótico

Número do processo: 23081.013828/2009-17

CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética): 0234.0.243.000-09

Pesquisador Responsável: Neila Silva Pereira dos Santos Richards

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes estabelecidas na Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê. O pesquisador deve apresentar ao CEP:

JANEIRO/ 2010- Relatório final

Os membros do CEP-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO: 17/11/2009

Santa Maria, 18 de novembro de 2009.



Edson Nunes de Moraes
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa-UFSM
Registro CONEP N. 243.

ANEXO B – Ficha de avaliação sensorial por escala hedônica

Nome: _____

Data: _____

ANÁLISE SENSORIAL DE QUEIJO *COTTAGE*

Você está recebendo quatro amostras de queijo *cottage*. Por favor, assinale uma nota (número) para cada parâmetro conforme a legenda abaixo:

<i>Parâmetro/Amostra</i>	561	240	484	171
Aparência global				
Cor				
Aroma				
Textura				
Acidez				
Sabor				

Legenda:

1 – Desgostei muitíssimo

2 – Desgostei muito

3 – Desgostei

4 – Indiferente

5 – Gostei

6 – Gostei muito

7 – Gostei muitíssimo

ANEXO C - Ficha de avaliação sensorial por teste de ordenação

Nome: _____

Data: _____

ANÁLISE SENSORIAL DE QUEIJO *COTTAGE*

Você está recebendo quatro amostras de queijo *cottage*. Por favor, ordene as amostras de acordo com a sua preferência, colocando em primeiro lugar a que você mais gostou e por último a que você menos gostou.

1º lugar: _____**2º lugar:** _____**3º lugar:** _____**4º lugar:** _____

ANEXO D - Normas para publicação na Revista Ciência Rural

1. CIÊNCIA RURAL - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias que deverão ser destinados com exclusividade.

2. Os artigos científicos, revisões e notas devem ser encaminhados via eletrônica editados em idioma Português ou Inglês, todas as linhas deverão ser numeradas e paginados no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297 mm, com no máximo, 25 linhas em espaço duplo, as margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman, tamanho 12. **O máximo de páginas será 15 para artigos científicos, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e ilustrações.** Cada figura e ilustração deverá ser enviado em arquivos separados e constituirá uma página (cada tabela também constituirá uma página). **Tabelas, gráficos e figuras não poderão estar com apresentação paisagem.**

3. O artigo científico deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão e Referências. Agradecimento(s) ou Agradecimento (s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal, quando for necessário o uso deve aparecer antes das referências. **Antes das referências deverá também ser descrito quando apropriado que o trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética e Biossegurança da instituição e que os estudos em animais foram realizados de acordo com normas éticas.** (Modelo.doc, .pdf).

4. A revisão bibliográfica deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; e Referências. Agradecimento(s) ou Agradecimento (s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal, devem aparecer antes das referências. **Antes das referências deverá também ser descrito quando apropriado que o trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética e Biossegurança da instituição e que os estudos em animais foram realizados de acordo com normas éticas.** (Modelo .doc, .pdf).

5. A nota deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com introdução; metodologia; resultados e discussão e conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências. Agradecimento(s) ou Agradecimento (s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal, caso existam devem aparecer antes das referências. **Antes das referências deverá também ser descrito quando apropriado que o trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética e Biossegurança da instituição e que os estudos em animais foram realizados de acordo com normas éticas.** (Modelo .doc, .pdf).

6. Não serão fornecidas separatas. Os artigos estão disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista www.scielo.br/cr.

7. Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título.

O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave e resumo e demais seções quando necessários.

8. As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

9. As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.

9.1. Citação de livro:

JENNINGS, P.B. **The practice of large animal surgery**. Philadelphia: Saunders, 1985. 2 v.

TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus : INPA, 1979. 95p.

9.2. Capítulo de livro com autoria:

GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. **The thyroid**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

9.3. Capítulo de livro sem autoria:

COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: _____. **Sampling techniques**. 3.ed. New York : John Willey, 1977. Cap.4, p.72-90. TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: _____. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo : Roca, 1985. p.29-40.

9.4. Artigo completo:

Sempre que possível o autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers) conforme exemplos abaixo:

MEWIS, I.; ULRICHS, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Product Research**, Amsterdam (Cidade opcional), v.37, p.153-164, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)>. Acesso em: 20 nov. 2008. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.

PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Resposta de *Sitophilus oryzae* (L.), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) e *Oryzaephilus surinamensis* (L.) a diferentes concentrações de terra de diatomácea em trigo armazenado a granel. **Ciência Rural** , Santa Maria (Cidade opcional), v. 38, n. 8, nov. 2008 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 25 nov. 2008. doi: 10.1590/S0103-84782008000800002.

9.5. Resumos:

RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria: Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236.

9.6. Tese, dissertação:

COSTA, J.M.B. **Estudo comparativo de algumas características digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad)**. 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria.

9.7. Boletim:

ROGIK, F.A. **Indústria da lactose**. São Paulo: Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20).

9.8. Informação verbal:

Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

9.9. Documentos eletrônicos:

MATERA, J.M. **Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico**. São Paulo: Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD.

GRIFON, D.M. Arthroscopic diagnosis of elbow displasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic. **Proceedings...** Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Acessado em 12 fev. 2007. Online. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>

UFRGS. **Transgênicos**. Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.zh.com.br/especial/index.htm>

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. **Maturitas**, (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: [http://www. Medscape.com/server-java/Medline SearchForm](http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm)

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. **Anais...** Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC.

- 10.** Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadros. As figuras devem ser enviadas à parte, cada uma sendo considerada uma página. Os desenhos figuras e gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre em qualidade máxima com pelo menos 800 dpi em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda. Também devem apresentar a seguinte formatação que se encontra nesse exemplo.
- 11.** Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).
- 12.** Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderão ser utilizados.
- 13.** Lista de verificação (Checklist .doc, .pdf).
- 14.** Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.
- 15.** Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.
- 16.** Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.

ANEXO E – Normas para publicação no periódico *International Dairy Journal*

Guide for Authors

Functional Dairy Foods 2009 will be held in Melbourne, Australia from 24-25 February 2009. For further information and registration, visit the website <http://www.diaa.asn.au>.

Aims and Scope *International Dairy Journal* publishes original, refereed research papers and critical reviews that advance scientific knowledge of all aspects of dairy science and technology. Within this scope, the journal pays particular attention to applied research and to the interface of the dairy and food industries. The journal provides a platform for the communication of research in dairy science that is of broad relevance to the international community, including the research and development of dairy and allied products from milk of bovine and non-bovine species. The journal's coverage includes: • Biosynthesis, chemistry and physico-chemical properties of milk constituent • Microbiology, enzymology, biotechnology and bioengineering

- Dairy engineering and new developments in processing • Relevant emulsion science, food structure and texture.
- Raw material quality and effect on relevant products • Flavor and off-flavor development.
- Product development and usage of dairy ingredients in other foods.
- Relevant sensory science/consumer studies.
- Analytical, health and environmental aspects. *International Dairy Journal* does not publish papers related to milk production, feeding, cow health and other aspects of on-farm milk production, unless there is a clear relationship to dairy technology, human health or final product quality.

Submission of Papers

As of 19 September 2007, submission of all types of manuscripts to *International Dairy Journal* proceeds totally online. Via the Elsevier Editorial System (EES) website for this journal (<http://ees.elsevier.com/inda>) you will be guided step-by-step through the creation and uploading of the various files. The system automatically converts source files to a single Adobe Acrobat PDF version of the article, which is used in the peer review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail generated by EES and via the author's homepage on EES, removing the need for a hard copy paper trail. Authors must submit revisions via EES. All manuscripts must be addressed to the submissions office, c/o the Editor-in-Chief. Any manuscript sent as an email attachment to the Editor-in-Chief will not be processed. The Editor-in-Chief reviews all manuscripts and, after prescreening, makes a decision whether to assign them to handling Editors to initiate peer review. The authors may be contacted by the Editor-in-Chief or the handling Editor for any required changes before a manuscript is sent to reviewers. Authors may send queries concerning the submission process, manuscript status or journal procedures to support@elsevier.com. Questions regarding content of a proposed submission can be directed to the Editor-in-Chief: International Dairy Journal/c/o Professor P. Jelen, Editor-in-Chief University of Alberta Alberta, Canada-mail: idx.jelen@interbaun.com Authors are also

requested to provide the names and e-mail addresses of at least three potential referees who are expert in the field. It is the journal's policy to keep the peer review process anonymous. The name of a reviewer will only be revealed with the approval of the reviewer. When submitting a manuscript, authors may indicate names of experts who are not suitable/appropriate for reviewing the paper. It is the author's responsibility to ensure that papers are written in clear and comprehensible English. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by a colleague with fluency in technical writing in English prior to submission. English language help service: Upon request, Elsevier will direct authors to an agent who can check and improve the language of their paper (before submission). Please contact support@elsevier.com for further information.

Authors are strongly advised that papers not conforming to the required standards will be rejected without review. Plagiarism and Ethical Concerns

Submission of a paper

implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the publisher. By submitting this manuscript, the authors agree that text, equations, or figures from previously published articles or books have been clearly identified in full and their origin clearly explained in the adjacent text, with appropriate references given at the end of the paper. Duplication of text is rarely justified, even with diligent referencing. Exceptions may be made for descriptions of standard experimental techniques, or other standard methods used by the author in the investigation; but an appropriate citation is preferable. Authors who duplicate material from their own published work in a new article, without clearly identifying the repeated material and its source as outlined above, are selfplagiarising.

Submission of Revised Papers Revised papers received more than three months after reviewers' comments were sent may be treated as new submissions, at the discretion of the Editor. If the author has not replied to reminders/enquiries about revisions within 6 months, the paper will be considered to have lapsed, and any subsequent submission will be treated as a new submission and must be submitted to the journal using the above process, addressed to the Editor-in-Chief, with an explanation that it had previously been submitted to the journal.

Submission Checklist

It is hoped that this list will be useful during the final checking of an article prior to submitting it to the journal for review. Please consult these Instructions for Authors for further details of any item. Ensure that the following items are present:

- One author designated as corresponding author, with E-mail address, full postal address, telephone and fax numbers
- All necessary files have been uploaded
- All figure captions (on a separate page)
- All tables (including title, description, footnotes)
- Manuscript has been "spellchecked" and units and abbreviations checked
- References are in the correct format for this journal

- All references mentioned in the reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Colour figures are clearly marked as being intended for colour reproduction on the Web (free of charge) and in print (charges will apply) or to be reproduced in colour on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only colour on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes. For any further information please contact the Author Support Department at authorsupport@elsevier.com

Types of Contribution *Original full-length research papers* should contain material that has not been previously published elsewhere, except in a preliminary form. These papers should not exceed 6000-8000 words (text and references) or about 25 manuscript pages. *Review papers* will be accepted in areas of topical interest and will normally emphasise literature published over the previous five years. *Short Communications* are research papers constituting a concise but complete description of a limited investigation, which will not be included in a later paper. Short Communications should be as completely documented, both by reference to literature, and description of the experimental procedures employed, as a regular paper. They should not occupy more than 2,000 words or about 8 manuscript pages, including figures, tables and references. They will be reviewed in the same way as research papers. *Letters to the Editor* are published from time to time on subjects of topical interest. *Book reviews* are commissioned by the Editors as warranted. Unsolicited book reviews are generally not considered.

Manuscript Preparation General: Manuscripts must be typewritten with a font size of 12 pt, with wide margins and double-spaced throughout, i.e. including the abstract, footnotes and references. Lines should be numbered consecutively throughout the manuscript. Authors should consult a recent issue of the journal for style. The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity. Manuscripts can be written in either British or American English, but language and spellings must be consistent. Authors should retain a copy of their manuscript for their records. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc. must be numbered. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Each line must also be numbered. In typing the manuscript, titles and subtitles should not be run within the text. They should be typed on a separate line, without indentation. Use lower-case letter type. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers. Underline words that should be in italics, and do not underline any other words. The usage of italics should be limited to microbiological terms. Use the computer automatic return at the end of lines; use double returns after the end of paragraphs only. Manuscripts in general should be organized in the following order:

- Title (should be clear, concise, and should unambiguously reflect the paper's contents)
- Name(s) of author(s)
- Complete postal address (es) of affiliations
- Full telephone number, fax number and e-mail address of the corresponding author
- Present address (es) of author(s) if applicable
- Complete correspondence address to which the proofs should be sent
- Abstract - each paper must be submitted with an Abstract **not exceeding 150 words**, reporting concisely on the major findings. Many abstracting services use abstracts without

modification, so this section should be comprehensible in its own right. References should not be cited. Abbreviations should be avoided; if absolutely necessary they must be defined.

- Introduction - briefly review important prior publications and state the reasons for the investigation being reported.
- Materials and methods - description of methods, equipment and techniques (including statistical treatments used in the research)
- Results
- Discussion (may be combined with the results section) • Conclusions (must not reiterate any discussion or introductory comments, they must be genuine conclusions drawn from the results of the study)
- Acknowledgements and any additional information concerning research grants, etc.
- Appendix (e.g. list of abbreviations used)
- References
- Tables
- Figure captions
- Illustrations/figures.

Note: Keywords are no longer required for submissions to *International Dairy Journal*

Following the *Introduction*, authors are free to structure papers as appropriate. However, for the sake of clarity and uniformity, the above or similar section headings are recommended. If necessary, each section may be divided into further subsections, but do not use more than two levels for subtitles. The *Materials and Methods* section must provide enough detail that a competent worker can repeat the experiments. However, detailed descriptions of well-known methods should be avoided in the experimental section. References to the relevant literature are sufficient. The *Results* section should present clearly and succinctly the most important research results including statistical significance of the data being reported. The *Discussion* should not be a compilation of current literature, but a consideration of the significance and consequences of the authors' present findings. Each paper should contain a paragraph of *Conclusions* summarising the main aspects of the research being reported.

Units and Abbreviations System International (SI) units must be used. You may wish to consult the website of the Bureau International des Poids et Mesures for guidance, <http://www1.bipm.org/en/si>. Abbreviations for units should follow British Standards Institute standard *SI units and recommendations for the use of their multiples and of certain other units* (BS ISO 1000:1992, supersedes BS 5555). Further information is available on the BSI website <http://www.bsiglobal.com>. The unit 'litre' must be abbreviated as 'L' (also mL, μ L, etc.). Use the negative index system for all combinations of unit abbreviations (e.g. g mL, not g/mL). However, the solidus can be used in cases of % w/w or % w/v. The unit billion (10^9 in America, 10^{12} in Europe) must not be used as it is ambiguous. In general, the journal follows the conventions of the *CBE Style Manual* (Council of Biology Editors, Bethesda, MD, 1983, 5th edn). Follow *Chemical Abstracts* and its indexes for chemical names. Enzyme nomenclature should follow the IUBMB Enzyme Commission recommendations (<http://www.chem.qmul.ac.uk/enzyme/>) (relevant EC numbers should be given). Standard abbreviations of units of measurement should be used to identify the data. Please ensure that all figures have axes labeled properly, and the quantities on the axes specify the units used (use the negative index system, e.g. g mL⁻¹, not g/mL). Tables should not duplicate results presented in the manuscript as a different form (e.g. in graphs). Abbreviations should be defined in brackets after their first mention in the text. Standard units of measurements and chemical symbols of elements may be used without definition in the body of the paper.

Tables Tables should be numbered consecutively and given a suitable caption. Each table should be typed on a separate sheet. **Do not include the Figures or Tables in the body of the manuscript.** Tables and their footnotes should be typed using a readable uniform font of the same size as that used in the text. Do not use bold letters, or italics (except for microbiological terms or gene nomenclature). Each table should have a brief and self-explanatory title. The text should include reference to all tables. Footnotes to tables should be typed below the table and should be referred to by superscript lowercase letters. No vertical rules should be used; leave extra space between the columns instead. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory.

Formulae and Equations

- Formulae must be typewritten, each on a separate line. Leave ample space around the formulae.
- Subscripts and superscripts should be clear.
- All symbols used in the formulae should be explained in the margin where they are first used. Take special care to show clearly the difference between zero (0) and the letter O, and between one (1) and the letter l.
- Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.
- For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.
- All equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses.
- The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Also powers of e are often more conveniently denoted by exp
- Levels of statistical significance which can be mentioned without further explanation are $P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.001$.
- In chemical formulae, valence of ions must be given as e.g. Ca^{2+} and CO_3^{2-} , not as Ca^{++} or CO_3^{--} .
- Isotope numbers should precede the symbols, e.g. ^{18}O .
- The repeated writing of complicated chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound followed by its abbreviation (ethylene-diamine-tetra-acetic acid, EDTA) should be given in full. The abbreviation is to be used in the case of a very long name or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P^{2}O^5).

Footnotes

Footnotes should be avoided unless absolutely essential. In most cases it should be possible to incorporate the information in normal text. If used, they should be numbered in the text, indicated by superscript numbers, and kept as short as possible.

References

Please note: Requirements for citations in text and listing of authors names in references have been changed, and will take effect for all papers submitted after 1 September 2007.

Responsibility for the accuracy of bibliographic citations lies entirely with the authors. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list. Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list at the end of the manuscript (and vice versa). All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
3. Three or more authors: first author's name followed by et al. and the year of publication.

Citations may be made directly or parenthetically. Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown..." The list of references must be arranged alphabetically on authors' names, and should be as full as possible, **listing all authors**, the full title of articles and full title of journals, publisher and year. Titles of periodicals mentioned in the list of references must be spelled out in full. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added. References concerning unpublished data and "personal communications" must not be cited in the reference list but may be mentioned in the text, giving the full details (name and affiliation of the contact). References included in the reference list as "in press" should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication data with "in press". Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication. In the final publication, material referenced as "submitted" is not acceptable - if it cannot be referenced as "in press" then the text needs to be revised to state "unpublished results" and the reference deleted from the reference list. *Citing and listing of web references.* As a minimum, the full website address (URL) should be given. Any further information, if known (author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list. Use of web references should be minimised and limited to verifiable, credible sources only. The following are examples of reference layouts. Please use a hanging indent (second and subsequent lines indented).

Reference to a chapter in a monograph:

Maubois, J.-L., & Olivier, G. (1992). Milk protein fractionation. In *New applications of membrane processing* (pp. 112-120). Brussels, Belgium: International Dairy Federation.

Reference to a chapter in a book

De Kruijff, C. G., & Holt, C. (2003). Casein micelle structure, functions and interactions. In P. F. Fox, & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Advanced dairy chemistry, Vol. 1: Proteins* (3rd ed) (pp.233-276). New York, NY, USA: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Reference to an article in a journal:

Lane, C. N., & Fox, P. F. (1997). Role of starter enzymes during ripening of Cheddar cheese made from pasteurized milk under controlled microbiological conditions. *International Dairy Journal*, 7, 55-63.

Note: If necessary, cite issue number if page numbering is not continuous.

Reference to a book:

Marsh, D. (1990). *CRC handbook of lipid bilayers*. Boston, MA, USA: CRC Press.

Reference to a published standard:

IDF (1982). *Cheese and processed cheese-determination of total solids content*. IDF Standard 4a. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.

Reference to a paper in published conference proceedings:

Maubois, J. L. (1998). Fractionation of milk proteins. In *Proceedings of the 25th International Dairy Congress* (Vol. II, pp. 74-86). Dairy Science and Technology: Aarhus, Denmark.

Reference to a thesis:

Alting, A. C. (2003). Cold gelation of globular proteins. PhD Thesis, Wageningen University, The Netherlands.

Note: The thesis should be publicly available.

Reference to an article in an internet-only source:

Bryant, P. (1999). *Biodiversity and Conservation*. Retrieved October 4, 1999, from darwin.bio.uci.edu/~sustain/bio65/Titlepage.htm

Illustrations

Photographs, charts and diagrams are all to be referred to as "Figure(s)" and should be numbered consecutively in the order to which they are referred. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text. All illustrations should be clearly marked with the figure number. All figures are to have a caption. Captions should be supplied on a separate sheet. If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please note: Because of technical complications which can arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version should you not opt for colour in print) please submit in addition usable black and white prints corresponding to all the colour illustrations. *Preparation of electronic illustrations* General points• Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.

- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Helvetica, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide all illustrations as separate files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions> You are urged to visit this site.

Preparation of Supplementary Data

Elsevier now accepts electronic supplementary material (e-components) to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the Author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including Science Direct: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the final version of the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Copyright

All authors must sign the 'Transfer of Copyright' agreement before the article can be published. (for more information on copyright see

<http://www.elsevier.com/locate/authorsrights>). This transfer agreement enables Elsevier Ltd to protect the copyrighted material for the authors, but does not relinquish the author's proprietary rights. The copyright transfer covers the exclusive rights to reproduce and distribute the article, including reprints, photographic reproductions, microfilm or any other reproductions of similar nature and translations. It includes the right to adapt the article for use in conjunction with computer systems and programs, including the reproduction or publication in machine-readable form and incorporation in retrieval systems. An author, when quoting from someone else's work or when considering reproducing an illustration or table from a book or journal article, should make sure that copyright is not being infringed. Authors are responsible for obtaining from the copyright holder permission to reproduce and figures for which copyright exists. Although in general an author may quote from other published works, permission from the holder of the copyright should be obtained if substantial extracts are taken or tables, plates, or other illustrations are reproduced. If the copyright-holder is not the author of the quoted or reproduced material, it is recommended that the permission of the author should also be sought. Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained. A suitable acknowledgement of any borrowed material must always be made. Elsevier has preprinted forms for use by Authors: contact Elsevier's Rights Department, Oxford, UK: phone (+44) 1865 843830, fax (+44) 1865 853333, e-mail permissions@elsevier.com. Requests may also be completed online via the Elsevier homepage (<http://www.elsevier.com/locate/permissions>).

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via email. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Additional paper offprint's can be ordered by the authors. An order form with prices will be sent to the corresponding author.

Author Enquiries

Authors can keep a track on the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track a Paper" feature <http://www.elsevier.com/trackarticle>. Other questions or queries will also be dealt with via the website <http://authors.elsevier.com>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided when an article is accepted for publication.

ANEXO F – Normas para publicação no periódico Food Chemistry

Guide for Authors

Submission of Papers

All manuscripts for Food Chemistry should be submitted online via EES - Elsevier Editorial System - <http://ees.elsevier.com/foodchem>. This is the preferred method of submission, and facilitates processing of your manuscript. Only in exceptional cases where the authors have no electronic facilities whatsoever, the author should submit one original copy of the manuscript, plus two photocopies and a copy on disk, to the Managing Editor:

Professor Gordon Birch
School of Food Biosciences
University of Reading
Whiteknights, PO Box 226
Reading RG6 6AP, UK

Authors are required to submit, with their manuscripts, the names and full contact details (including e-mail address) of 3 potential referees (who should not come from the same institute). It is the author's responsibility to ensure that papers are written in clear and comprehensible English. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission. English language help service: Upon request, Elsevier will direct authors to an agent who can check and improve the English of their paper (before submission). Please contact authorsupport@elsevier.com for further information. Submission of a paper implies that it has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the Publisher.

Review Policy

A peer review system involving two or three reviewers is used to ensure high quality of manuscripts accepted for publication. The Managing Editor and Editors have the right to decline formal review of a manuscript when it is deemed that the manuscript is 1) on a topic outside the scope of the Journal; 2) lacking technical merit; 3) focused on foods or processes that are of narrow regional scope and significance; 4) fragmentary and providing marginally incremental results; or 5) is poorly written.

Types of Contributions

Original research papers; review articles; rapid communications; short communications; viewpoints; letters to the Editor; book reviews.

1. Research papers - original full-length research papers which have not been published previously, except in a preliminary form, and should not exceed 7,500 words (including allowance for no more than 6 tables and illustrations).

2. Review articles - will be accepted in areas of topical interest, will normally focus on literature published over the previous five years, and should not exceed 10,000 words (including allowance for no more than 6 tables and illustrations).

3. Rapid communications - an original research paper reporting a major scientific result or finding with significant implications for the research community, designated by the Editor.

4. Short communications - Short communications of up to 3000 words, describing work that may be of a preliminary nature but which merits immediate publication.
5. Viewpoints - Authors may submit viewpoints of about 1200 words on any subject covered by the Aims and Scope.
6. Letters to the Editor - Letters are published from time to time on matters of topical interest.
7. Book reviews

Manuscript Preparation

General: Manuscripts must be typewritten, double-spaced with wide margins on one side of white paper. Each page must be numbered, and lines must be consecutively numbered from the start to the end of the manuscript. Good quality printouts with a font size of 12 or 10 pt are required. The corresponding author should be identified (include a Fax number and E-mail address). Full postal addresses must be given for all co-authors. Authors should consult a recent issue of the journal for style if possible. An electronic copy of the paper should accompany the final version. The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity. Authors should retain a copy of their manuscript since we cannot accept responsibility for damage or loss of papers. Original manuscripts are discarded one month after publication unless the Publisher is asked to return original material after use.

Abstracts: Each paper should be provided with an abstract of 100-150 words, reporting concisely on the purpose and results of the paper. Text: Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text, Acknowledgements, Appendix, References, Vitae, Figure Captions and then Tables. Do not import the Figures or Tables into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers. The title of the paper should unambiguously reflect its contents. Where the title exceeds 70 characters a suggestion for an abbreviated running title should be given. Units: The SI system should be used for all scientific and laboratory data; if, in certain instances, it is necessary to quote other units, these should be added in parentheses. Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' (10⁹ in America, 10¹² in Europe) is ambiguous and should not be used.

Symbols: Abbreviations for units should follow the suggestions of the British Standards publication BS 1991. The full stop should not be included in abbreviations, e.g. m (not m.), ppm (not p.p.m.), % and '/' should be used in preference to 'per cent' and 'per'. Where abbreviations are likely to cause ambiguity or may not be readily understood by an international readership, units should be put in full. Current recognised (IUPAC) chemical nomenclature should be used, although commonly accepted trivial names may be used where there is no risk of ambiguity. The use of proprietary names should be avoided. Papers essentially of an advertising nature will not be accepted. References: All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. No more than 30 references should be cited in your manuscript. In the text refer to the author's name (without initials) and year of publication (e.g. "Steventon, Donald and Gladden (1994) studied the effects..." or "...similar to values reported by others (Anderson, Douglas, Morrison & Weiping, 1990)..."). For 2-6 authors all authors are to be listed at first citation. At subsequent citations use first author et al.. When there are more than 6 authors, first author et al. should be used throughout the text. The list of references should be arranged alphabetically by authors' names and should be as full as possible, listing all authors, the full title of articles and journals, publisher and year. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.

References should be given in the following form:

Ahmed, I. A., & Robinson, R. K. (1999). The ability of date extracts to support the production of aflatoxins. *Food Chemistry*, 66(3), 307-312.

Marasas, W. F. O. (1996). Fumonisin: History, worldwide occurrence and impact. In L. S. Jackson, J. W. DeVries, & L. B. Bullerman, *Fumonisin in food, advances in experimental medicine and biology*, vol. 392 (pp. 1-18). New York: Plenum Press.

Massart, D. L., & Kauffmann, L. (1983). *Interpretation of analytical data by use of cluster analysis*. New York: Wiley.

Noel, S., & Collin, S. (1995). Trans-2-nonenal degradation products during mashing. In *Proceedings of the 25th European brewery convention congress* (pp. 483-490). Oxford: IRL Press.

Citing and listing of web references. As a minimum, the full URL should be given. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly "Articles in Press" because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*: doi:10.1016/jphysletb.2003.10.071. When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

Illustrations

Photographs, charts and diagrams are all to be referred to as "Figure(s)" and should be numbered consecutively in the order to which they are referred. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text. All illustrations should be clearly marked with the figure number and the author's name. All figures are to have a caption. Captions should be supplied on a separate sheet. Tables should be numbered consecutively and given a suitable caption and each table typed on a separate sheet. Footnotes to tables should be typed below the table and should be referred to by superscript lowercase letters. No vertical rules should be used. Tables should not duplicate results presented elsewhere in the manuscript (e.g. in graphs). If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please note: Because of technical complications which can arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version should you not opt for colour in print) please submit in addition usable black and white prints corresponding to all the colour illustrations. As only one figure caption may be used for both colour and black and white versions of figures, please ensure that the figure captions are meaningful for both versions, if applicable.

Preparation of electronic illustrations

Submitting your artwork in an electronic format helps us to produce your work to the best possible standards, ensuring accuracy, clarity and a high level of detail.

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.

- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Helvetica, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide all illustrations as separate files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. You are urged to visit this site.

Preparation of Supplementary Data

Elsevier now accepts electronic supplementary material (e-components) to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the Author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including Science Direct: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the final version of the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages an <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

Proofs

When your manuscript is received at the Publisher it is considered to be in its final form. Proofs are not to be regarded as 'drafts'. One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author, to be checked for typesetting/editing. No changes in, or additions to, the accepted (and subsequently edited) manuscript will be allowed at this stage. Proofreading is solely your responsibility. A form with queries from the copy editor may accompany your proofs. Please answer all queries and make any corrections or additions required. The Publisher reserves the right to proceed with publication if corrections are not communicated. Return corrections within two working days of receipt of the proofs. Should there be no corrections, please confirm this. Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. In order to do this we need your help. When you receive the (PDF) proof of your article for correction, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections will not be possible, so please ensure your first sending is complete. Note that this does not mean you have any less time to make your corrections just that only one set of corrections will be accepted. Proofs are to be returned to the Log-in Department, Elsevier Ltd, Bampfylde Street, Exeter, EX1 2AH, UK, fax +44 (0)1392 425370.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Copies of the issue can be ordered at a specially reduced rate using the order form sent to the corresponding author after the manuscript has been accepted.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to transfer copyright (for more information on copyright see <http://authors.elsevier.com>). This transfer will ensure the widest possible dissemination of information. A letter will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript. A form facilitating transfer of copyright will be provided. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: contact Elsevier Ltd., Global Rights Department, The Boulevard, Langford Lane, Oxford, OX5 1GB, UK; phone: (+44) 1865 843830, fax: (+44) 1865 853333, e-mail: permissions@elsevier.com.

Author Enquiries

Authors can keep a track on the progress of their accepted article, by visiting <http://www.elsevier.com/trackarticle>. Other questions or queries will also be dealt with via the website <http://authors.elsevier.com>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided when an article is accepted for publication. Do not contact the editors - they do not have access to this information.