

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

**DESENVOLVIMENTO DE QUEIJO MINAS FRESCAL
PROBIÓTICO COM TEOR REDUZIDO DE LACTOSE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Daniele Back

**Santa Maria, RS, Brasil
2011**

DESENVOLVIMENTO DE QUEIJO MINAS FRESCAL PROBIÓTICO COM TEOR REDUZIDO DE LACTOSE

por

Daniele Back

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de Concentração Ciência e Tecnologia dos 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 Silvia Pereira dos Santos Richards

**Santa Maria, RS, Brasil
2011**

**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 MINAS FRESCAL PROBIÓTICO
COM TEOR REDUZIDO DE LACTOSE**

elaborada por
Daniele Back

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

COMISSÃO EXAMINADORA

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

Elane Schwinden Prudêncio, Dr^a (UFSC)

Adriano Gomes da Cruz, Dr (UNICAMP)

Santa Maria, 21 de março de 2011.

*Dedico este trabalho aos meus pais, Viro e Lisete,
por todo amor e dedicação, valores e princípios,
pelo exemplo de trabalho e honestidade.*

Sem eles, nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força interior.

A minha Mãe, Lisete, obrigada por sempre estar ao meu lado, pelo apoio e incentivo em seguir estudando, sempre, desde a época do “Bicho-Grilo” até a universidade.

Ao meu Pai, Viro, obrigada por ter me aberto as portas e me guiado para a apaixonante área de laticínios. Suas várias “tarefas” me fizeram crescer como profissional.

Ao Guto, meu irmão, meu companheiro de brincadeiras, brigas, rock, e risadas.

Ao Liaisson, por estar ao meu lado compartilhando os bons momentos da vida. Obrigada pela força, carinho, amizade, compreensão e por me fazer rir todos os dias.

A minha orientadora, Neila Richards, obrigada pela orientação prestada durante o mestrado, por todo o conhecimento transmitido e atenção dedicada. Obrigada por tudo!

À colega e amiga Paula Mattanna, minha “co-orientadora”, sempre sanando minhas dúvidas e me ajudando durante todo o mestrado. Obrigada, de coração!

Aos estagiários Diego Fontana e Greice Dotto: obrigada pela imensa ajuda e dedicação na realização das análises.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos da UFSM, em especial à Marialene, ao Moisés e à Velcir, sempre dispostos a nos ajudar no que fosse preciso, e ao Magé, pelo valioso conhecimento prático durante a fabricação dos queijos.

À equipe do laboratório de Microbiologia de Alimentos da UFSM, em especial à Liana Milani, Ana Paula de Souza Rezer e Ângela Backes.

À colega Carline Parodia, pelas sugestões dadas na realização deste trabalho.

À família Wilhelm, em especial à Judite e ao Elemar, por me acolherem em Santa Maria desde a época da graduação.

Aos amigos Rigotti, Cláudia, Dal, Lucas e Arthur, pelos tantos momentos de alegrias, conversas e risadas.

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

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram e torceram para o desenvolvimento e concretização deste trabalho, muito obrigada!

*"A ciência nos traz conhecimento; a vida, sabedoria."
(Will Durant)*

RESUMO

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

DESENVOLVIMENTO DE QUEIJO MINAS FRESCAL PROBIÓTICO COM TEOR REDUZIDO DE LACTOSE

AUTORA: DANIELE BACK

ORIENTADORA: NEILA S.P.S. RICHARDS

Data e Local de Defesa: Santa Maria, 21 de março de 2011.

Nos últimos anos, houve um aumento na procura por alimentos com alguma propriedade funcional, sendo os derivados lácteos a maior gama de produtos funcionais industrializados atualmente disponíveis no mercado. Porém uma grande parte da população mundial está restringida ao consumo de lácteos por possuir uma deficiência ou ausência na produção de enzima lactase no intestino. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver queijos Minas Frescal probióticos com baixo teor de lactose e avaliar suas características físico-químicas, sensoriais e tecnológicas bem como a viabilidade das bactérias probióticas durante o armazenamento. Seis formulações de queijo (T1 a T6) foram elaboradas com leite tratado com a enzima lactase (β -galactosidade) nas concentrações de 0,3, 0,6 e 0,9 g/L em tempos de reação de 12 e 24 horas, sendo todas adicionadas de 1% de cultura probiótica (*Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium sp.*). Outras duas formulações, T7 e T8, foram desenvolvidas ambas sem adição de lactase e somente T7 contendo probiótico. A lactose foi diminuída em mais de 70% em todos os queijos adicionados de enzima lactase, chegando a atingir 93,23% no tratamento com maior quantidade da enzima. A avaliação físico-química demonstrou que todos os queijos desenvolvidos estavam de acordo com a legislação vigente quanto aos parâmetros de umidade e gordura no extrato seco. Observou-se que os valores de acidez foram significativamente menores ($p < 0,05$) para o queijo com menor teor de lactose e para o queijo sem adição de probiótico que os valores encontrados para os demais tratamentos. Apesar das contagens de *Lactobacillus acidophilus* ficarem abaixo do mínimo estabelecido, as contagens de *Bifidobacterium sp.* mantiveram-se sempre acima de 10^6 UFC.g⁻¹, independente da quantidade de enzima lactase adicionada. Na análise do perfil de textura instrumental, não foram detectadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos quanto aos parâmetros de firmeza, coesividade e gomosidade. Quanto à análise sensorial, os provadores detectaram o menor gosto ácido e maior gosto doce na amostra com maior hidrólise de lactose, e não observaram diferença quanto à textura em relação aos controles. Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que a enzima lactase reduziu de maneira eficaz o teor de lactose nos queijos desenvolvidos, não alterando as características físico-químicas, sensoriais e tecnológicas e nem a viabilidade probiótica, mostrando-se como uma opção positiva para o mercado de laticínios, especialmente por poder reduzir os sintomas da intolerância à lactose.

Palavras-chave: queijo; probiótico; intolerância à lactose; lactase.

ABSTRACT

Master Dissertation
Graduate Program in Food Science and Technology
Federal University of Santa Maria

DEVELOPMENT OF PROBIOTIC MINAS FRESH CHEESE WITH REDUCED LACTOSE CONTENT

AUTHOR: DANIELE BACK
ADVISER: NEILA S.P.S. RICHARDS
Date and Defense Place: Santa Maria, March, 21st, 2011.

In recent years, there has been an increasing demand for foods with some functional property, being the dairy products the largest range of functional products manufactured on the market today. Nevertheless, a large part of the world population is restricted to the consumption of dairy by having a deficiency or absence in the production of lactase in the gut. Thus, this study aimed to develop a probiotic Minas fresh cheese with low-lactose content and evaluate their physico-chemical, sensorial and technological characteristics as well as the viability of probiotic bacteria during storage. Six cheese formulations (T1 to T6) were prepared with milk treated with lactase enzyme (β -galactosidase) at concentrations of 0,3, 0,6 and 0,9 g / L in reaction times of 12 and 24 hours, all of which added by 1% of probiotic culture (*Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium sp.*). Two other formulations, T7 and T8, were both developed without the addition of lactose and only T7 containing probiotic. The lactose was reduced more than 70% for all treatments added lactase, reaching 93,23% in the treatment with larger amount of enzyme. The physico-chemical evaluation showed that all the cheeses were developed in accordance with current legislation regarding the parameters of moisture and fat. It was observed that the acidity values were significantly lower ($p < 0,05$) for cheese with less lactose content and for chesse without probiotic culture to the values found for the other treatments. Although the counts of *Lactobacillus acidophilus* were below the established minimum, the counts of *Bifidobacterium sp.* always remained above 10^6 CFU g⁻¹, regardless of the amount of enzyme lactase added. In the analysis of instrumental texture, there were no significant differences ($p > 0.05$) among treatments for the parameters of firmness, cohesiveness and gumminess. In the sensory analysis, panelists found the taste more sweet and less acid in the sample with higher hydrolysis of lactose, and found no difference in texture compared to controls. Based on the results obtained, it can be said that the enzyme lactase effectively reduced the lactose content in the developed cheeses, and did not change the physico-chemical, sensorial and technological neither the probiotic viability, being a positive option for the dairy market, especially for being able to reduce lactose intolerance symptoms.

Keywords: cheese; probiotic; lactose intolerance; lactase.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Queijo Minas Frescal	13
2.2 Probióticos	14
2.2.1 Queijo como veículo probiótico.....	17
2.3 Lactose	18
2.3.1 Intolerância à lactose.....	20
2.4 Lactase	23
3 MANUSCRITOS	24
3.1 Manuscrito 1 - Viabilidade probiótica de queijos minas frescal com teor reduzido de lactose	25
3.2 Manuscrito 2 - Textura instrumental e avaliação sensorial de queijo Minas Frescal potencialmente probiótico com teor reduzido de lactose pela ação da enzima β-galactosidase	41
4 DISCUSSÃO GERAL	66
5 CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
APÊNDICES	79
ANEXOS	83

1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda por alimentos saudáveis tem estimulado inovações e desenvolvimento de novos produtos por todo o mundo. Os alimentos probióticos fazem parte do grupo dos alimentos funcionais, pois, além de suas qualidades nutricionais, afetam benéficamente uma ou mais funções relevantes do organismo do consumidor (RIBEIRO, SIMÕES & JURKIEWICZ, 2009).

Produtos lácteos são considerados um veículo ideal para condução de bactérias probióticas no trato gastrointestinal (ROSS et al., 2002). De acordo com Buriti, Rocha e Saad (2005), os queijos frescos oferecem excelentes condições para a sobrevivência e multiplicação de cepas probióticas, tais como a alta atividade de água, o pH acima de 5,0, a baixa concentração de sal e a ausência de substâncias conservantes. Dentre os queijos frescos, destaca-se o queijo Minas Frescal, um produto largamente produzido pela indústria de laticínios brasileira, com elevado rendimento na fabricação.

Porém, quando se trata do consumo de leite e seus derivados, muitos estudos mostram que uma porcentagem significativa da população mundial sofre com transtornos gastrointestinais quando os consome. Tais sintomas são provenientes da deficiência ou ausência da enzima lactase, responsável pela quebra da molécula de lactose, o principal açúcar do leite, sendo este transtorno chamado de intolerância à lactose. Esta problemática priva o intolerante à lactose da ingestão de produtos lácteos que são uma excelente fonte de cálcio e proteínas, como também de outros minerais e vitaminas (ANTUNES & PACHECO, 2009). Vale ressaltar que o Brasil ainda possui um mercado pouco voltado para produtos específicos aos consumidores intolerantes à lactose, com exceção dos leites UHT ou UAT (*Ultra High Temperature* ou *Ultra Alta Temperatura*).

Diante desse contexto, torna-se de extrema importância a elaboração de novos produtos lácteos que tenham baixo teor lactose e que, ainda, possuam propriedades funcionais através da adição de micro-organismos probióticos, aliando, dessa forma, as características benéficas à saúde proporcionadas pelas bactérias probióticas ao baixo teor de lactose necessário a pessoas com deficiência de lactase.

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivos:

- Desenvolver um queijo Minas Frescal adicionado de cultura probiótica (*Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium sp.*) e com teor reduzido de lactose através da enzima lactase;
- Determinar a redução no teor de lactose dos queijos elaborados com leite tratado com a enzima lactase;
- Realizar a contagem dos micro-organismos probióticos *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium sp.* durante o armazenamento dos queijos;
- Analisar as características físico-químicas das formulações;
- Verificar se existe diferença sensorial entre as formulações de queijos com diferentes teores de lactose;
- Determinar as características do perfil instrumental de textura das formulações desenvolvidas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Queijo Minas Frescal

Segundo a Portaria nº 352 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1997), o queijo Minas Frescal é um queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas. É classificado como queijo semi-gordo (25 a 44% de gordura no extrato seco), de muito alta umidade (não inferior a 55%) a ser consumido fresco, de consistência branda e macia, com ou sem olhaduras mecânicas, de cor esbranquiçada, de sabor suave a levemente ácido, sem ou com crosta fina, de forma cilíndrica e com peso de 0,3 a 5,0 Kg (BRASIL, 2004).

A denominação queijo Minas Frescal é em virtude de sua origem brasileira, no estado de Minas Gerais, no século XVIII, e por ser um queijo de massa crua, podendo ser comercializado logo após a sua fabricação, não necessitando de maturação (MONTEIRO, PIRES & ARAÚJO, 2007). Tornou-se muito popular, sendo hoje comercializado em todas as regiões e produzido em fábricas de pequeno, médio e grande porte, possuindo um processo de fabricação simples, com utilização de equipamentos tradicionais (FURTADO, 2005).

O queijo Minas Frescal está entre os de maior consumo no Brasil e constitui uma das mais importantes atividades das indústrias de laticínios, devido ao alto rendimento e ausência de período de maturação, o que possibilita um retorno rápido de investimento e, conseqüentemente, custos menores ao consumidor (OLIVEIRA et al., 1998).

Segundo Furtado (2005), o rendimento médio da fabricação do queijo Minas Frescal é bastante variável, em função da grande variação no seu teor de umidade. Em média, o rendimento é de 6,0 a 6,5 litros de leite por quilograma de queijo.

Sua vida de prateleira é limitada (até 20 dias) e fortemente influenciada não só pela composição físico-química (umidade, sobretudo), como também pelas condições de transporte, sua apresentação no mercado (gôndolas ou balcões

frigoríficos) e, sobremaneira, pela temperatura em que é mantido enquanto é comercializado (RIBEIRO, SIMÕES & JURKIEWICKZ, 2009; FURTADO, 2005).

O controle da acidez durante o período de validade é importante para a definição da qualidade do queijo Minas Frescal, a acidificação é um dos principais fatores que determinam a durabilidade, sendo que o desenvolvimento de acidez excessiva causa alterações de sabor e de textura que limita a validade comercial do produto (VAN DENDER, MASSAGUER-ROIG & CAMPOS, 1999).

2.2 Probióticos

O termo probiótico, de origem grega, significa “para a vida” e é utilizado para designar a presença em alimentos de bactérias benéficas para o organismo humano. O conceito de probióticos provavelmente evoluiu a partir de uma primeira teoria proposta pelo cientista russo Elie Metchnikoff, que observou que o consumo de leites fermentados poderia reverter efeitos putrefativos da microbiota intestinal (STANTON et al, 2005).

Henry Tissier observou, em meados de 1907, que crianças com diarreia apresentavam em suas fezes um baixo número de bactérias caracterizadas por uma morfologia peculiar – as bifidobactérias. Estas bifidobactérias eram abundantes em crianças saudáveis. Ele sugeriu que essas bactérias poderiam ser administradas em pacientes com diarreia, com a finalidade de ajudar a restaurar a microbiota intestinal saudável, prevenindo assim infecções infantis (SOUZA, 2006).

Já Fuller (1989) definiu probiótico como suplemento alimentar composto de células microbianas vivas, as quais têm efeitos benéficos para o hospedeiro, por melhorar ou manter o equilíbrio microbiano do intestino.

Diversas outras definições de probióticos foram publicadas nos últimos anos. Entretanto, atualmente a definição aceita internacionalmente é que eles são microorganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001).

Alimentos contendo bactérias probióticas são considerados alimentos funcionais e estão ganhando popularidade e aceitação em todo o mundo (ONG, HENRIKSSON & SHAH, 2006). Um alimento funcional tem sido definido como

qualquer alimento modificado ou ingrediente alimentar que possa proporcionar benefícios à saúde que vão além dos nutrientes tradicionais que a contém (FERGUSON, 2009).

Probióticos podem fornecer inúmeros benefícios, principalmente através da manutenção do equilíbrio e composição da flora intestinal, ajudando a aumentar a habilidade do corpo em resistir à invasão de patógenos, mantendo o bem estar do hospedeiro (RANADHEERA, BAINES & ADAMS, 2010).

Segundo Fuller (1989), há três possíveis mecanismos de atuação dos probióticos:

- Supressão do número de organismos patógenos através da produção de compostos com atividade antimicrobiana, a competição por nutrientes e a competição por sítios de adesão.
- Alteração do metabolismo microbiano, através do aumento ou da diminuição da atividade enzimática.
- Estímulo da imunidade do hospedeiro, através do aumento dos níveis de anticorpos e o aumento da atividade dos macrófagos.

Dentre os benefícios atribuídos à ingestão de alimentos contendo probióticos, alguns já foram provados cientificamente e outros ainda requerem mais estudos em humanos (GRANATO et al., 2010). Os principais benefícios com base científica relacionados aos probióticos são: atividades antimicrobianas e antimutagênicas, propriedades anticarcinogênicas, propriedades anti-hipertensivas, atenuação dos sintomas de doença intestinal, melhor utilização de nutrientes, redução dos sintomas de alergia alimentar, redução dos níveis de colesterol LDL e redução da intolerância a lactose (LOURENS-HATTINGH & VILJOEN, 2001; MARTEAU et al., 2001; LIONG et al., 2009; KIM & GILLILAND, 1983; RANADHEERA, BAINES & ADAMS, 2010).

Um micro-organismo probiótico deve necessariamente sobreviver às condições adversas do estômago e colonizar o intestino. O equilíbrio normal da microbiota intestinal impede que micro-organismos potencialmente patogênicos nela presentes exerçam seus efeitos. Por outro lado, o desequilíbrio dessa microbiota normal pode resultar na proliferação de patógenos, com consequente infecção bacteriana (ZIEMER & GIBSON, 1998).

A dose mínima diária da cultura probiótica considerada terapêutica é de 10^8 a 10^9 UFC, realizada através da ingestão de 100 g de produto contendo $10^6 - 10^7$ UFC/g ou mL (ANVISA, 2008). Tais concentrações de micro-organismos probióticos devem ser mantidas em todos os passos do processamento do alimento, desde a sua fabricação até a ingestão pelo consumidor, como também tais micro-organismos devem ser capazes de sobreviver ao trato gastro-intestinal (CRUZ et al., 2009).

A viabilidade dos micro-organismos probióticos pode ser afetada por diversos fatores, dentre eles a cepa utilizada, a pós acidificação e teor de oxigênio dos produtos, substâncias adicionadas durante a etapa de fabricação e pelas condições de armazenamento, como a temperatura (OLIVEIRA et al., 2002 CRUZ et al., 2009).

As cepas probióticas para incorporação em alimentos devem ser consideradas seguras (GRAS - *generally recognized as safe*) e não devem ocasionar mudanças indesejáveis do ponto de vista sensorial, como aroma, flavor textura e demais atributos (STANTON et al., 2003).

Diferentes espécies e linhagens dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são predominantemente utilizadas como suplementos probióticos para alimentos. Estas bactérias têm sido isoladas de todas as porções do trato gastrointestinal do humano saudável, sendo: *Lactobacillus* do intestino delgado e *Bifidobacterium* do intestino grosso (O'SULLIVAN, 2006).

Os micro-organismos do gênero *Lactobacillus* são gram-positivos, não formadores de esporos, desprovidos de flagelos, possuem forma de bacilo ou cocabacilo e podem ser anaeróbios ou aerotolerantes. As condições ótimas para sua multiplicação são temperaturas de 35-40°C e pH de 5,5-6,0. As espécies mais utilizadas são *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus casei*. Grande parte dos *L. acidophilus* degradam amigdalina, celobiose, frutose, galactose, glicose, lactose, maltose, manose, sucrose e esculina (NAHAISI, 1986).

As bifidobactérias em geral são caracterizadas por serem gram-positivas, não formadoras de esporos, desprovidas de flagelos, catalase negativas e anaeróbias. Quanto à morfologia, podem ser bacilos com forma de bengala, bifurcados, curtos ou curvados. São heterofermentativas, produzem ácido acético e láctico na proporção molar de 3:2 a partir de dois moles de hexose, sem a produção de CO₂, exceto durante a degradação do gluconato. Além da glicose, todas as bifidobactérias

de origem humana são capazes de utilizar a galactose, a lactose e a frutose como fontes de carbono (SGORBATI et al., 1995).

2.2.1 Queijo como veículo probiótico

Produtos lácteos são considerados um veículo ideal para condução de bactérias probióticas no trato gastrointestinal (ROSS et al., 2002), sendo a maior gama desses produtos composta por leites fermentados como o iogurte. No entanto, outros derivados lácteos suplementados com probióticos vêm sendo desenvolvidos, visando oferecer ao consumidor maior variedade de produtos funcionais.

Os queijos, em geral, apresentam algumas vantagens em relação a outros produtos probióticos. A maioria possui pH mais elevado que iogurtes e leites fermentados, o que torna o meio mais estável para a sobrevivência das culturas probióticas por um período mais longo. Além disso, os queijos, por apresentarem uma quantidade de gordura relativamente alta, oferecem uma proteção para a bactéria probiótica durante sua passagem pelo trato gastrointestinal (GARDINER et al., 1999).

Os queijos frescos oferecem excelentes condições para a sobrevivência e multiplicação de cepas probióticas, tais como a alta atividade de água, o pH acima de 5,0, a baixa concentração de sal e a ausência de substâncias conservantes (BURITI, ROCHA & SAAD, 2005). Nesse contexto, destaca-se o queijo Minas Frescal, mostrando ser um veículo apropriado para incorporação de bactérias probióticas em diversas pesquisas (BURITI et al., 2005; BURITI, ROCHA & SAAD, 2005b; RIBEIRO, SIMÕES & JURKIEWICZ, 2009; SOUZA & SAAD, 2009; FRITZEN-FREIRE et al., 2010a, 2010b).

A adição de culturas probióticas também foi testada em outras variedades de queijo, como Petit Suisse, (MARUYAMA et al., 2006), Cream Cheese (BURITI et al., 2007; BURITI, CARDARELLI & SAAD, 2008; ALVES et al., 2008), Cheddar (GARDINER et al., 1999; ONG & SHAH, 2009), Cottage (PARODIA, 2010) e Gouda (GOMES, VIEIRA & MALCATA, 1998), sendo mantida a viabilidade das culturas microbianas durante o armazenamento.

Segundo Cruz et al. (2009), os principais obstáculos que influenciam diretamente a manutenção das atividades funcionais das bactérias probióticas em queijo são: momento da adição do inóculo (antes ou após a fermentação) bem como perda de células probióticas viáveis durante a drenagem do soro, a adição de sal, o empacotamento, a maturação e as condições de armazenamento.

2.3 Lactose

Lactose, ou 4-O- β -D-galactopiranosil-D-glicose, é o principal carboidrato do leite e sua concentração varia entre 4,2 a 5% (VARNAM & SUTHERLAND, 1995). Do ponto de vista físico-químico, a lactose está presente no leite no estado molecular em solução verdadeira, com partículas de diâmetros inferiores a 1 μ m (GOURSAUD, 1985; AMIOT, 1991).

É um dissacarídeo constituído por um radical β -D-galactose e um radical D-glicose ligados através da ligação glicosídica β -1,4. É considerada um açúcar redutor, porque o grupo no carbono anomérico da porção glicose não está envolvido na ligação glicosídica, portanto, ela está livre para reagir com agentes oxidantes (CAMPBELL, 2000). A estrutura química da lactose pode ser observada na Figura 1.

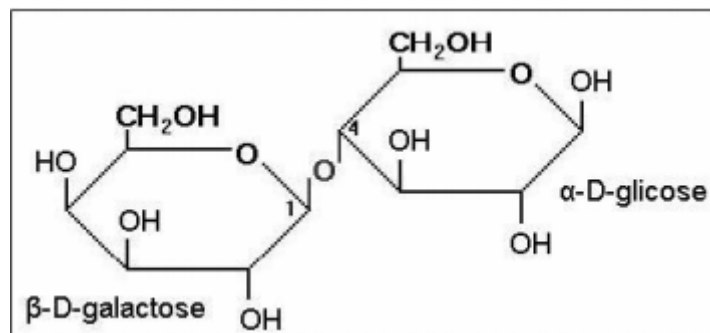


Figura 1 – Estrutura química da lactose.
Fonte: CAMPBELL (2000).

Quando comparada a outros açúcares, a lactose apresenta baixa solubilidade em água e baixo poder adoçante. Quando comparada a sacarose é

cerca de dez vezes menos solúvel e apresenta um poder edulcorante seis vezes inferior (TRONCO, 2003). A título de comparação do poder de doçura relativa, a frutose tem o índice 130, a sacarose 100 (padrão), a glicose 75, a galactose 32 e a lactose apenas 17 (GOURSAUD, 1985).

Faz parte, juntamente com outras substâncias minerais, como fósforo, sódio e cloretos, das substâncias com atividade osmótica do leite. A retirada da lactose pode provocar uma redução de mais de 50% do ponto de congelamento do leite (SCHLIMME & BUCHHEIM, 2002).

A lactose é um açúcar higroscópico e tem uma forte tendência a absorver sabores e odores e causa muitos defeitos em alimentos refrigerados tais como a cristalização em alimentos lácteos, desenvolvimento de textura arenosa e formação de depósito (PANESAR, KUMARI & PANESAR, 2010).

Fisiologicamente, a lactose é uma substância energética e seus monossacarídeos entram na constituição dos cerebrosídeos, abundante na massa cerebral e mielina nervosa (BEHMER, 1991; ESKIN, 1990).

A absorção da lactose primeiramente requer a ação da lactase na borda em escova do intestino delgado, sendo esta enzima capaz de quebrar a ligação entre os dois monossacarídeos constituintes da lactose (CASTIGLIONE et al., 2008).

A hidrólise é uma reação necessária para a digestão da lactose. A lactose é hidrolisada pela enzima lactase, em nível de mucosa intestinal, em dois monossacarídeos, a glicose e a galactose, carboidratos mais simples, que são mais facilmente absorvidos pelo organismo (CAMPBELL, 2000).

Existem dois métodos utilizados para a hidrólise da lactose: o método ácido e o método enzimático.

A hidrólise ácida caracteriza-se por envolver soluções diluídas de ácidos fortes, como ácido sulfúrico e clorídrico, e condições operacionais severas de pH e temperatura. Devido a estas características, a hidrólise ácida tem sua aplicação restrita, pois pode ocorrer desnaturação das proteínas do leite e formação de cor e odor inaceitáveis pelo consumidor (SANTIAGO, 2002).

Já o método enzimático de hidrólise de lactose emprega a enzima β -galactosidase, a qual hidrolisa o referido dissacarídeo em seus monossacarídeos constituintes. A hidrólise enzimática pode ser aplicada no leite sem um tratamento prévio e os produtos obtidos preservam as propriedades nutricionais da matéria-prima, aumentando seu dulçor (SANTOS, LADERO & GARCÍA-OCHOA, 1998).

A hidrólise da lactose sofre influência da temperatura, pH, tempo de reação e concentração da enzima (EVANGELISTA, 1998).

Em princípio, a reação de hidrólise da lactose forma uma mistura isomolecular de glicose e galactose. Na prática, dependendo das condições, a mistura isomolecular não é alcançada, pois a galactose pode polimerizar ou se unir à lactose para formar oligossacarídeos (GEKAS & LÓPEZ-LEIVA, 1985).

A hidrólise ocasiona modificações físicas e químicas dos produtos, pois aumenta a solubilidade, o poder adoçante e a digestibilidade dos açúcares e a viscosidade, o corpo, a textura e o paladar dos produtos (VINHAL, 2001).

É um processo promissor para a indústria de alimentos porque possibilita o desenvolvimento de novos produtos sem lactose em sua composição (LONGO, 2006) ou com um teor reduzido deste carboidrato, para pessoas com intolerância à lactose, além de prevenir a cristalização da lactose na produção de sorvetes, de produtos como leite condensado e doce de leite (CARMINATTI, 2001; OLIVEIRA, 2005).

O método de quantificação do grau de hidrólise da lactose pela medida do índice crioscópico tem sido utilizada pelas indústrias de laticínios como uma metodologia rápida (leitura inferior a 5 minutos) e eficiente para estimar o grau de hidrólise e a atividade da β -galactosidase em leite para elaboração de produtos lácteos com teor reduzido de lactose. O princípio desse método baseia-se nas mudanças das propriedades físicas do leite quanto ao abaixamento do ponto de congelamento (índice crioscópico), à pressão osmótica e à rotação ótica pela ação da β -galactosidase sobre a lactose com produção de monossacarídeos (MOREIRA et al., 2009).

2.3.1 Intolerância à lactose

A intolerância à lactose decorre da incapacidade de digerir o dissacarídeo lactose devido à deficiência ou ausência da enzima β -galactosidase presente nas vilosidades intestinais (ANGELIS, 2006).

Há aproximadamente 10.000 anos a.C., a maioria da população era caracterizada por uma alta atividade de lactase durante a amamentação, nos

primeiros meses de vida. Quando crianças, esta atividade diminuía até que, na fase adulta, todos eram intolerantes à lactose. Quando o gado passou a ser domesticado, as pessoas começaram a utilizar o leite animal como a primeira possibilidade de substituição do leite materno para as crianças e, depois, para os adultos. Dessa forma ocorreram desvios genéticos, persistindo a atividade da lactase. Portanto, a tolerância à lactose e a possibilidade da utilização de leite se desenvolveu como uma mutação genética, em particular nas regiões do norte europeu (KOCIÁN, 1988).

Diversas terminologias são empregadas para caracterizar indivíduos com incapacidade parcial ou total de digerir o principal açúcar presente no leite: intolerantes à lactose, lactase não persistentes, pacientes com má absorção de lactose, pacientes com hipolactasia/alactasia do tipo adulto, pacientes com deficiência parcial ou total de lactase (ANTUNES & PACHECO, 2009).

Existem três tipos descritos na literatura de deficiência de lactase: deficiência primária, deficiência secundária e deficiência congênita da enzima.

- Deficiência Primária: se caracteriza por diminuição de quantidade produzida de lactase após o desmame, sendo uma condição geneticamente determinada e permanente (RUSYNYK & STILL, 2001). As manifestações dessa deficiência costumam ser evidentes por volta dos 2 aos 15 anos de idade, dependendo de condições raciais e culturais (DUMOND et al., 2006).
- Deficiência Secundária: decorrente de condições patológicas que afetam a integridade da mucosa gastrointestinal sejam elas permanentes ou transitórias (FARIAS & FAGUNDES NETO, 2004). Depois que o dano é reparado, a mucosa se regenera e passa a produzir lactase novamente, ainda que seja uma das últimas enzimas que volta a ser produzida (KOCIÁN, 1988; TÉO, 2002).
- Deficiência Congênita: disfunção rara manifestada em recém nascidos, sendo uma condição permanente (SHUKLA, 1997).

Os sintomas típicos incluem dor abdominal, sensação de inchaço no abdome, flatulência, diarreia, borborismos e, particularmente nos jovens, vômitos (MATTAR & MAZO, 2010). Os sintomas variam de intensidade dependendo da quantidade de lactose ingerida, fatores fisiológicos, psicológicos e patológicos e geralmente se apresentam 30 minutos após se ter ingerido a lactose, até várias horas depois (ARANGO et al., 2006). Campbell *et al.* (2010) em diversas pesquisas propuseram

que estes sintomas são causados pelos gases hidrogênio e metano e toxinas produzidos pelas bactérias no intestino grosso quando metabolizam os carboidratos não digeridos completamente no intestino delgado.

A ocorrência da má absorção da lactose varia grandemente entre os grupos étnicos. Estima-se que cerca de 75% da população mundial sejam lactase não persistentes, dos quais aproximadamente 5% ocorrem no norte da Europa, e mais de 90% em alguns países da Ásia e da África (BULHÕES et al., 2007). Estudos realizados no Brasil mostram prevalências de 8% a 45% nas regiões sudeste e sul (PRETTO et al., 2002; PEREIRA FILHO & FURLAN, 2004).

Considerando a sua alta prevalência, a dificuldade ou impossibilidade de digerir a lactose poderia, segundo alguns autores, ser considerada como uma característica fisiológica normal, enquanto que a continuidade da presença da lactase no intestino durante a fase adulta seria considerada uma condição atípica (SHUKLA, 1997; PRAY, 2000).

A deficiência de β -galactosidase é geralmente diagnosticada com base em: história de sintomas gastrointestinais (dores e distensão abdominais, flatulência e diarreia) que ocorrem após ingestão do leite; teste para níveis anormais de hidrogênio na respiração; ou teste de tolerância à lactose (LOMER et al., 2008).

O tratamento da intolerância à lactose consiste basicamente na retirada ou diminuição desse açúcar da dieta, o que leva ao desaparecimento progressivo dos sintomas (SUAREZ & SAVAIANO, 1997). No caso de intolerância congênita da lactose, existe a necessidade de seguimento de dieta isenta de lactose. Se a deficiência enzimática for adquirida, essa forma de se alimentar não é permanente, podendo-se retornar à dieta habitual após a resolução do problema. No caso de deficiência primária, como existe apenas uma diminuição da atividade enzimática, não há a necessidade de excluir a lactose completamente da dieta, bastando haver uma redução da quantidade de leite e derivados de acordo com a tolerância individual (FARIAS & FAGUNDES NETO, 2004).

Uma das grandes preocupações com a diminuição da lactose na alimentação é a garantia do fornecimento de quantidade apropriada de proteínas, cálcio, riboflavina e vitamina D, que tem no leite e em seus derivados sua maior fonte (UGGIONI & FAGUNDES, 2006).

Dessa forma, a exclusão total e definitiva de leite e derivados da dieta deve ser evitada (DI STEFANO et al., 2002). Segundo Vonk et al. (2003), a maioria das

peças intolerantes à lactose pode ingerir 12 g/dia de lactose (equivalente a um copo de leite) sem apresentar sintomas adversos.

2.4 Lactase

Lactase é o nome utilizado para a enzima β -D-galactosidase (E.C. 3.2.1.23) ou mais formalmente β -D-galactosidase galactohidrolase. Esta enzima catalisa a hidrólise de lactose e arabinoses, sendo capaz ainda de catalisar a síntese de certos oligossacarídeos. Na classificação segundo o tipo de reação que as enzimas catalisam, a lactase é classificada como uma hidrolase (ANDRADE, 2005; RICHMOND et al., 1981).

Esta enzima está localizada na borda do epitélio intestinal. A atividade da lactase é aumentada em humanos na fase final da gestação e permanece elevada até cerca de três anos de idade, período após o qual começa a declinar sua atividade fisiológica, ocorrendo na fase adulta uma hipolactasia ou deficiência de lactose (ARANGO et al., 2006).

Ela pode ser encontrada em plantas (pêssegos, amêndoas e algumas espécies de rosas selvagens), organismos animais (pele, intestinos e cérebro), bactérias (*Escherichia coli*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Bacillus sp* e *Streptococcus lactis*), leveduras (*Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Candida pseudotropicalis*) e fungos (*Aspergillus foetidus*, *Aspergillus Níger*, *A. oryzae* e *A. phoenecis*) (CARMINATTI, 2001).

Segundo a legislação brasileira, por meio da RDC nº 34 8/2003, a enzima lactase utilizada na indústria alimentícia deve ser de origem microbiana, proveniente da levedura *Kluyveromyces lactis* (BRASIL, 2003).

A velocidade de reação da enzima depende de alguns fatores importantes como: pH, temperatura, tempo de reação e concentração da enzima (PROZYN, 2004). A temperatura e o pH ótimos diferem de acordo com a fonte e obtenção de cada enzima e também de acordo com o método de preparação comercial (GEKAS & LÓPEZ-LEIVA, 1985).

3 MANUSCRITOS

3.1 Manuscrito 1

Manuscrito em fase final de revisão pelos autores para ser submetido à Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes
(Configuração conforme as normas da Revista – Anexo B)

VIABILIDADE PROBIÓTICA DE QUEIJOS MINAS FRESCAL COM TEOR REDUZIDO DE LACTOSE

Probiotic viability of Minas Fresh cheeses with reduced lactose content

Daniele BACK¹
Paula MATTANNA¹
Greice D. SIMÕES²
Neila S. P. S. RICHARDS³

SUMÁRIO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade dos micro-organismos probióticos *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium sp.* adicionados a diferentes formulações de queijo Minas Frescal com teor reduzido de lactose. Oito formulações de queijo Minas Frescal foram desenvolvidas, sendo denominadas T1 a T6 as adicionadas de 1% da cultura probiótica, com concentrações de enzima lactase de 0,3g/L 0,6g/L e 0,9g/L e tempos de reação de hidrólise de 12 e 24 horas, e as formulações controles T7 (sem lactase e 1% da cultura probiótica) e T8 (sem lactase e sem probiótico). Os queijos foram submetidos a análises microbiológicas de contagem dos micro-organismos probióticos semanalmente durante o período de armazenamento, bem como a análises físico-químicas de gordura, proteína, umidade, cinzas, gordura no extrato seco, acidez titulável e pH. As reduções dos teores de lactose dos queijos adicionados de lactase variaram de 73,14 a 93,23%. Apesar das contagens de *Lactobacillus acidophilus* ($4,38 \pm 0,01$ a $7,88 \pm 0,07$ log UFC.g⁻¹) não terem atingido o valores mínimos de 10^6 UFC.g⁻¹ em todos os dias de armazenamento dos queijos, a população de *Bifidobacterium sp.* ($6,05 \pm 0,08$ e $7,90 \pm 0,04$ log UFC.g⁻¹) manteve-se acima de 6,00 log UFC.g⁻¹ para todas as formulações desenvolvidas, conferindo assim característica probiótica aos queijos. Os resultados obtidos demonstram a possibilidade da incorporação de bactérias probióticas em queijos com teor reduzido de lactose, sendo assim uma alternativa inovadora ao mercado de intolerantes a esse carboidrato.

Termos para indexação: queijo, probiótico, lactose.

1 INTRODUÇÃO

Alimentos contendo bactérias probióticas são classificados como alimentos funcionais, sendo os probióticos definidos como micro-organismos vivos que, quando

administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001).

Bactérias pertencentes a diferentes espécies e linhagens dos gêneros *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. casei shirota*, *L. casei rhamnosus*, *L. casei defensis*, *L. paracasei*) e *Bifidobacterium* (*B. bifidum*, *B. animalis*, *B. longum*) são mais frequentemente empregadas como suplementos probióticos para alimentos. A principal razão para esta escolha é o fato destes dois gêneros serem habitantes predominantes do intestino humano, sendo: *Lactobacillus* do intestino delgado e *Bifidobacterium* do intestino grosso (O'SULLIVAN, 2006; ANVISA, 2008).

Dentre os efeitos benéficos à saúde produzidos por bactérias probióticas, destacam-se: controle das infecções intestinais, melhor absorção de determinados nutrientes, melhor utilização de lactose e o alívio dos sintomas de intolerância a esse açúcar, inibição de micro-organismos patogênicos, redução dos níveis de colesterol, efeito anticarcinogênico e o aumento da resposta imunológica pelo estímulo da produção de anticorpos (SAARELA et al., 2002; VASILJEVIC & SHAH, 2008; SCHMID et al., 2006).

Os micro-organismos probióticos devem apresentar células viáveis em quantidades adequadas no alimento durante toda a estocagem do produto, sendo a dose diária de consumo recomendada de 10^8 - 10^9 Unidades Formadoras de Colônia (UFC), realizada através da ingestão de 100 g de produto contendo 10^6 – 10^7 UFC/g ou mL (ANVISA, 2008).

Diversos estudos comprovaram que vários tipos de queijos apresentam grande potencial para incorporação de bactérias probióticas, dentre eles o Cream Cheese (BURITI et al., 2007; BURITI et al., 2008; ALVES et al., 2008), Petit Suisse, (MARUYAMA et al., 2006), Cheddar (GARDINER et al., 1999; ONG & SHAH, 2009), Cottage (PARODIA, 2010) e Minas Frescal (BURITI et al., 2005a; BURITI et al., 2005b; RIBEIRO et al., 2009; SOUZA & SAAD, 2009; FRITZEN-FREIRE et al., 2010a, FRITZEN-FREIRE et al., 2010b).

A maioria dos queijos possui pH mais elevado quando comparados aos iogurtes e leites fermentados, o que torna o meio mais estável para a sobrevivência das culturas probióticas. Além disso, os queijos, por apresentarem uma quantidade de gordura relativamente alta, oferecem uma proteção para a bactéria probiótica durante sua passagem pelo trato gastrointestinal (GARDINER et al., 1999).

O queijo Minas Frescal é um queijo de origem brasileira, sendo caracterizado como um queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas.

É classificado como queijo semi-gordo (25 a 44% de gordura no extrato seco), de muito alta umidade (não inferior a 55%) a ser consumido fresco, de consistência branda e macia, com ou sem olhaduras mecânicas, de cor esbranquiçada, de sabor suave a levemente ácido, sem ou com crosta fina, de forma cilíndrica e com peso de 0,3 a 5,0 Kg (BRASIL, 1997, 2004).

Porém, quando se trata do consumo de leite e seus derivados lácteos, estudos evidenciam que uma porcentagem significativa da população mundial sofre com transtornos gastrointestinais, tais como flatulência, desconforto abdominal, diarreia e náusea (ANTUNES & PACHECO, 2009). Este transtorno é chamado de intolerância à lactose, ou seja, é a incapacidade de digerir a lactose, o principal açúcar do leite, devido à deficiência ou ausência da enzima β -galactosidase no sistema digestivo (ANGELIS, 2006). O tratamento da intolerância à lactose consiste basicamente na retirada ou diminuição desse açúcar da dieta, o que leva ao desaparecimento progressivo dos sintomas. No entanto, esses indivíduos estariam deixando de usufruir dos benefícios do leite à saúde humana (SUAREZ & SAVAIANO, 1997; CUNHA et al., 2007).

Industrialmente, a lactose do leite pode ser reduzida pelo processo de hidrólise enzimática empregando a enzima β -galactosidase (lactase), a qual hidrolisa o referido dissacarídeo em seus monossacarídeos constituintes, a glicose e a galactose, facilitando sua absorção pelo intestino (GEKAS & LOPEZ-LEIVA, 1985).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade dos micro-organismos probióticos *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium sp.* adicionados a diferentes formulações de queijo Minas Frescal com baixo teor de lactose durante os 21 dias de vida de prateleira do produto, bem como avaliar a composição físico-química dos queijos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Hidrólise da Lactose

Antes do preparo dos queijos, o leite pasteurizado adquirido comercialmente teve sua lactose hidrolisada pela ação da enzima β -galactosidase Lactozym® 3000L HPG (Novozymes), nas seguintes concentrações e tempos de reação: 0,3 g/L de enzima lactase por 12 horas; 0,6 g/L de enzima lactase por 12 horas; 0,9 g/L de enzima lactase por 12 horas; 0,3 g/L de enzima lactase por 24 horas; 0,6 g/L de enzima lactase por 24 horas; 0,9 g/L de enzima lactase por 24 horas. Os leites foram armazenados em frascos de vidro esterilizados e mantidos à temperatura de $5 \pm 1^\circ\text{C}$ durante o período de hidrólise. Depois de transcorridos os

tempos de reação, o leite sofreu pasteurização lenta (63-65°C por 30 minutos), com o intuito de inativar a enzima.

2.2 Elaboração dos Queijos

Seis formulações de queijo Minas Frescal foram produzidas a partir dos leites tratados com a enzima lactase e duas com leites não tratados, adaptando-se o procedimento de fabricação descrito por Furtado & Neto (1994). As variáveis envolvidas seguem na Tabela 1.

Tabela 1 – Variáveis envolvidas na formulação dos queijos Minas frescal.

Tratamentos	Concentração de lactase (g/L)	Tempo de hidrólise (horas)	Concentração de cultura probiótica (%)
T1	0,3	12	1
T2	0,6	12	1
T3	0,9	12	1
T4	0,3	24	1
T5	0,6	24	1
T6	0,9	24	1
T7 (controle)	-	-	1
T8 (controle)	-	-	-

- : sem adição.

Depois de tratado com a enzima lactase nas concentrações e tempos citados anteriormente e inativada a enzima aqueceu-se o leite a 35°C e foram adicionados 1% (p/v) de cultura probiótica (T1 a T7) contendo *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium sp.* BB-12 e *Streptococcus thermophilus* (BioRich[®], Chr. Hansen), 0,04% (v/v) de solução de cloreto de cálcio a 50% (CaCl₂) e 0,08% (v/v) de coalho líquido (Ha-La[®], Chr. Hansen). A coagulação ocorreu em 45 minutos, sendo após realizado o corte da massa, mexedura por 2 minutos, à baixa velocidade, acompanhada de igual período de descanso. A massa foi então dessorada e enformada em formas de fundo perfurado para a eliminação do soro. A salga foi realizada na superfície de ambos os lados dos queijos com 1% de cloreto de sódio (NaCl). Os queijos foram acondicionados a vácuo em embalagens plásticas de polietileno e armazenados em refrigerador a 5±1°C até o momento das análises.

2.3 Análise Físico-química

O índice crioscópico do leite foi determinado antes e depois da ação da lactase, utilizando-se para tal um crioscópio eletrônico da marca ITR, modelo MK 540. O grau de hidrólise do leite foi determinado através da seguinte fórmula (TREVISAN, 2008):

$$\% \text{ Hidrólise alcançada} = 350,877 \times (\text{Crioscopia final}) - \frac{(\text{Crioscopia inicial})}{0,00285} \quad (\text{equação 1})$$

O teor de lactose do leite (matéria-prima) antes de sofrer a hidrólise foi determinado por medida direta através do equipamento de ultra-som Lactoscan 90 (Milkotronic Ltda.).

Nos tratamentos que não sofreram hidrólise (T7 e T8), a lactose foi determinada por titulação pelo método de Lane-Eynon (BRASIL, 2006). Calculou-se a porcentagem de perda normal da lactose durante a fabricação dos queijos Minas dos tratamentos controle T7 e T8, para então se estimar a quantidade de lactose dos queijos que sofreram hidrólise (T1 a T6).

Os queijos foram analisados durante a primeira semana após a fabricação quanto aos parâmetros de acidez (titulação com NaOH 0,1N), pH (pHmetro digital), umidade (secagem em estufa a 105°C), cinzas (incineração em mufla a 550°C), gordura (butirômetro de Gerber) e proteína (método de Kjeldahl). A gordura no extrato seco (GES) foi calculada por diferença.

As determinações de acidez e pH foram feitas semanalmente até o 21º dia de fabricação. Todas as análises físico-químicas foram realizadas em triplicata, seguindo os métodos analíticos oficiais para controle de leite e produtos lácteos (BRASIL, 2006).

2.4 Análise Microbiológica

Foram realizadas as contagens dos micro-organismos *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium sp.* nos dias 1, 7, 14 e 21 após a fabricação dos queijos. Porções de 25 g de queijo (em duplicata) foram homogeneizadas em 225 mL de água peptonada 0,1% (diluição 10⁻¹), sendo posteriormente preparadas diluições subseqüentes, determinando-se o número de células viáveis em alíquota de 1 mL pela técnica *pour plate*.

Para a enumeração de *L. acidophilus* foi utilizado meio MRS-ágar adicionado de solução de maltose a 20% (IDF, 1999) e para a contagem de *Bifidobacterium sp.* utilizou-se meio MRS-ágar adicionado de solução de glicose a 20%, solução de dicloxacilina a 0,01%, solução de cloreto de lítio a 11,11% e de solução de cloreto de cisteína a 10% (Chr Hansen,

1999). As placas foram incubadas invertidas em jarras contendo gerador de anaerobiose Anaerobac (Probac) à 37°C por 72 horas (Chr. Hansen, 1999). Após esse período de incubação foi realizada a contagem de células viáveis probióticas (em duplicata), expressa em log de unidade formadora de colônia por mL (log UFC/mL).

2.5 Análise Estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas entre si pelo Teste de Tukey a nível de 5% de significância ($p < 0,05$), utilizando-se do programa estatístico SPSS 11.5 (Copyright © SPSS Inc., 1989 – 2002).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Grau de hidrólise da lactose do leite

O grau de hidrólise foi calculado através da fórmula apresentada anteriormente (equação 1), sendo que as reduções dos teores de lactose nos leites pasteurizados foram de 50,88% para T1, 62,46% para T2, 74,03% para T3, 60,00% para T4, 72,28% para T5 e 87,72% para T6. Como esperado, observou-se que quanto maior a concentração de enzima, maior o grau de hidrólise encontrado. Quando comparados os tempos de hidrólise, os tratamentos que foram submetidos a 24 horas de reação, apresentaram um grau de hidrólise maior do que os tratamentos da mesma concentração de enzima em 12 horas de reação.

3.2 Lactose dos queijos

A matéria-prima inicial (leite) utilizada na fabricação dos queijos possuía um teor de lactose de 4,43%. Segundo Pereda et al. (2005), o teor de lactose do leite de vaca pode variar entre 4,5 a 5,0%, no entanto existem variações destes valores, pois a composição do leite sofre influências como alimentação animal, raça e estações do ano (TRONCO, 2003).

A Figura 1 apresenta os resultados estimados de lactose dos queijos T1 a T6 e os valores de lactose encontrados através de titulação de Fehling para as formulações sem adição de lactase T7 e T8.

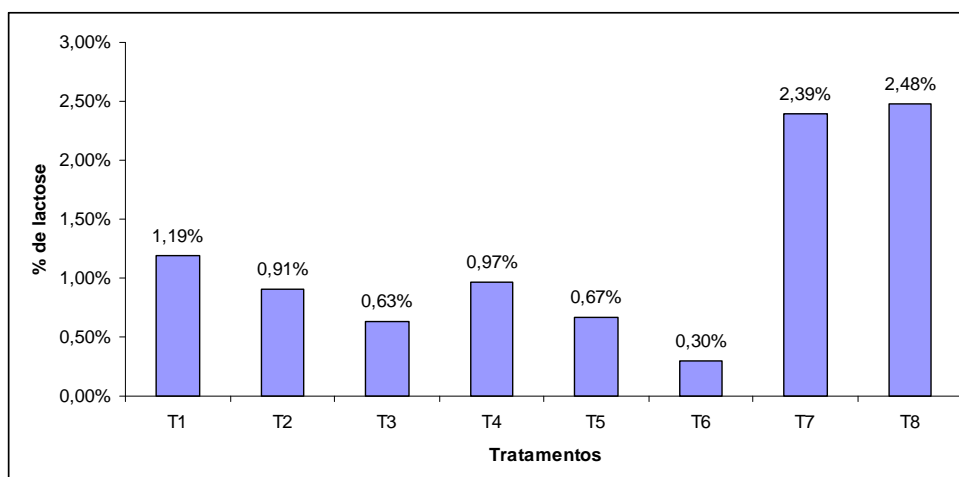


Figura 1 – Teores de lactose dos queijos Minas Frescal elaborados com leite tratado enzimaticamente (T1 a T6) e leites não tratados (T7 e T8).

Caruso & Oliveira (1999) encontraram teores de lactose em queijo Minas Frescal variando entre 2,36 a 2,71%, sendo semelhantes aos resultados encontrados para os tratamentos T7 e T8 deste trabalho.

As reduções dos teores de lactose dos queijos sem adição de enzima lactase foram 46,05% para T7 e 44,01% para T8. Nos queijos que passaram pelo processo de hidrólise, as reduções foram de 73,14% para T1, 79,46% para T2, 85,78% para T3, 78,10% para T4, 84,87% para T5 e 93,23% para T6. Resultado semelhante foi encontrado por Mattanna et al. (2010), onde a redução de lactose foi de 85% em estudo com requeijão cremoso adicionado de 0,8% de enzima lactase durante 12 horas de reação a $8 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Segundo Manan et al. (1999) os sintomas de intolerância à lactose podem ser eliminados quando a lactose é reduzida em 70%. Desta forma, os teores de lactose dos tratamentos adicionados de enzima lactase (T1 a T6) deste estudo podem ser considerados baixos, sendo uma alternativa viável às pessoas com intolerância à lactose. Porém, somente o tratamento T6 encontra-se de acordo com as normas vigentes para alimentos destinados a fins especiais, que preconiza que os alimentos elaborados especialmente para atender às necessidades de portadores de intolerância à ingestão de dissacarídeos devem atender ao máximo de 0,5 g do nutriente em restrito, por 100 g ou 100 mL do produto a ser consumido (BRASIL, 1998).

3.3 Características físico-químicas dos queijos

O Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Minas Frescal (BRASIL, 1997, 2004) classifica esse tipo de queijo quanto ao teor de gordura como semigordo (25,0 a 44,9% de gordura no extrato seco) e ao teor de umidade como de muito alta umidade (não inferior a 55,0%), não se referindo aos teores de proteína, cinzas, acidez e pH..

As médias e os respectivos desvios-padrão dos parâmetros de gordura, proteína, umidade, cinzas e gordura no extrato seco (GES) dos tratamentos T1 a T8 analisados durante a primeira semana de armazenamento encontram-se na Tabela 2. Os teores de gordura no extrato seco variaram de 35,22±1,19% a 40,52±1,19% e umidade de 64,71±0,08% a 71,12±0,18%, estando dentro do estabelecido pela legislação vigente para o queijo Minas Frescal (BRASIL, 1997, 2004).

Tabela 2 – Composição físico-química dos queijos Minas Frescal elaborados com leites tratados enzimaticamente (T1 a T6) e leite não tratado (T7 e T8).

Tratamentos	Gordura*	Proteína*	Umidade*	Cinzas*	GES*
T1	13,38 ± 0,08 ^a	14,64 ± 0,16 ^b	64,71 ± 0,08 ^g	2,48 ± 0,03 ^c	37,93 ± 0,22 ^{abc}
T2	11,70 ± 0,03 ^d	11,67 ± 0,07 ^e	71,12 ± 0,18 ^a	2,62 ± 0,04 ^b	40,52 ± 1,19 ^a
T3	11,94 ± 0,40 ^d	14,60 ± 0,05 ^{bc}	66,10 ± 0,16 ^{de}	2,47 ± 0,01 ^c	35,22 ± 1,19 ^c
T4	13,11 ± 0,03 ^{ab}	15,88 ± 0,22 ^a	65,17 ± 0,22 ^{fg}	2,50 ± 0,01 ^{bc}	37,66 ± 0,09 ^{abc}
T5	12,15 ± 0,23 ^{cd}	14,75 ± 0,15 ^b	66,52 ± 0,52 ^d	2,13 ± 0,01 ^d	36,30 ± 0,70 ^{bc}
T6	11,53 ± 0,54 ^d	13,19 ± 0,45 ^d	69,93 ± 0,05 ^b	2,24 ± 0,02 ^d	38,35 ± 1,79 ^{ab}
T7	12,98 ± 0,23 ^{abc}	14,03 ± 0,17 ^c	65,69 ± 0,14 ^{ef}	2,94 ± 0,09 ^a	37,85 ± 0,68 ^{abc}
T8	12,28 ± 0,46 ^{bcd}	13,04 ± 0,01 ^d	67,61 ± 0,44 ^c	2,51 ± 0,04 ^{bc}	37,93 ± 1,41 ^{abc}

Valores com letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente ($p > 0,05$) entre si pelo teste de Tukey.

* Resultados são as médias ± desvios-padrão expressos em g/100g de amostra.

Os valores de proteína (de 11,67±0,07 % a 15,88±0,22 %), cinzas (2,13±0,01% a 2,94±0,09%) e gordura (de 11,53±0,54% a 13,38±0,08%) encontrados nesse estudo se assemelham aos resultados de Ribeiro et al. (2009), os quais desenvolveram um queijo Minas Frescal adicionado de *Lactobacillus acidophilus* a partir de retentados de ultrafiltração, obtendo valores de proteína entre 13,47% e 13,91%, cinzas de 2,3% a 2,5% e gordura de 13,0% a 13,5%.

Nas Figuras 2 e 3 são apresentadas as variações dos valores de pH e acidez titulável dos queijos (T1 a T8) durante os 21 dias de armazenamento. Observou-se um decréscimo significativo ($p < 0,05$) dos valores de pH de todos os tratamentos até o 21º dia de análise. A

queda do pH foi mais acentuada do 1° ao 7° dia, permanecendo estável até o 14° dia e decrescendo novamente ao 21° dia de análise. Valores médios de pH ficaram na faixa entre 6,61 a 5,23, valores estes semelhantes aos encontrados por Buriti et al. (2005b) (entre 6,72 a 5,37) em estudo avaliando as propriedades de queijo Minas Frescal adicionado de *Lactobacillus acidophilus*.

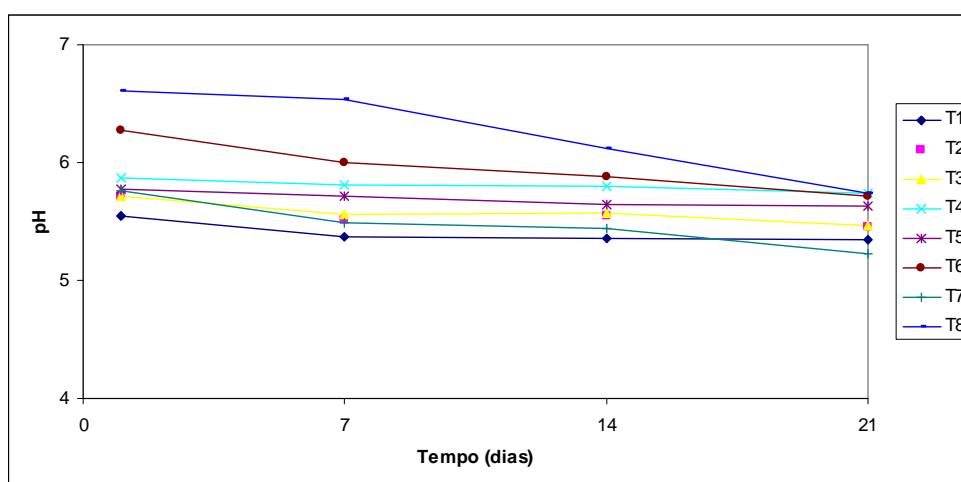


Figura 2 - Valores de pH dos queijos elaborados com leite tratado enzimaticamente (T1 a T6) e leite não tratado (T7 e T8) durante os 21 dias de armazenamento.

Concomitante à queda de pH, observou-se um aumento da acidez dos queijos (Figura 3) durante o armazenamento. Houve um aumento significativo ($p < 0,05$) dos valores médios de acidez para todos os tratamentos até o 14° de armazenamento, sendo que após esse período observou-se um decréscimo significativo desses valores, com exceção do tratamento T7, o qual permaneceu estável.

Os valores médios de acidez obtidos para os queijos T6 (0,13 a 0,22% de ácido láctico) e T8 (0,07 a 0,18% de ácido láctico), foram significativamente menores ($p < 0,05$) que os valores encontrados para os demais tratamentos (entre 0,17 a 0,63% de ácido láctico), com exceção do último dia de análise, onde os valores de acidez de T4, T5 e T6 foram estatisticamente iguais. Da mesma forma, o pH dos tratamentos 6 e 8 foi significativamente maior que os demais, com exceção, novamente, do 21° dia, onde esses valores não diferiram significativamente ($p > 0,05$) de T4.

Sabe-se que a lactose é utilizada como substrato pelas bactérias lácticas, sendo o ácido láctico o principal produto deste metabolismo (PEREDA et al., 2005). Como consequência do tratamento T6 possuir o menor teor de lactose dentre os tratamentos desenvolvidos, apresentou menores teores de ácido láctico e maiores valores de pH. Já o tratamento T8 não passou pelo processo de hidrólise da lactose, porém o fato de não ter sido adicionado de cultura probiótica contribuiu para os menores valores de acidez e maior pH em relação aos demais queijos.

Verificou-se também que o único tratamento que continuou a acidificação após o 14º dia foi o queijo T7, o qual não sofreu hidrólise da lactose sendo somente adicionado de cultura probiótica.

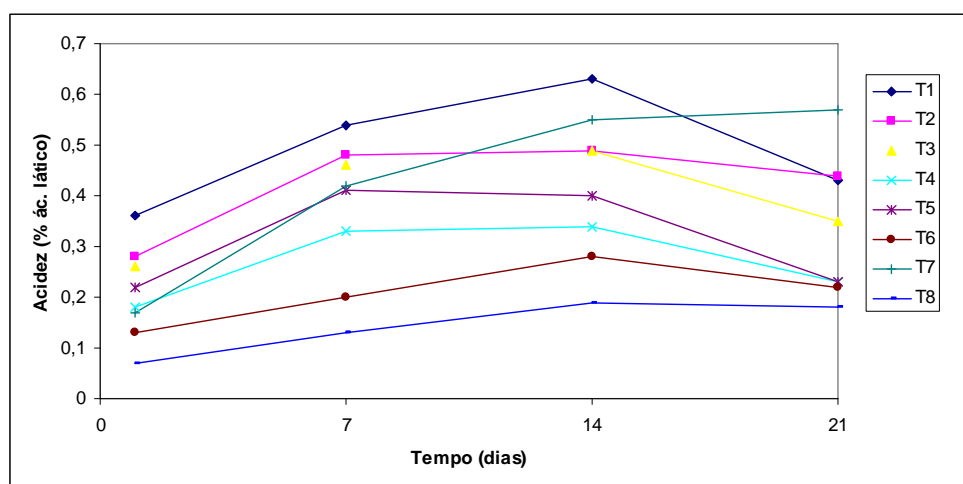


Figura 3 – Valores de acidez (expressos em % de ácido láctico) dos queijos elaborados com leite tratado enzimaticamente (T1 a T6) e leite não tratado (T7 e T8) durante os 21 dias de armazenamento.

3.4 Contagens dos micro-organismos probióticos

As contagens do micro-organismo *Lactobacillus acidophilus* nos queijos T1 a T7 são apresentadas na Tabela 3. Pode se observar um aumento significativo da população de *Lactobacillus acidophilus* até o 21º dia de armazenamento para todos os queijos, porém todos os tratamentos apresentaram contagens abaixo de 10^6 UFC.g⁻¹ em pelo menos um dia de análise. As maiores contagens de *L. acidophilus* foram apresentadas no tratamento T7, as quais variaram de 5,90 a 7,58 log UFC.g⁻¹, aumentando significativamente ($p < 0,05$) em todos os dias de análise. O tratamento T6, o qual sofreu maior porcentagem de hidrólise da lactose,

apresentou menores valores de contagem de *L. acidophilus* nos dias 1, 7 e 14 quando comparados aos demais tratamentos, porém no último dia de estocagem a contagem aumentou significativamente ($\rho < 0,05$) para $7,88 \log \text{UFC.g}^{-1}$, um aumento de aproximadamente 3 ciclos logarítmicos.

Tabela 3 – Contagens ($\log \text{UFC.g}^{-1}$) de *Lactobacillus acidophilus* nos queijos Minas Frescal elaborados com leite tratado enzimaticamente (T1 a T6) e leite não tratado (T7) durante os 21 dias de armazenamento.

Tratamentos	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 21
T1	5,83 \pm 0,03 ABb	6,04 \pm 0,16 Ab	6,16 \pm 0,11 Bb	6,66 \pm 0,37 Ba
T2	5,64 \pm 0,05 BCb	5,57 \pm 0,07 BCb	5,65 \pm 0,04 Cb	6,05 \pm 0,10 Ca
T3	5,45 \pm 0,13 CDb	5,50 \pm 0,08 Cb	5,11 \pm 0,06 Dc	6,91 \pm 0,07 Ba
T4	5,27 \pm 0,05 Dc	5,50 \pm 0,02 Cb	5,58 \pm 0,04 Cb	6,11 \pm 0,05 Ca
T5	5,50 \pm 0,05 Cc	5,74 \pm 0,09 Bb	5,48 \pm 0,18 Cc	6,87 \pm 0,07 Ba
T6	4,89 \pm 0,01 Eb	4,38 \pm 0,01 Dd	4,80 \pm 0,02 Ec	7,88 \pm 0,04 Aa
T7	5,90 \pm 0,19 Ad	6,21 \pm 0,05 Ac	6,66 \pm 0,13 Ab	7,58 \pm 0,07 Aa

A, B, C, D, E Médias na mesma coluna seguidas pela mesma letra (maiúscula) não diferem significativamente entre si ($\rho > 0,05$) pelo teste de Tukey.

a, b, c, d Médias na mesma linha seguidas pela mesma letra (minúscula) não diferem significativamente entre si ($\rho > 0,05$) pelo teste de Tukey.

(T1 – 0,3g β -galactosidase/L leite em 12 horas de hidrólise; T2 – 0,6g β -galactosidase/L leite em 12 horas de hidrólise; T3 – 0,9g β -galactosidase/L leite em 12 horas de hidrólise; T4 – 0,3g β -galactosidase/L leite em 24 horas de hidrólise; T5 – 0,6g β -galactosidase/L leite em 24 horas de hidrólise; T6 – 0,9g β -galactosidase/L leite em 24 horas de hidrólise; T7 – sem adição de beta-galactosidase).

As contagens de *Bifidobacterium sp.* durante os 21 dias de armazenamento são apresentadas na Tabela 4. Observou-se um aumento significativo ($\rho < 0,05$), para todos os tratamentos, da população de *Bifidobacterium* entre o 1° e 21° dia. Observa-se que as diferentes adições de enzima lactase aos queijos do presente estudo não afetaram a viabilidade das bifidobactérias.

Durante todo o período de armazenamento dos queijos, as contagens de *Bifidobacterium* mantiveram-se sempre acima de $6 \log \text{UFC/g}$, em todas as formulações. Desse modo, as contagens desse micro-organismo foram suficientes para conferir propriedade probiótica aos queijos desenvolvidos nesse estudo, considerando o consumo diário de 100 g de queijo contendo 10^6 a 10^7UFC/g (ANVISA, 2008).

Tabela 4 – Contagens (log UFC.g⁻¹) de *Bifidobacterium sp.* nos queijos Minas Frescal elaborados com leite tratado enzimaticamente (T1 a T6) e leite não tratado (T7 e T8) durante os 21 dias de armazenamento.

Tratamentos	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 21
T1	6,07 ±0,07 ^{Bb}	6,13 ±0,06 ^{CDb}	6,12 ±0,05 ^{Bb}	6,53 ±0,06 ^{Ba}
T2	6,31 ±0,04 ^{ABb}	6,61 ±0,06 ^{Aba}	6,57 ±0,11 ^{Aa}	6,72 ±0,12 ^{Ba}
T3	6,07 ±0,06 ^{Bb}	6,06 ±0,08 ^{Db}	6,07 ±0,09 ^{Bb}	6,58 ±0,37 ^{Ba}
T4	6,05 ±0,08 ^{Bb}	6,59 ±0,08 ^{Ba}	6,64 ±0,08 ^{Aa}	6,50 ±0,31 ^{Ba}
T5	6,07 ±0,06 ^{Bb}	6,30 ±0,14 ^{Cb}	6,08 ±0,28 ^{Bb}	6,71 ±0,18 ^{Ba}
T6	6,76 ±0,09 ^{Abc}	6,62 ±0,09 ^{Abc}	6,80 ±0,10 ^{Ab}	7,90 ±0,04 ^{Aa}
T7	6,33 ±0,75 ^{ABb}	6,80 ±0,10 ^{Aab}	6,73 ±0,29 ^{Aab}	7,58 ±0,10 ^{Aa}

A, B, C, D Médias na mesma coluna seguidas pela mesma letra (maiúscula) não diferem significativamente entre si ($\rho > 0,05$) pelo teste de Tukey.

a, b, c Médias na mesma linha seguidas pela mesma letra (minúscula) não diferem significativamente entre si ($\rho > 0,05$) pelo teste de Tukey.

Buriti et al. (2005b) obtiveram contagens de *Lactobacillus acidophilus* ente de 10^6 - 10^7 UFC.g⁻¹ em queijo Minas Frescal, resultados também comprovados por Souza & Saad (2009) em trabalho com o mesmo tipo de queijo. Porém no presente estudo, a baixa viabilidade de *L. acidophilus* pode ter sofrido influência dos baixos teores de lactose dos queijos. Já as maiores contagens de *Bifidobacterium sp.* pode ter sido em virtude deste micro-organismo ser também capaz de fermentar hidratos de carbono complexos (CROCIANI et al., 1994). Maruyama et al. (2006), encontraram contagens de *L. acidophilus* cerca de 1 ciclo log menores das apresentadas por *Bifidobacterium longum* em queijos *petit-suisse*, sugerindo que se aumentasse a percentagem da cultura de *L. acidophilus* para resultados mais favoráveis.

Em estudo desenvolvido por Becker (2009), os micro-organismos probióticos *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* se mantiveram viáveis até o fim da vida de prateleira em iogurtes adicionados de enzima lactase nas concentrações de 0,2, 0,5 e 0,8%, confirmando a possibilidade do desenvolvimento destes micro-organismos mesmo a baixos teores de lactose, assim como no presente trabalho, uma vez que as concentrações de bifidobactéria mantiveram-se sempre acima de 10^6 UFC.g⁻¹.

4 CONCLUSÕES

A enzima lactase utilizada em concentrações de 0,3, 0,6 e 0,9 g/L reduziu de maneira eficaz o conteúdo de lactose nos queijos, uma vez que estas reduções foram superiores a 70%,

podendo se inferir que as formulações com teores reduzidos de lactose desenvolvidas neste estudo podem diminuir os sintomas de intolerância.

As contagens de *Bifidobacterium sp.* mantiveram-se sempre acima de 10^6 UFC.g⁻¹, conferindo potencialidade probiótica às formulações de queijo Minas Frescal desenvolvidas, independente da quantidade de enzima lactase adicionada.

Desta forma, os queijos Minas Frescal com teor reduzido de lactose desenvolvidos nesse estudo mostram-se como uma opção positiva para o mercado de laticínios, atendendo a demanda por uma alimentação saudável através da ingestão de probióticos e sendo, ainda, alternativa inovadora a pessoas com intolerância a lactose.

SUMMARY

The objective was to assess the viability of probiotic microorganisms *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium sp.* added to different formulations of Minas fresh cheese with reduced content of lactose. Eight formulations of Minas fresh cheese were developed, named T1 to T6 those added of 1% of the probiotic culture, with concentrations of lactase 0,3 g/L, 0,6 g/L and 0,9 g/L and hydrolysis time of 12 and 24 hours, and the control formulation T7 (without lactase and 1% of the probiotic culture) and T8 (no lactase and without probiotic). The cheeses were subjected to a microbiological count of probiotic microorganisms weekly during the storage period, as well as the physical-chemical analysis of fat, protein, moisture, ash, fat in dry matter, acidity and pH. The reduction of lactose in cheeses with added lactase ranged from 73,14 to 93,23%. Although the counts of *Lactobacillus acidophilus* ($4,38 \pm 0,01$ a $7,88 \pm 0,07$ log cfu.g⁻¹) have not reached the minimum value of 10^6 cfu g⁻¹ on all days of storage, the population of *Bifidobacterium sp.* ($6,05 \pm 0,08$ e $7,90 \pm 0,04$ log cfu.g⁻¹) remained above 6.00 log cfu.g⁻¹ for all the formulations, thus providing probiotic feature to cheeses. The results demonstrate the possibility of the incorporation of probiotic bacteria in cheeses with low lactose content, so an innovative alternative to the lactose intolerant market.

Index terms: cheese, probiotic, lactose.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, L. L.; MATTANNA, P.; BECKER, L. V.; RICHARDS, N. S. P. S.; ANDRADE, D. F. Avaliação sensorial de cream cheeses potencialmente simbióticos utilizando a metodologia de superfície de resposta. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.19, n.4, p. 409-416, out./dez. 2008.

ANGELIS, R. C. **Alergias alimentares**. São Paulo: Atheneu, 2006. 123p.

ANTUNES, A. E. C.; PACHECO, M. T. B. **Leite para adultos: Mitos e fatos frente à ciência**. São Paulo: Varela, 2009. 457p.

BECKER, L. V. **Iogurte probiótico com teor reduzido de lactose adicionado de óleo de linhaça**. 2009. 110p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do queijo Minas Frescal**. Portaria nº 352, de 04 de setembro de 1997. Brasília, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regulamento Técnico Referente a Alimentos para Fins Especiais**. Portaria nº 29 de 13 de janeiro de 1998. Brasília, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijos**. Instrução Normativa nº 4, de 01 de março de 2004. Brasília, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos**. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Brasília, 2006.

ANVISA. 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. Brasília, 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecnologia_lista.htm>. Acesso em 23 dez. 2010.

BURITI, F.C.A.; CARDARELLI, H.R.; FILISETTI, T.M.C.C; SAAD, S.M.I. Synbiotic potential of fresh cream cheese supplemented with inulin and *Lactobacillus paracasei* in co-culture with *Streptococcus termophilus*. **Food Chemistry**, v.104, n.4, p. 1605-1610, 2007.

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**, v.44, n.1, p.75-84, 2008.

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

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

CARUSO, E.C.; OLIVEIRA, A.J. Quantificação de lactose em queijo Minas Frescal. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.56, n.1, 1999.

CHRISTIAN HANSEN. Method for counting probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacteria* in milk products made with nutrish cultures. 5 p. [Analytical Procedure]. 1999.

CROCIANI, F.; ALESSANDRINI, A.; MUCCI, M.M.; BIAVATI, B. Degradation of complex carbohydrates by *Bifidobacterium* ssp. **International Journal of Food Microbiology**, v.24, p.199-210, 1994.

CUNHA, L. R.; SOARES, N. F. F; ASSIS, F. C. C.; MELO, M. R.; PEREIRA, A. F.; SILVA, C. B. Desenvolvimento e avaliação de embalagem ativa com incorporação de lactase. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, p.23-26, ago. 2007.

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. 34p. Disponível em: <http://www.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf>. Acesso em: dez. 2010.

FRITZEN-FREIRE, C.B.; MULLER, C.M.O.; LAURINDO, J.B.; AMBONI, R.D.M.C.; PRUDÊNCIO, E.S. The effect of direct acidification on the microbiological, physicochemical and sensory properties of probiotic Minas Frescal cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v.63, p.1-8, 2010a.

FRITZEN-FREIRE, C.B.; MULLER, C.M.O.; LAURINDO, J.B.; PRUDÊNCIO, E. 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, 2010b.

FURTADO, M.M.; NETO, J.P.M. **Tecnologia de Queijos: Manual técnico para a produção industrial de queijos**. São Paulo: Dipemar, 1994.

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

GEKAS, V.; LÓPEZ-LEIVA, M.H. Hydrolysis of Lactose – a Literature Review. **Process Biochemistry**, v.20, n.1, p.2-12, 1985.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Detection and enumeration of *Lactobacillus acidophilus*. Bulletin of the IDF, n. 306, p. 23-33, 1999.

MANAN, D.M.A.; KARIM, A.A.; KIT, W.K. Lactose content of modified enzyme-treated “dadih”. **Food Chemistry**, n.65, p.430-443, 1999.

MARUYAMA, L.Y.; CARDARELLI, H.R.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Textura instrumental de queijo *Petit Suisse* potencialmente probiótico: influência de diferentes combinações de gomas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.2, p.386-393, 2006.

MATTANNA, P.; RICHARDS, N.S.P.S.; BACK, D. Perfil lipídico, caracterização físico-química e sensorial de requeijão com baixo teor de lactose e requeijões comerciais. **Revista Indústria de Laticínios**, v.87, p. 62-67, 2010.

ONG, L.; SHAH, N.P. Probiotic Cheddar cheese: Influence of ripening temperatures on survival of probiotic microorganisms, cheese composition and organic acid profiles. **Food Science and Technology**, v.42, p.1260-1268, 2009.

O'SULLIVAN, D. J. Primary Sources of Probiotic Cultures. In: **Probiotics in food safety and human health**. Boca Raton: Taylor&Francis, 2006. 468p.

PARODIA, C.G. **Desenvolvimento de queijo Cottage simbiótico**. 2010. 120p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

PEREDA, J.A.O.; RODRÍGUEZ, M.I.C.; ÁLVAREZ, L.F.; SANZ, M.L.G.; MINGUILLÓN, G.D.G.F.; PERALES, L.H.; CORTECERO, M.D.S. Tecnologia de alimentos. v.2. Alimentos de origem animal. São Paulo:Artmed. 2005. 279p.

RIBEIRO, E.P.; SIMÕES, L.G.; JURKIEWICKZ, C.H. Desenvolvimento de queijo minas frescal adicionado de *Lactobacillus acidophilus* produzido a partir de retentados de ultrafiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.29, n.1, p19-23, 2009.

SAARELA, M.; LÄHTEENMÄKI, L.; CRITTENDEN, R.; SALMINEN, S.; MATTILA-SANDHOLM, T. Gut bacteria and health foods – the European perspective. **International Journal of Food Microbiology**, v.78, n.1-2, p.99-117, 2002.

SCHMID, K. et al. Development of probiotic food ingredients. In: **Probiotics in food safety and human health**. Boca Raton: Taylor&Francis, 2006. 468p.

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 cheese during storage. **Food Science and Technology**, v.42, p.633-640, 2009.

SUAREZ, F.L.; SAVAIANO, D.A. Diet, genetics, and lactose intolerance. **Food Technology**, Chicago, v.51, n.3, p.74-76, 1997.

TREVISAN, A.P. **Influência de diferentes concentrações de enzimas lactase e temperaturas sobre a hidrólise da lactose em leite pasteurizado**. 2008. 60p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

TRONCO, V.M. **Manual Para Inspeção da Qualidade do Leite**. Santa Maria: UFSM, 2003. 166p.

VASILJEVIC, T., SHAH, N.P. Probiotics - From Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v.18, p.714– 728, 2008.

3.2 Manuscrito 2

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

Dairy Journal

(Configuração conforme normas da Revista – Anexo C)

Textura instrumental e avaliação sensorial de queijo Minas Frescal potencialmente probiótico com teor reduzido de lactose pela ação da enzima β -galactosidase

Daniele Back, Paula Mattanna, Diego F. de Andrade, Neila S.P.S. Richards*

**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 avaliar o perfil de textura instrumental e as características sensoriais das formulações de queijo Minas Frescal potencialmente probióticos adicionadas de diferentes concentrações de enzima β -galactosidase (0,3; 0,6 e 0,9 g/L em 12 e 24 horas de reação). A textura instrumental foi determinada por texturômetro TA-XT.plus e a análise sensorial foi conduzida através de teste discriminativo de ordenação. Não se observou diferença significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos quanto aos parâmetros de firmeza, coesividade e gomosidade e, apesar de existirem diferenças significativas quanto aos valores de elasticidade e mastigabilidade, tais valores foram bastante similares, podendo-se inferir que a redução do teor de lactose não teve influência sobre a textura instrumental dos queijos. Os provadores detectaram diferenças no gosto doce e gosto ácido entre as

amostras, porém não se observou diferença estatística quanto à textura entre o queijo com menor teor de lactose e as formulações controle.

1. Introdução

A intolerância à lactose é uma inabilidade para digerir completamente a lactose, o açúcar predominante do leite, devido à deficiência ou ausência da enzima β -galactosidase, comumente chamada de lactase, presente nas vilosidades intestinais (Angelis, 2006; Téo, 2002). Essa condição afeta mais de 75% da população mundial, dos quais aproximadamente 5% ocorrem no norte da Europa, e mais de 90% em alguns países da Ásia e da África (Bulhões et al., 2007). Os principais sintomas da intolerância à lactose são: flatulência, desconforto abdominal, diarreia, náusea e borborismo ou mesmo sintomas sistêmicos como dores de cabeça, perda de concentração e dores musculares (Antunes & Pacheco, 2009; Ratzinger et al., 2010). Campbell et al. (2010) em diversas pesquisas propôs que estes sintomas são causados pelos gases hidrogênio e metano e toxinas produzidos pelas bactérias no intestino grosso quando metabolizam os carboidratos não digeridos completamente no intestino delgado.

A hidrólise da lactose é um processo promissor na indústria de alimentos para o desenvolvimento de novos produtos sem lactose em sua composição (Gekas & López-Leiva, 1985). A β -galactosidase (EC 3.2.1.23) cataliza a reação enzimática de hidrólise da lactose a glicose e galactose (Pessela et al, 2003), sendo estes monossacarídeos mais doces que a lactose, e, portanto, podem aumentar a doçura de produtos lácteos com baixo teor de lactose (Jelen & Tossavainen, 2003). Além do aumento do poder adoçante, outras modificações físicas e químicas podem ser

ocasionadas pela reação de hidrólise, como aumento da solubilidade e da digestibilidade dos açúcares e acentuação da viscosidade, do corpo, da textura e do paladar dos produtos (Vinhaal, 2001).

Probióticos são micro-organismos vivos adicionados aos alimentos que afetam benéficamente o hospedeiro, melhorando o equilíbrio microbiano intestinal (Fuller, 1989). Bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são mais freqüentemente empregadas como suplementos probióticos para alimentos (Saad, 2006). Dentre os benefícios à saúde provocados pela ingestão destes micro-organismos está a diminuição dos sintomas da intolerância à lactose, pela produção intracelular de β -galactosidase no trato gastrointestinal pelas bactérias probióticas (Vasiljevic & Shah, 2008). Jiang et al. (1996) em estudo clínico envolvendo indivíduos com má absorção de lactose, observou uma diminuição dos sintomas quando se ingeriu leite contendo *Bifidobacterium longum*.

Além de serem capazes de sobreviver satisfatoriamente no alimento, organismos probióticos não devem afetar a composição, a textura ou *flavor* do alimento (Vinderola et al., 2000).

O Minas Frescal é um dos queijos mais populares do Brasil, sendo consumido por todas as camadas da população durante todo o ano, em lanches, cafés da manhã e como sobremesa. É classificado como queijo semi-gordo (25 a 44% de gordura no extrato seco), de muito alta umidade (não inferior a 55%) a ser consumido fresco, de consistência branda e macia, com ou sem olhaduras mecânicas, de cor esbranquiçada, de sabor suave a levemente ácido, sem ou com crosta fina (Brasil, 2004). Por ser um queijo fresco, para consumo imediato e de curta durabilidade no mercado (Furtado, 2005), a adição de micro-organismos

probióticos é atrativa, uma vez que tais características beneficiam a sobrevivência das culturas (Vinderola et al., 2000).

Tendo em vista a necessidade do desenvolvimento de novos produtos que atendam o público intolerante à lactose, é de extrema importância entender as características tecnológicas de produtos lácteos com baixo conteúdo do referido dissacarídeo. Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar o perfil de textura instrumental e as características sensoriais das formulações de queijo Minas Frescal potencialmente probióticos preparados com leite adicionado de diferentes concentrações de enzima β -galactosidase.

2. Material e Métodos

2.1 Processamento do queijo Minas Frescal

O leite utilizado para fabricação dos queijos Minas Frescal teve sua lactose hidrolisada pela ação da enzima β -galactosidase (Lactozym® 3000L HPG, Novozymes) nas concentrações e tempos de reação que seguem na Tabela 1. Os leites foram armazenados em frascos de vidro esterilizados e mantidos à temperatura de $5\pm 1^\circ\text{C}$ durante o período de hidrólise. Depois de transcorridos os tempos de reação, o leite sofreu pasteurização lenta ($63\text{-}65^\circ\text{C}$ por 30 minutos), com o intuito de inativar a enzima.

Após a matéria-prima passar pelo processo de hidrólise e ter a enzima inativada, seguiu-se para o processamento dos queijos adaptando-se procedimento de Furtado & Neto (1994). Aqueceu-se o leite a 35°C e foram adicionados 1% (p/v) de cultura probiótica (T1 a T7) contendo *Lactobacillus acidophilus* LA-5,

Bifidobacterium sp. BB-12 e *Streptococcus thermophilus* (BioRich[®], Chr. Hansen), 0,04% (v/v) de solução de cloreto de cálcio a 50% (CaCl₂) e 0,08% (v/v) de coalho líquido (Ha-La[®], Chr. Hansen). A coagulação ocorreu em 45 minutos, sendo após realizado o corte da massa, mexedura por 2 minutos, à baixa velocidade, acompanhada de igual período de descanso. A massa foi então dessorada e enformada em formas de fundo perfurado para a eliminação do soro. A salga foi realizada na superfície de ambos os lados dos queijos com 1% de cloreto de sódio (NaCl). Os queijos foram acondicionados a vácuo em embalagens plásticas de polietileno e armazenados em refrigerador a 5±1°C até o momento das análises.

2.2 Determinação do grau de hidrólise

O teor de lactose do leite (matéria-prima) antes de sofrer a hidrólise foi determinado por medida direta através do equipamento de ultra-som Lactoscan 90 (Milkotronic Ltda.).

Para determinar o grau de hidrólise atingido foi medido o índice crioscópico do leite antes e depois da ação da lactase, utilizando-se para tal um crioscópio eletrônico da marca ITR, modelo MK 540. O grau de hidrólise do leite foi determinado através da seguinte fórmula (Trevisan, 2008):

$$\% \text{ Hidrólise alcançada} = 350,877 \times (\text{Crioscopia final}) - \frac{(\text{Crioscopia inicial})}{0,00285} \quad (\text{Equação 1})$$

Nos tratamentos que não sofreram hidrólise (T7 e T8), a lactose dos queijos foi determinada por titulação pelo método de Lane-Eynon (Brasil, 2006). Calculou-se a porcentagem de perda normal da lactose durante a fabricação dos queijos Minas

dos tratamentos controle T7 e T8, para então se estimar a quantidade de lactose dos queijos que sofreram hidrólise (T1 a T6), partindo do grau de hidrólise do leite calculado pela Equação 1.

2.3 Determinação da acidez titulável e pH durante armazenamento

Os queijos foram analisados quanto à acidez e pH após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento a $5 \pm 1^\circ\text{C}$. A acidez foi determinada por titulação com NaOH 0,1N, sendo os resultados expressos em porcentagem de ácido láctico. Para determinação do pH foi utilizado um pHmetro digital (Digimed DM3020, SP Labor, Presidente Prudente, Brasil). As análises foram realizadas em triplicata e seguindo a legislação vigente para controle de leite e produtos lácteos (Brasil, 2006).

2.4 Análise instrumental do perfil de textura

A análise instrumental do perfil de textura (TPA) foi conduzida em texturômetro TA-XT.plus sendo os dados coletados através do programa Texture Expert Exponent (Stable Micro Systems Ltd., Surrey, England). As determinações foram realizadas no 7º dia após a fabricação dos queijos, em quadruplicata, sendo as amostras de queijo cortadas em cubos de 2 cm^3 e mantidas em temperatura ambiente por 20 minutos antes do teste. Foi empregado o teste de dupla compressão, a uma velocidade de 5 mm.s^{-1} , distância de 10 mm, utilizando probe de 36 mm de diâmetro. Foram analisados os atributos de firmeza, coesividade, adesividade, elasticidade, gomosidade e mastigabilidade.

2.5 Análise Sensorial

A avaliação sensorial deste trabalho foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria (23081.006882/2010-40). A análise sensorial dos queijos foi realizada no 7º dia após a fabricação, levando em consideração o tempo necessário para o equilíbrio dos componentes bioquímicos que interferem no sabor do queijo. Primeiramente, foi realizada uma sessão com 40 provadores semi-treinados onde foram avaliados os atributos sensoriais de textura, gosto doce e gosto ácido dos tratamentos adicionados de lactase (T1 a T6) através de teste discriminativo de ordenação (Dutcosky, 2007), com intuito de verificar se os provadores perceberiam diferença entre as formulações com baixo teor de lactose. Numa segunda sessão, 40 provadores semi-treinados avaliaram o tratamento com maior porcentagem de hidrólise (T6) e os tratamentos controle (T7 e T8), também através de teste discriminativo de ordenação avaliando os mesmos parâmetros, desta vez com a finalidade de se verificar a influência da diminuição da lactose e da adição de probióticos nos atributos sensoriais dos queijos desenvolvidos.

As amostras foram apresentadas aleatoriamente aos julgadores, em recipientes codificados com números de três dígitos. Solicitou-se que se ordenassem as amostras em ordem crescente quanto ao gosto doce, ao gosto ácido e à maciez (textura).

2.6 Análise estatística

Os resultados sensoriais foram avaliados pelo teste de Friedmann, utilizando a tabela de Newell e Macfarlane (Dutcosky, 2007).

Os resultados das análises de acidez, pH e do perfil de textura foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de significância ($p < 0,05$), utilizando o programa estatístico SPSS 11.5 (Copyright © SPSS Inc., 1989 – 2002).

3. Resultados e Discussão

3.1 Hidrólise da lactose

O grau de hidrólise da lactose nos leites utilizados na formulação dos queijos foi de 50,88% para T1, 62,46% para T2, 74,03% para T3, 60,00% para T4, 72,28% para T5 e 87,72% para T6, podendo-se relacionar o aumento do teor de hidrólise com o aumento da quantidade de enzima adicionada. Em relação aos tempos de reação, os tratamentos que foram submetidos a 24 horas de reação, apresentaram um grau de hidrólise maior do que os tratamentos da mesma concentração de enzima em 12 horas de reação.

A lactose encontrada nos queijos controle T7 e T8 foi de 2,39 e 2,48%, respectivamente. Sendo o teor de lactose encontrado no leite utilizado na fabricação dos queijos de 4,43%, a redução no teor desse dissacarídeo foi de 46,05% para T7 e 44,01% para T8. Dessa forma, estimou-se que há uma perda de lactose de, em média, 45% durante o processamento normal (sem adição de lactase) dos queijos Minas Frescal, e, partindo-se do grau de hidrólise do leite, calcularam-se os valores estimados de lactose para as formulações T1 a T6 (Figura 1).

Partindo-se da quantidade inicial de lactose do leite (4,43%), as reduções estimadas dos teores de lactose dos queijos que passaram pelo processo de

hidrólise foram de 73,14% para T1, 79,46% para T2, 85,78% para T3, 78,10% para T4, 84,87% para T5 e 93,23% para T6. Segundo Manan et al. (1999) os sintomas de intolerância à lactose podem ser minimizados quando a lactose é reduzida em 70%. Desta forma, os teores de lactose dos tratamentos adicionados de enzima lactase (T1 a T6) deste estudo podem ser considerados baixos, sendo uma alternativa viável às pessoas com má absorção de lactose. Porém, somente o tratamento T6 encontra-se de acordo com as normas vigentes para alimentos destinados a fins especiais, que preconiza um teor de 0,5 g de lactose/100g ou mL de produto final (BRASIL, 1998).

3.2 Evolução dos parâmetros de acidez e pH

As Tabelas 2 e 3 mostram os resultados das análises de pH e acidez titulável dos oito tratamentos de queijo Minas Frescal durante o armazenamento. Observou-se um decréscimo dos valores de pH e um aumento da acidez de todos os tratamentos entre o 1º e o 21º dia de análise.

Os valores médios de acidez obtidos para os queijos T6 e T8 foram significativamente menores ($p < 0,05$) que os valores encontrados para os demais tratamentos, com exceção do último dia de análise, onde os valores de acidez de T4, T5 e T6 foram estatisticamente iguais. Da mesma forma, o pH dos tratamentos 6 e 8 foi significativamente maior que os demais, com exceção, novamente, do 21º dia, onde esses valores não diferiram significativamente ($p > 0,05$) de T4.

Como consequência do tratamento T6 possuir o menor teor de lactose dentre os tratamentos desenvolvidos, apresentou menores teores de ácido láctico e maiores valores de pH. Já o tratamento T8 não passou pelo processo de hidrólise da lactose,

porém o fato de não ter sido adicionado de cultura probiótica contribuiu para os menores valores de acidez e maior pH em relação aos demais queijos.

3.3 Perfil de textura

Os resultados da análise de textura instrumental dos queijos com baixo teor de lactose (T1 a T6) e dos queijos controle (T7 e T8) são encontrados na Tabela 4. Observou-se que os parâmetros de firmeza, coesividade e gomosidade não diferiram estatisticamente entre os tratamentos ($p > 0,05$).

Diferenças estatísticas ($p < 0,05$) foram observadas nos parâmetros de elasticidade e mastigabilidade. Os tratamentos T2, T6, T7 e T8 apresentaram menores valores de elasticidade, enquanto que o tratamento T4 apresentou o maior valor. Em relação à mastigabilidade, o menor valor foi observado em T2, enquanto que o maior valor foi verificado em T4.

No presente trabalho, esperava-se que a diminuição dos teores de lactose pudesse produzir uma maior variação nos parâmetros de textura instrumental, uma vez que a hidrólise da lactose pode causar modificações físicas como acentuação da viscosidade, do corpo e da textura (Vinha, 2001).

Apesar de haver diferenças estatísticas nos resultados de elasticidade e mastigabilidade entre os tratamentos, os resultados foram bastante semelhantes entre si, podendo-se inferir que a adição da enzima β -galactosidase com a consequente redução dos teores de lactose não influenciou as características de textura instrumental dos queijos desenvolvidos.

Quanto à adição da cultura probiótica, não se observaram diferenças estatísticas quanto aos parâmetros de firmeza, elasticidade, coesividade,

gomosidade e mastigabilidade entre os tratamentos T7 (adicionado de cultura) e T8 (não adicionado de cultura).

3.4 Características sensoriais

A Tabela 5 apresenta os resultados dos somatórios dos julgamentos quanto ao gosto doce, gosto ácido e à textura dos queijos formulados com leite tratado com a enzima lactase (T1 a T6). Pela tabela de Newell e Macfarlane (Dutcosky, 2007), a diferença mínima significativa a 5% entre os totais de ordenação, considerando 40 julgadores e 6 amostras, é de 48. Sendo assim, pode se inferir que os provadores detectaram diferença quanto ao gosto doce das amostras, sendo o tratamento T6 considerado o queijo com gosto doce mais intenso. Esse resultado mostra-se coerente uma vez que o queijo T6 apresentou maior grau de hidrólise da lactose, e, conseqüentemente, um gosto doce mais acentuado pela presença de glicose e galactose liberadas. Já os tratamentos T1, T2, T3, T4 e T5 não diferiram estatisticamente entre si quanto ao gosto doce.

O tratamento T6 foi indicado pelos provadores como o queijo com gosto menos ácido quando comparado com os demais tratamentos com baixos teores de lactose, resultado que pode ser comprovado pelos menores valores de acidez de T6 determinados pela análise da acidez titulável (Tabela 3).

Quanto à textura, os provadores detectaram diferenças sensoriais entre os tratamentos formulados com leite tratado enzimaticamente, sendo o queijo T2 apontado como tendo a textura mais macia e o queijo T5 o de textura menos macia.

Embora observadas diferenças sensoriais quanto à textura entre os tratamentos com teor de lactose reduzido (T1 a T6), a avaliação da textura

instrumental, de uma maneira geral, não detectou diferenças estatísticas ($p > 0,05$) entre os mesmos tratamentos.

Da mesma forma, comparando a formulação com maior porcentagem de hidrólise da lactose (T6) com as formulações controle T7 e T8 (Tabela 6) não foi detectada diferença sensorial no parâmetro textura, considerando a diferença mínima significativa entre os totais de ordenação de 21 (40 provadores e 3 amostras) (Dutcosky, 2007).

A formulação T7 apresentou maior gosto ácido, enquanto que T6 e T8 não apresentaram diferenças significativas entre si (Tabela 6). Mais uma vez, os resultados sensoriais de gosto ácido são coerentes com os encontrados pela análise de acidez titulável (Tabela 3), onde o tratamento T7 apresentou maiores valores de acidez quando comparados aos tratamentos T6 e T8.

Os tratamentos T6 e T8 não apresentaram diferenças significativas quanto ao gosto doce, apesar de T6 apresentar o maior somatório dos julgamentos, sendo T7 considerado o menos doce dentre os três queijos avaliados. Essa diferença no gosto doce deve-se ao fato de a lactose ter um fraco poder adoçante. A título de comparação, a frutose tem o índice 170, a sacarose 100, a glicose 75 e a lactose apenas 17 (Goursaud, 1985).

Longo & Waszczynskyj (2005) compararam sensorialmente amostras comerciais de leite UHT com teor de lactose normal e leite UHT com baixo teor de lactose e verificaram diferenças significativas em relação aos atributos gosto doce e textura, sendo que o leite com baixo teor de lactose apresentou gosto doce mais intenso e viscosidade significativamente mais espessa que o leite com teor de lactose normal. Adhikari et al (2010) também constataram diferenças estatísticas

quanto ao gosto doce de amostras comerciais de leite, sendo que os leites livres de lactose apresentaram doçura mais intensa.

Já Moreira et al. (2009) em estudo com doce de leite com teor reduzido de lactose pela adição de 0,8 g de β -galactosidase por litro de leite, não observaram diferença significativa (em nível de 5%) quanto ao sabor das amostras com teor reduzido de lactose comparadas ao doce de leite padrão, sem o uso da enzima, em teste sensorial de comparação múltipla.

Relacionando os parâmetros sensoriais à adição de probióticos, pode se verificar que a presença de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium sp.* não tiveram influência sobre a textura, uma vez que os provadores não detectaram diferença sensorial entre a amostra adicionada da cultura probiótica (T7) e a não adicionada (T8) (Tabela 6), porém a adição destes micro-organismos pode ter influenciado a percepção do gosto ácido mais intenso do tratamento T7. Buriti et al. (2005a, 2005b, 2007) em seus diversos estudos realizados com queijos Minas Frescal suplementados com bactérias probióticas, puderam concluir que a adição de micro-organismos como *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* e *Bifidobacterium animalis* não alterou a textura e as características sensoriais dos queijos.

4. Conclusão

A hidrólise da lactose do leite conferiu um gosto doce mais intenso às formulações de queijo Minas Frescal, sendo que os provadores detectaram diferença sensorial na formulação com menor teor de lactose quando comparada aos demais tratamentos. Tal característica pode melhorar o sabor dos queijos, uma

vez que foi detectada menor percepção do gosto ácido na formulação com maior hidrólise da lactose.

Os queijos com baixo teor de lactose apresentaram um perfil de textura similar às formulações controle, pois não foram detectadas diferenças sensoriais e nem instrumentais quanto à textura.

Os queijos Minas Frescal produzidos obtiveram resultados satisfatórios quanto ao grau de hidrólise da lactose, podendo ser consumidos por pessoas com má absorção do carboidrato.

Agradecimentos

Os autores agradecem Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil, pela concessão de bolsa de mestrado do primeiro autor e ao apoio do Edital Capes nº 13/2008 - Pró-Equipamentos Institucional.

Referências

- Adhikari, K.; Dooley, L.M.; Chambers IV, E.; Bhumiratana, N. (2010). Sensory characteristics of commercial lactose-free milks manufactured in the United States. *LWT - Food Science and Technology*, 43, 113-118.
- Angelis, R. C. (2006). *Alergias alimentares*. São Paulo: Atheneu. 123p.
- Antunes, A. E. C.; Pacheco, M. T. B. (2009). *Leite para adultos: Mitos e fatos frente à ciência*. São Paulo: Varela. 457p.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do queijo Minas Frescal*. Portaria nº 352, de 04 de setembro de 1997. Brasília, 1997.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Regulamento Técnico Referente a Alimentos para Fins Especiais*. Portaria nº 29 de 13 de janeiro de 1998. Brasília, 1998.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos*. Instrução Normativa nº68, de 12 de dezembro de 2006. Brasília, 2006.

Bulhões, A.C.; Goldani, H.A.S; Oliveira, F.S.; Matte, U.S.; Mazzuca, R.B.; Silveira, T.R. (2007). Correlation between lactose absorption and the C/T-13910 and G/A-22018 mutations of the lactase-phlorizin hydrolase (LCT) gene in adult-type hypolactasia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 40, 1441-1446.

Buriti, F.C.A; Rocha, J.S.; Assis, E.G.; Saad, S.M.I. (2005a). Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. *LWT - Food Science and Technology*, 38,173-180.

Buriti, F.C.A; Rocha, J.S.; Saad, S.M.I. (2005b). Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implication for textural and sensorial properties during storage. *International Dairy Journal*, 15, 1279-1288.

Buriti, F.C.A.; Okazaki, T.Y.; Alegro, J.H.A.; Saad, S.M.I. (2007). Effect of a probiotic mixed culture on texture profile and sensory performance of Minas fresh-cheeses in comparison with traditional products. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 57, 179-185.

Campbell, A.K.; Matthews, S.B.; Vassel, N.; Cox, C.D.; Naseem, R.; Chaichi, J.; Hollandd, I.B.; Green, J.; Wann, K.T. (2010). Bacterial metabolic 'toxins': A new mechanism for lactose and food intolerance, and irritable bowel syndrome, *Toxicology*, 278, 268-276.

- Dutcoski, S. D. (2007). *Análise sensorial de alimentos*. 2. ed. Curitiba: Champagnat. 239 p.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66, 365–378.
- Furtado, M.M.; Neto, J.P.M. (1994). *Tecnologia de Queijos: Manual técnico para a produção industrial de queijos*. São Paulo: Dipemar.
- Furtado, M.M. (2005). *Principais problemas dos queijos: causas e prevenção*. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora.
- Gekas, V.; López–Leiva, M. (1985). Hydrolysis of lactose: a literature review. *Process Biochemistry*, 20, 2–12.
- Goursaud, J. (1985). *O leite de vaca: composição e propriedades físico-químicas*. In: Luquet, F. M. *O leite: do úbere à fábrica de laticínios*. Portugal: Publicações Europa-America Ltda, v.1, parte 1, cap. 1, p. 31-56.
- Jelen, P.; Tossavainen, O. (2003). Low lactose and lactose-free milk and dairy products – prospects, technologies and applications. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58, 161–165.
- Jiang, T.; Mustapha, A.; Savaiano, D.A. (1996). Improvement of lactose digestion in humans by ingestion of unfermented milk containing *Bifidobacterium longum*. *Journal of Dairy Science*, 79, 750-757.
- Longo, G.; Waszczyński, N. (2005). Avaliação sensorial de leite UHT com baixo teor de lactose. In: XXII Congresso Nacional De Laticínios, Juiz de Fora. Anais. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, 60, 77-80.
- Manan, D.M.A.; Karim, A.A.; Kit, W.K. (1999). Lactose content of modified enzyme-treated “dadih”. *Food Chemistry*, 65, 430-443.

Moreira, K.M.M.; Coelho, L.H.; Perini, C.C.; Rapacci, M.; Karam, L.B. (2009). Produção de doce de leite com teor reduzido de lactose por β -galactosidase. *Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.*, Curitiba, 7, 375-382.

Pessela, B.C.C.; Mateo, C.; Fuentes, M.; Vian, A.; García, J.L.; Carrascosa, A.V.; Guisán, J.M.; Fernández-Lafuente, R. (2003). The immobilization of a thermophilic β -galactosidase on Sepabeads supports decreases product inhibition complete hydrolysis of lactose in dairy products. *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 199-205.

Ratzinger, G.; Wang, X.; Wirth, M.; Gabor, F. (2010). Targeted PLGA microparticles as a novel concept for treatment of lactose intolerance. *Journal of Controlled Release*, 147, 187-192.

Saad, S.M.I. (2006). Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 42, 1-16.

Téo, C.R.P.A. (2002). A intolerância à lactose: uma breve revisão para o cuidado nutricional. *Arq. Cienc. Saúde Unipar*, 6, 135-140.

Trevisan, A.P. (2008). Influência de diferentes concentrações de enzimas lactase e temperaturas sobre a hidrólise da lactose em leite pasteurizado. 2008. 60p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

Vasiljevic, T., Shah, N.P. (2008). Probiotics - From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, 18, 714– 728.

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.

Vinhal, E. F. (2001). Hidrólise da lactose no leite por β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis*. 2001. 100f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

Tabela 1

Variáveis envolvidas na formulação dos queijos Minas Frescal.

<i>Tratamentos</i>	<i>Concentração de lactase (g/L)</i>	<i>Tempo de hidrólise (horas)</i>	<i>Concentração de cultura probiótica (%)</i>
T1	0,3	12	1
T2	0,6	12	1
T3	0,9	12	1
T4	0,3	24	1
T5	0,6	24	1
T6	0,9	24	1
T7 (controle)	-	-	1
T8 (controle)	-	-	-

- : sem adição.

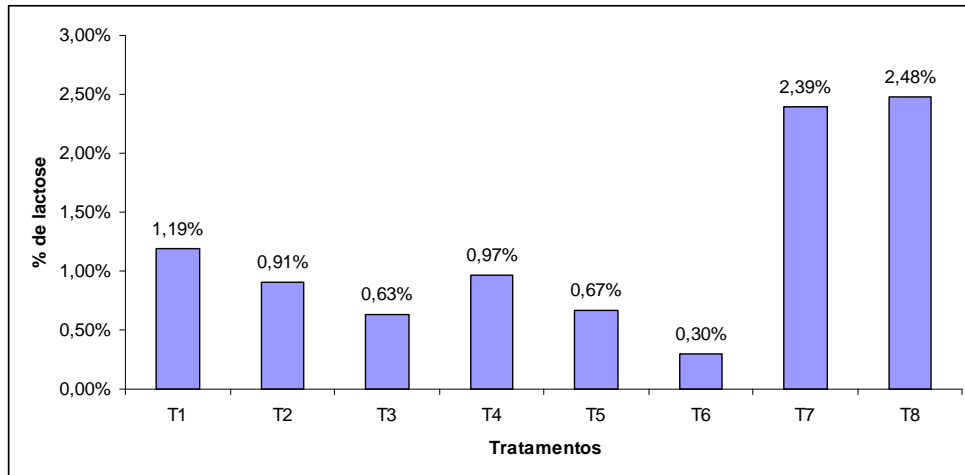


Figura 1 – Teores de lactose dos queijos Minas Frescal elaborados com leites tratados enzimaticamente (T1 a T6) e leite não tratado (T7 e T8).

Tabela 2

Valores de pH dos queijos elaborados com leite tratado enzimaticamente (T1 a T6) e leite não tratado (T7 e T8) durante os 21 dias de armazenamento.

Tratamentos	<i>Dia 1</i>	<i>Dia 7</i>	<i>Dia 14</i>	<i>Dia 21</i>
T1	5,55 ^{Fa} (0,01)	5,37 ^{Gb} (0,01)	5,36 ^{Gb} (0,01)	5,35 ^{Db} (0,01)
T2	5,72 ^{Ea} (0,01)	5,51 ^{Fb} (0,01)	5,55 ^{Eb} (0,01)	5,45 ^{Cc} (0,02)
T3	5,72 ^{Ea} (0,01)	5,56 ^{Eb} (0,01)	5,57 ^{Eb} (0,01)	5,47 ^{Cc} (0,01)
T4	5,87 ^{Ca} (0,01)	5,81 ^{Cb} (0,01)	5,80 ^{Cb} (0,01)	5,74 ^{Ac} (0,02)
T5	5,77 ^{Da} (0,01)	5,71 ^{Dd} (0,01)	5,64 ^{Dc} (0,03)	5,63 ^{Bc} (0,01)
T6	6,27 ^{Ba} (0,01)	6,00 ^{Bb} (0,01)	5,88 ^{Bc} (0,01)	5,71 ^{Ad} (0,01)
T7	5,76 ^{Da} (0,01)	5,49 ^{Fb} (0,01)	5,44 ^{Fc} (0,01)	5,23 ^{Ed} (0,01)
T8	6,61 ^{Aa} (0,01)	6,53 ^{Ab} (0,02)	6,12 ^{Ac} (0,01)	5,74 ^{Ad} (0,02)

* Médias e respectivos desvios-padrão entre parênteses.

A, B, C, D, E Médias na mesma coluna seguidas pela mesma letra (maiúscula) não diferem significativamente entre si ($\rho > 0,05$) pelo teste de Tukey.

a, b, c, d Médias na mesma linha seguidas pela mesma letra (minúscula) não diferem significativamente entre si ($\rho > 0,05$) pelo teste de Tukey.

Tabela 3

Valores de acidez (expressos em % de ácido láctico) dos queijos elaborados com leite tratado enzimaticamente (T1 a T6) e leite não tratado (T7 e T8) durante os 21 dias de armazenamento.

Tratamentos	<i>Dia 1</i>	<i>Dia 7</i>	<i>Dia 14</i>	<i>Dia 21</i>
T1	0,364 ^{Ad} (0,037)	0,546 ^{Ab} (0,013)	0,632 ^{Aa} (0,022)	0,427 ^{Bc} (0,028)
T2	0,278 ^{Bc} (0,004)	0,477 ^{Ba} (0,016)	0,492 ^{Ca} (0,012)	0,440 ^{Bb} (0,006)
T3	0,269 ^{Bd} (0,001)	0,463 ^{Bb} (0,009)	0,495 ^{Ca} (0,007)	0,352 ^{Cc} (0,003)
T4	0,177 ^{Dc} (0,009)	0,327 ^{Da} (0,025)	0,339 ^{Fa} (0,002)	0,229 ^{Db} (0,025)
T5	0,225 ^{Cb} (0,021)	0,412 ^{Ca} (0,015)	0,402 ^{Da} (0,010)	0,234 ^{Db} (0,014)
T6	0,130 ^{Ec} (0,010)	0,205 ^{Eb} (0,004)	0,278 ^{Ga} (0,012)	0,225 ^{Db} (0,023)
T7	0,176 ^{Dc} (0,002)	0,418 ^{Cb} (0,003)	0,551 ^{Ba} (0,021)	0,567 ^{Aa} (0,028)
T8	0,070 ^{Fd} (0,001)	0,128 ^{Fc} (0,009)	0,196 ^{Ha} (0,001)	0,177 ^{Eb} (0,001)

* Médias e respectivos desvios-padrão entre parênteses.

A, B, C, D, E, F Médias na mesma coluna seguidas pela mesma letra (maiúscula) não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey.

a, b, c, d Médias na mesma linha seguidas pela mesma letra (minúscula) não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey.

Tabela 4

Perfil médio de textura instrumental dos queijos Minas Frescal probióticos com teor reduzido de lactose (T1 a T6) e dos queijos controle sem adição de lactase T7 (com probiótico) e T8 (sem probiótico).

Tratamento	Firmeza (N)	Elasticidade	Coesividade	Gomosidade (N)	Mastigabilidade (N)
T1	7,01 ^a (0,41)	0,598 ^{ab} (0,006)	0,861 ^a (0,017)	5,94 ^a (0,09)	3,35 ^{ab} (0,26)
T2	7,10 ^a (0,19)	0,501 ^b (0,041)	0,878 ^a (0,009)	6,18 ^a (0,92)	3,10 ^b (0,24)
T3	6,35 ^a (0,22)	0,609 ^{ab} (0,126)	0,870 ^a (0,039)	5,52 ^a (0,42)	3,68 ^{ab} (0,31)
T4	7,15 ^a (0,56)	0,725 ^a (0,058)	0,886 ^a (0,014)	6,41 ^a (0,56)	4,31 ^a (0,92)
T5	6,96 ^a (0,16)	0,589 ^{ab} (0,082)	0,877 ^a (0,009)	6,20 ^a (0,19)	3,86 ^{ab} (0,58)
T6	7,01 ^a (0,58)	0,575 ^b (0,035)	0,884 ^a (0,008)	6,64 ^a (0,33)	3,71 ^{ab} (0,14)
T7	6,96 ^a (0,35)	0,512 ^b (0,015)	0,885 ^a (0,008)	5,60 ^a (0,58)	3,46 ^{ab} (0,40)
T8	7,07 ^a (0,27)	0,547 ^b (0,053)	0,881 ^a (0,017)	5,89 ^a (0,49)	3,76 ^{ab} (0,56)

* Médias e respectivos desvios-padrão entre parênteses.

a,b – Para cada coluna, valores com letras sobrescritas iguais não diferem significativamente ($p > 0,05$) entre si pelo teste de Tukey.

Tabela 5

Somatório dos julgamentos dos parâmetros sensoriais de gosto doce, gosto ácido e textura dos tratamentos adicionados de β -galactosidase (T1 a T6) em teste discriminativo de ordenação.

Tratamentos	T1 0,3g/L/12h*	T2 0,6g/L/12h	T3 0,9g/L/12h	T4 0,3g/L/24h	T5 0,6g/L/24h	T6 0,9g/L/24h
Gosto doce	126 ^b	146 ^b	114 ^b	141 ^b	115 ^b	197 ^a
Gosto ácido	148 ^a	166 ^a	146 ^a	122 ^{ab}	162 ^a	96 ^b
Textura	159 ^{ab}	192 ^a	120 ^{bc}	116 ^{bc}	107 ^c	146 ^{abc}

* Concentração adicionada de β -galactosidase (g/L) pelo tempo de reação de hidrólise em horas.

a,b,c – Valores na mesma linha seguidos pela mesma letra não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

(Ordem dos julgamentos: gosto menos doce = 1^o e gosto mais doce = 3^o; gosto menos ácido = 1^o e gosto mais ácido = 3^o; textura menos macia = 1^o e t extura mais macia = 3^o).

Diferença mínima significativa entre os somatórios (5% de significância) = 48.

Tabela 6

Somatório dos julgamentos dos parâmetros sensoriais de gosto doce, gosto ácido e textura do tratamento com maior hidrólise da lactose (T6) e dos tratamentos controle T7 (sem β -galactosidase e com probióticos) e T8 (sem β -galactosidase e sem probióticos) em teste discriminativo de ordenação.

Tratamentos	T6	T7	T8
Gosto doce	90 ^a	66 ^b	84 ^{ab}
Gosto ácido	70 ^b	105 ^a	65 ^b
Textura	79 ^a	87 ^a	74 ^a

a,b – valores na mesma linha seguidos pela mesma letra não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

(Ordem dos julgamentos: gosto menos doce = 1^o e gosto mais doce = 3^o; gosto menos ácido = 1^o e gosto mais ácido = 3^o; textura mais firme = 1^o e textura menos firme = 3^o).

Diferença mínima significativa entre os somatórios (5% de significância) = 21.

4 DISCUSSÃO GERAL

Os alimentos funcionais, que fornecem benefícios fisiológicos além da nutrição básica, estão sendo cada vez mais procurados por consumidores e recebendo inúmeras pesquisas científicas. Os probióticos podem ser considerados funcionais pelos diversos benefícios proporcionados à saúde de quem os consome. Dentre os alimentos probióticos disponíveis no mercado, destacam-se vários tipos de produtos lácteos.

Em contrapartida, a intolerância à lactose priva certas pessoas da ingestão de leite e seus derivados, que são uma excelente fonte de cálcio e proteínas, como também de outros minerais e vitaminas.

O presente trabalho foi realizado com o intuito de se desenvolver um produto lácteo que possuísse propriedades funcionais e ao mesmo tempo não privasse o público intolerante à lactose de usufruir benefícios nutricionais provenientes do consumo de leite e seus derivados.

Segundo Manan et al. (1999) os sintomas de intolerância à lactose podem ser eliminados quando a lactose é reduzida em 70%. Sendo assim, a enzima lactase adicionada ao leite antes da fabricação dos queijos mostrou-se eficaz quanto à redução do teor de lactose, uma vez que as reduções da lactose nos queijos foram superiores a 70%, chegando a atingir 93,23% no tratamento T6. Os teores de lactose estimados dos tratamentos adicionados de enzima lactase (T1 a T6) deste estudo podem ser considerados baixos, sendo uma alternativa viável na diminuição dos sintomas da intolerância à lactose.

Quanto à legislação brasileira vigente para alimentos destinados a fins especiais, somente o tratamento T6 estaria de acordo, uma vez que tal norma preconiza que os alimentos elaborados especialmente para atender às necessidades de portadores de intolerância à ingestão de dissacarídeos devem atender ao máximo de 0,5 g do nutriente em restrito, por 100 g ou 100 mL do produto a ser consumido (BRASIL, 1998).

Em relação aos tempos de reação, os tratamentos que permaneceram 24 horas em hidrólise resultaram em maior diminuição da lactose quando comparadas as mesmas concentrações de enzima em 12 horas de reação.

Verificou-se que há a possibilidade de se incorporar bactérias probióticas em queijos com teor reduzido de lactose, uma vez que as contagens de *Bifidobacterium* sp. permaneceram durante todo o período de armazenamento acima de 10^6 UFC.g⁻¹, em todos os tratamentos, independente da quantidade de lactase adicionada. O mesmo não ocorreu para *Lactobacillus acidophilus*, que teve seu número de células viáveis abaixo do mínimo requerido. Mesmo assim, o fato de a cultura bífida permanecer acima do mínimo requerido confere propriedades funcionais aos queijos desenvolvidos.

As avaliações físico-químicas de umidade e gordura no extrato seco demonstraram-se em conformidade com a legislação brasileira para queijos (BRASIL, 2004). Os demais parâmetros avaliados, não exigidos pela legislação, como proteína, gordura, cinzas, acidez e pH, assemelharam-se a valores encontrados em outros estudos com queijo Minas Frescal.

A diminuição da lactose teve influência sobre a acidez e pH dos queijos Minas Frescal, uma vez que esse carboidrato é utilizado como substrato pelas bactérias lácticas, sendo o ácido láctico o principal produto deste metabolismo (PEREDA, 2005). Observaram-se os menores valores de acidez e maiores pH nos tratamentos T6, por possuir menor teor de lactose, e T8, pelo fato de não ter sido adicionado de cultura probiótica.

Essa diferença de acidez foi também percebida pela avaliação sensorial, onde os julgadores apontaram T6 e T8 como tendo gosto menos ácido em comparação ao tratamento contendo probióticos e não adicionado de lactase (T7).

A doçura mais intensa foi percebida no tratamento com maior hidrólise da lactose (T6) quando comparado aos demais tratamentos. A reação de hidrólise da lactose dá origem à glicose e galactose, sendo estes monossacarídeos mais doces que a lactose, e, portanto, podem aumentar a doçura de produtos lácteos com baixo teor de lactose (JELEN & TOSSAVAINEN, 2003).

Esperava-se que a diminuição dos teores de lactose pudesse produzir uma variação nos parâmetros de textura instrumental, uma vez que a hidrólise da lactose pode causar modificações físicas como acentuação da viscosidade, do corpo e da textura (VINHAL, 2001). Entretanto, os diferentes teores de lactose, bem como a adição de probióticos, não afetaram as características de textura de um modo geral. Embora observadas diferenças sensoriais quanto à textura entre os tratamentos com teor de lactose reduzido, a avaliação da textura instrumental não detectou diferenças

estatísticas ($p > 0,05$) entre os mesmos tratamentos para a maioria dos parâmetros avaliados. Da mesma forma, comparando sensorialmente a formulação com maior porcentagem de hidrólise da lactose (T6) com as formulações controle T7 e T8 não foi detectada diferença sensorial no parâmetro textura.

5 CONCLUSÃO

- A enzima lactase utilizada reduziu de maneira eficaz o conteúdo de lactose das formulações, podendo se inferir que os queijos Minas Frescal desenvolvidos neste estudo podem diminuir os sintomas de intolerância à lactose.
- Os resultados obtidos demonstram a viabilidade de se produzir um queijo Minas Frescal adicionado de probiótico mesmo com teor reduzido de lactose, uma vez que a cultura de *Bifidobacterium sp.* manteve-se viável durante o período de armazenamento dos queijos.
- As características físico-químicas avaliadas estiveram de acordo com a legislação vigente para queijos Minas Frescal.
- Apesar de haver algumas diferenças sensoriais, principalmente quanto ao gosto doce, a hidrólise da lactose pode ser favorável na diminuição da percepção do gosto ácido dos queijos Minas Frescal.
- Tanto a adição da enzima lactase quanto a suplementação de probióticos não afetaram as características de textura instrumental nem a textura avaliada sensorialmente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, L. L.; MATTANNA, P.; BECKER, L. V.; RICHARDS, N. S. P. S.; ANDRADE, D. F. Avaliação sensorial de cream cheeses potencialmente simbióticos utilizando a metodologia de superfície de resposta. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 19, n. 4, p. 409-416, out./dez. 2008.

AMIOT, J. **Ciencia y tecnología de la leche**: principios y aplicaciones. Zaragoza: Acribia, 1991. 547p.

ANDRADE, A. C. **Estudo da fermentação simultânea à hidrólise, de soro de queijo, utilizando lactase e *Saccharomyces cerevisiae***. 2005. 97f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

ANGELIS, R. C. **Alergias Alimentares**. São Paulo: Atheneu, 2006. 123p.

ANTUNES, A.E.C.; PACHECO, M.T.B. **Leite para Adultos – Mitos e Fatos Frente à Ciência**. São Paulo: Varela, 2009. 457p.

ANVISA. 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. Brasília, 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista.htm>. Acesso em 23 dez. 2010.

ARANGO, L.A.A. et al. Deficiencia de lactasa, intolerancia a la lactosa y pico de masa ósea en adultos jóvenes colombianos, **Revista Colombiana De Reumatología**, v.13, n.4, p.271-286, 2006.

BEHMER, M.L.A. **Tecnologia do Leite**. 15 ed. São Paulo: Nobel, 1991. 320p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do queijo Minas Frescal**. Portaria nº 352, de 04 de setembro de 1997. Brasília, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Utilização de enzimas na indústria de alimentos**. Aprovada pela Resolução RDC nº348, de 02 de dezembro de 2003. Brasília, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijos**. Instrução Normativa nº 4, de 01 de março de 2004. Brasília, 2004.

BULHÕES, A.C. et al. Correlation between lactose absorption and the C/T-13910 and G/A-22018 mutations of the lactase-phlorizin hydrolase (LCT) gene in adult-type hypolactasia. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 11, p. 1441-1446, 2007.

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

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**, v.44, n.1, p.75-84, 2008.

BURITI, F.C.A. et al. Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. **LWT - Food Science and Technology**, v.38, n.2, p.173-180, 2005.

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

CAMPBELL, A.K.; MATTHEWS, S.B.; VASSEL, N.; COX, C.D.; NASEEM, R.; CHAICHI, J.; HOLLANDD, I.B.; GREEN, J.; WANN, K.T. Bacterial metabolic 'toxins': A new mechanism for lactose and food intolerance, and irritable bowel syndrome, **Toxicology**, v. 278, n. 3, p. 268-276, 2010.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed Editora, 3 ed, 2000. 751p.

CARMINATTI, C.A. **Ensaio de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando beta-galactosidase *Kluyveromyces lactis***. 2001. 66f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

CASTIGLIONE, F. et al. Lactose malabsorption: Clinical or breath test diagnosis? **e-SPEN, the European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism**, v. 3, n. 6, p.

e316-e320, 2008. Disponível em: <<http://intl.elsevierhealth.com/journals/espen>>. Acesso em: 21 jun. 2010.

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.

DI STEFANO, M.; VENETO, G.; MALSERVISI, S.; CECCHETTI, L.; MINGUZZI, L.; STROCCHI, A.; et al. Lactose malabsorption and intolerance and peak bone mass, **Gastroenterology**, v. 122, p. 1793-1799, 2002.

DUMOND, P. ET al. Allergie alimentaire au lait de vache ou intolerance au lactose? **Journal de pédiatrie et de puériculture**, v. 19, n. 7, p. 256-260, 2006.

ESKIN, N.A.M. **Biochemistry of foods**. 2 ed. New York: Academic, 1990. 557p.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**, 2 ed. São Paulo: Atheneu, 1998. 652p.

FARIAS, F.F.; FAGUNDES NETO, U. Intolerância aos carboidratos. **The Electronic Journal of Pediatric**, v. 8, n. 3, 2004. Disponível em: <http://www.e-gastroped.com.br/dec04/intolerancia.htm>. Acesso em: 07 de junho de 2010.

FERGUSON, L.R. Nutrigenomics approaches to functional foods. **Journal of American Diet Association**, v. 109, p. 452-458, 2009.

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. 34p. Disponível em: <http://www.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf>. Acesso em: dez. 2010.

FRITZEN-FREIRE, C.B. et al. The effect of direct acidification on the microbiological, physicochemical and sensory properties of probiotic Minas Frescal cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63, p. 1-8, 2010a.

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, 2010b.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 66, p. 365-378, 1989.

FURTADO, M.M. **Principais problemas dos queijos: causas e prevenção**. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora, 2005. 200p.

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

GEKAS, V.; LÓPEZ-LEIVA, M. Hydrolysis of lactose: a literature review. **Process Biochemistry**, v. 20, p. 2-12, 1985.

GOMES, A.M.P.; VIEIRA, M.M.; MALCATA, F.X. Survival of probiotic microbial strains in a cheese matrix during ripening: simulation of rates of salt diffusion and microorganism survival. **Journal of Food Engineering**, v. 36, p. 281-301, 1998.

GOURSAUD, J. O leite de vaca: composição e propriedades físico-químicas. In: LUQUET, F. M. **O leite: do úbere à fábrica de laticínios**. Portugal: Publicações Europa-America Ltda, 1985, v. 1, cap. 1, p. 31-56.

GRANATO, D.; BRANCO, G.F.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F.; SHAH, N. P. Probiotic Dairy Products as Functional Foods. **Comprehensive Reviews in Food Science And Food Safety**, v. 9, p. 455-470, 2010.

JELEN, P.; TOSSAVAINEN, O. Low lactose and lactose-free milk and dairy products – prospects, technologies and applications. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 58, p. 161-165, 2003.

KIM, H. S.; GILLILAND, S. *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct for milk to aid lactose digestion in humans. **Journal of Dairy Science**, v. 66, p. 959-966, 1983.

KOCIÁN, J. Lactose intolerance – minireview. **International Journal Biochemistry**, v. 20, n. 1, p.1-5, 1988.

LIONG, M.T. et al. The improvement of hypertension by probiotics: effects on cholesterol, diabetes, renin, and phytoestrogens. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, p. 3755-3775, 2009.

LOMER, M. C. E. et al. Review article: lactose intolerance in clinical practice: myths and realities. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, London, v. 27, p. 93-103, 2008.

LONGO, G. **Influência da adição de lactase na produção de iogurtes**. 2006. 89f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B.C. Yogurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 1-17, 2001.

MANAN, D.M.A.; KARIM, A.A.; KIT, W.K. Lactose content of modified enzyme-treated “dadih”. **Food Chemistry**, n.65, p.430-443, 1999.

MARTEAU, P.R. et al. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 430–436, 2001.

MARUYAMA, L.Y. et al. Textura instrumental de queijo *Petit Suisse* potencialmente probiótico: influência de diferentes combinações de gomas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.2, p.386-393, 2006.

MATTAR, R.; MAZO, D.F.C. Intolerância à lactose: mudança de paradigmas com a biologia molecular, **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 56, n. 2, p. 230-236, 2010.

MONTEIRO, A.A.; PIRES, A.C.S.; ARAÚJO, E.A. **Tecnologia de Produção de Derivados de Leite**. Viçosa: Editora UFV, 2007. 81p.

MOREIRA, K.M.M. et al. Produção de doce de leite com teor reduzido de lactose por β -galactosidase. **Rev. Acad. Ciênc. Agrár. Ambient.**, Curitiba, v. 7, n. 4, p. 375-382, out./dez. 2009.

NAHAISI, M.H. *Lactobacillus acidophilus*, therapeutic properties, products and enumeration. Cap.6. Em Robinson, R.K., **Developments in Food Microbiology**, p.153-178. Elsevier Applied Science Publishers: Londres, 1986.

O’SULLIVAN, D. J. Primary Sources of Probiotic Cultures. In: **Probiotics in food safety and human health**. Boca Raton: Taylor&Francis, 2006. 468p.

OLIVEIRA, C.A.F; MORENO, J.F.G; MESTIERI, L. Características físico-químicas e microbiológicas de queijos Minas frescal e mussarela, produzidos em algumas fábricas de laticínios do estado de São Paulo. **Higiene Alimentar**, v. 12, n. 55, p. 31-34, 1998.

OLIVEIRA, C.C.M. **Produção de β -galactosidase por levedura recombinante – Desenvolvimento de um sistema de produção estável**. 2005. 100f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade do Minho, Braga, 2005.

OLIVEIRA, M.N. et al. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, p. 1-21, 2002.

ONG, L.; HENRIKSSON, A.; SHAH, N.P. Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. 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.; SHAH, N.P. Probiotic Cheddar cheese: Influence of ripening temperatures on survival of probiotic microorganisms, cheese composition and organic acid profiles. **Food Science and Technology**, v. 42, p.1260-1268, 2009.

PANESAR, P.S.; KUMARI S.; PANESAR, R. Potential Applications of Immobilized β -Galactosidase in Food Processing Industries. **Enzyme Research**, v. 2010, 16p., 2010.

PARODIA, C.G. **Desenvolvimento de queijo Cottage simbiótico**. 2010. 120p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

PEREDA, J.A.O.; RODRÍGUEZ, M.I.C.; ÁLVAREZ, L.F.; SANZ, M.L.G.; MINGUILLÓN, G.D.G.F.; PERALES, L.H.; CORTECERO, M.D.S. **Tecnologia de alimentos**. v.2. Alimentos de origem animal. São Paulo:Artmed. 2005. 279p.

PEREIRA-FILHO, D.; FURLAN, S.A. Prevalência de intolerância à lactose em função da faixa etária e do sexo: experiência do Laboratório Dona Francisca, Joinville (SC). **Revista Saúde e Ambiente**, Joinville, v. 5, n. 1, p. 24-30, 2004.

PRAY, W.S. Lactose Intolerance: the norm among the world's people. **American Journal of Pharmaceutical Education**, v. 64, p. 205-207, 2000.

PRETTO, F. M. et al. Má absorção de lactose em crianças e adolescentes: diagnóstico através do teste de hidrogênio expirado com o leite de vaca como substrato. **Jornal de Pediatria**, Porto Alegre, v. 78, n. 3, p. 213-218, 2002.

PROZYN. **Prozyn Lactase**. São Paulo 2004. 4p. Informação técnica.

RANADHEERA, R.D.C.S.; BAINES, S.K.; ADAMS, M.C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, v. 43, p. 1-7, 2010.

RIBEIRO, E.P.; SIMÕES, L.G.; JURKIEWICKZ, C.H. Desenvolvimento de queijo minas frescal adicionado de *Lactobacillus acidophilus* produzido a partir de retentados de ultrafiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 1, p. 19-23, 2009.

RICHMOND, M.L.; GRAY, J.I.; STINE, C.M. Beta-Galactosidase – Review of recent research related to a technological application, nutritional concerns and immobilization. **Journal of Dairy Science**, v. 64, n. 9, p. 1759-1771, 1981.

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

RUSYNYK, R. A.; STILL, C. D. Lactose intolerance. **The Journal of the American Osteopathic Association**, v. 101, p. 10-12, 2001.

SANTIAGO, P. A. **Contribuição ao estudo de produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus***. 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2002.

SANTOS, A.; LADERO, M.; GARCÍA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 558-567, 1998.

SCHLIMME, E.; BUCHHEIM, W. **La leche y sus componentes**: Propriedades químicas y físicas. Zaragoza: Acribia S.A., 2002. 121p.

SGORBATI, B.; BIAVATI, B.; PALENZONA, D. The genus *Bifidobacterium*. Em Wood, B.J. B. e Holzapfel, W.H., *The Lactic Acid Bacteria Vol. 2. The Genera of Lactic Acid Bacteria*, cap. 8, p. 279-306, Blackie Academic: Londres, 1995.

SHUKLA, H. Lactose intolerance in health and disease. **Nutrition and Food Science**, v. 2, p. 66-70, 1997.

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. 110f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

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 cheese during storage. **Food Science and Technology**, v. 42, n. 2, p. 633-640, 2009.

STANTON, C.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; VAN SINDEREN, D. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, p. 198-203, 2005.

STANTON, C.; DESMOND, C.; COAKLEY, M.; COLLINS, J.K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R.P. Challenges facing development of probiotic-containing functional foods. In **Handbook of fermented functional foods**. Boca Raton, LA, USA: CRC Press., 2003.

SUAREZ, F.L.; SAVAIANO, D.A. Diet, genetics, and lactose intolerance. **Food Technology**, v. 51, n. 3, p. 74-76, 1997.

TÉO, C.R.P.A. A intolerância à lactose: uma breve revisão para o cuidado nutricional. **Arq. Cienc. Saúde Unipar**, v. 6, p. 135-140, 2002.

TRONCO, V. M. **Manual para a inspeção da qualidade do leite**. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2003. 192p.

UGGIONI, P.L.; FAGUNDES, R.L.M. Tratamento dietético da intolerância à lactose infantil: teor de lactose em alimentos. **Higiene de Alimentos**, São Paulo, v. 21, n. 40, p. 24-29, 2006.

VAN DENDER, A.G.F.; MASSAGUER-ROIG, S.; CAMPOS, S.D.S. Alterações físico-químicas e vida-de-prateleira do queijo Minas tradicional e fabricado pelo método MMV. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 16., 1999, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v. 54, n. 309, 1999.

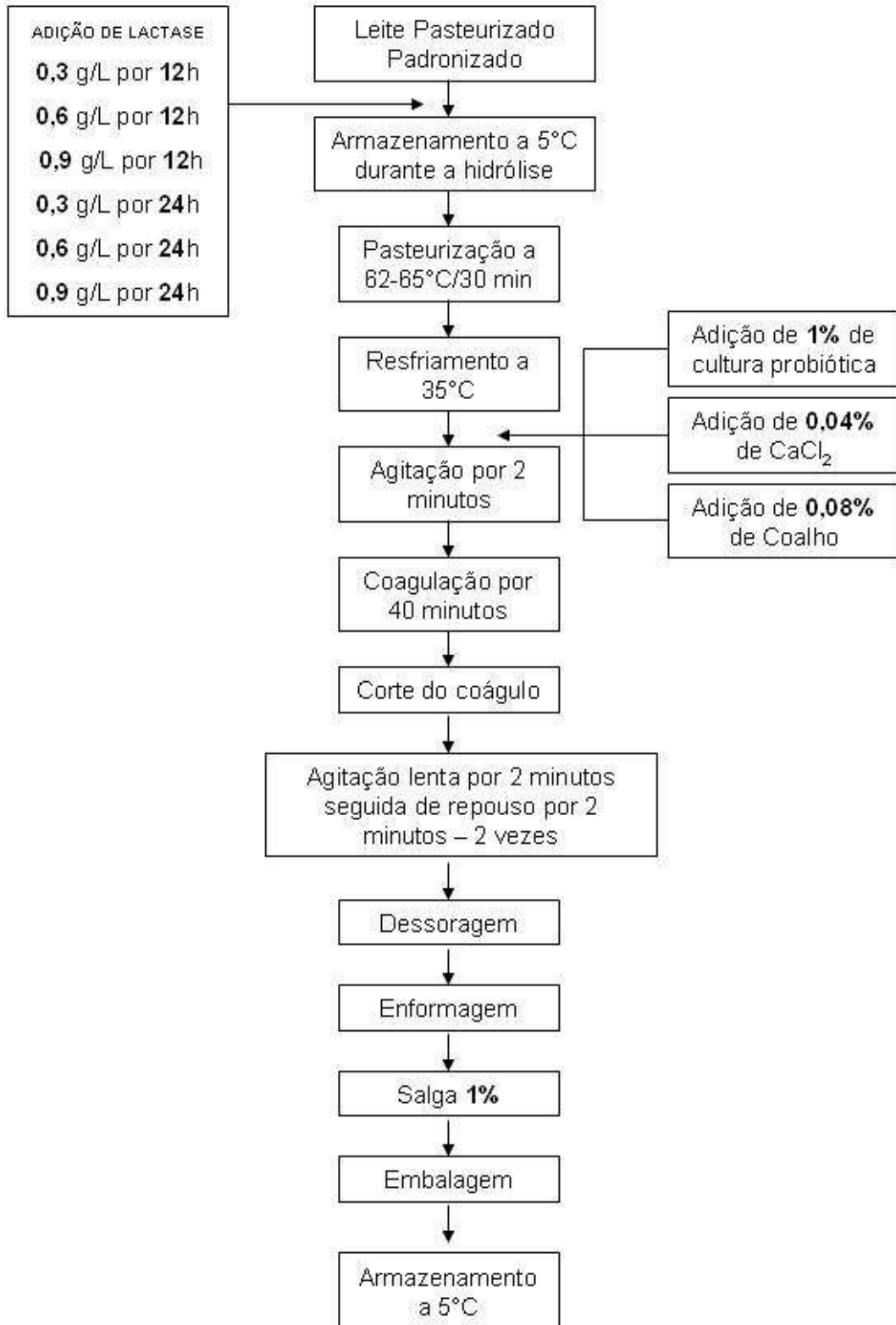
VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Leche y productos lácteos - Tecnología, Química y Microbiología**. Zaragoza: Acribia, 1995. 476.

VINHAL, E. F. **Hidrólise da lactose no leite por β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis***. 2001. 100f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2001.

VONK, R.J.; PRIEBE, M.G.; KOETSE, H.A.; STELLAARD, F.; LENOIR-WIJNKOOP, I.; ANTOINE, J.M.; et al. Lactose intolerance: analysis of underlying factors. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 33, n. 1, p. 70-75, 2003.

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**, v. 8, p. 473-479, 1998.

APÊNDICE A – Fluxograma de fabricação de queijo Minas Frescal Probiótico com teor reduzido de lactose



APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar de um estudo intitulado “DESENVOLVIMENTO DE QUEIJO MINAS FRESCAL PROBIÓTICO COM TEOR REDUZIDO DE LACTOSE”, que tem como objetivo desenvolver formulações de queijos Minas Frescal adicionado de cultura probiótica e com diferentes concentrações de enzima lactase.

Uma porcentagem significativa da população sofre com transtornos gastro-intestinais quando consome leite e derivados devido à ausência ou deficiência da enzima lactase, sendo assim, o produto desenvolvido torna-se uma opção viável para os intolerantes a lactose.

Procedimentos a serem realizados

Serão oferecidas a você amostras de queijo Minas Frescal. Será solicitado que você as prove, marcando nas fichas a sua resposta com relação às características sensoriais (sabor, textura, etc.) do produto oferecido.

Riscos possíveis e benefícios esperados

Fica claro que você não é obrigado a participar do projeto. No caso de recusa você não terá nenhum tipo de prejuízo. A qualquer momento da pesquisa você é livre para retirar-se da mesma.

No caso de aceite, fica claro que os produtos oferecidos são seguros e de boa qualidade, não havendo prejuízos ou riscos a sua saúde (a não ser, MUITO RARAMENTE, algum desconforto do estômago em função dos ingredientes normais da formulação), assim como pode ocorrer durante o consumo de queijos convencionais. Não haverá benefício financeiro pela sua participação e nenhum custo para você.

Você não terá benefícios diretos, entretanto, ajudará a comunidade científica na construção do conhecimento sobre as características sensoriais (sabor, textura, etc.) de um novo produto.

Confidencialidade

Os dados obtidos com esta pesquisa serão publicados em revistas científicas reconhecidas. Os seus dados serão analisados em conjunto com os de outros participantes, assim, não aparecerão informações que possam lhe identificar, sendo mantido o sigilo de sua identidade.

Utilização dos dados obtidos

O material coletado e os seus dados serão utilizados somente para esta pesquisa e ficarão guardados com o pesquisador por cinco anos, após o qual serão destruídos.

Os pesquisadores responsáveis pelo estudo são a Prof^a. Dra. Neila S. P. S. Richards e Daniele Back, aluna do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFSM. Em qualquer etapa do estudo você terá acesso aos pesquisadores responsáveis pelo estudo para esclarecimento de eventuais dúvidas.

Este estudo obteve aprovação junto ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria, com protocolo n° 23081.006882/2010-40

Telefones para contato com os pesquisadores

*Prof^a. Dr^a. Neila S. P. S. Richards – Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos – CCR

Email: neilapq@cnpq.com.br

(55) 3220-8254

*Daniele Back - Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – UFSM

Email: danieleback@gmail.com

(55) 9614-0364

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo intitulado “DESENVOLVIMENTO DE QUEIJO MINAS FRESCAL PROBIÓTICO COM TEOR REDUZIDO DE LACTOSE”. Ficaram claros para mim quais são os objetivos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo.

Assinatura do participante

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste sujeito de pesquisa ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Santa Maria, _____ de _____ de 2010.

Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/UFSM) - Avenida Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria - 7º andar - Sala 702. Cidade Universitária - Bairro Camobi, 97105-900.

APÊNDICE C – Modelos das fichas utilizadas na avaliação sensorial por teste discriminativo de ordenação

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA E CIÊNCIA DOS ALIMENTOS LABORATÓRIO DE ANÁLISE SENSORIAL	
NOME: _____	DATA: ____/____/____
Você está recebendo 6 amostras de queijo Minas Frescal. Por favor, prove cuidadosamente cada uma das amostras e ordene-as da menor à maior intensidade quanto à GOSTO DOCE .	
_____ _____ _____ _____ _____ _____	
Gosto menos doce	Gosto mais doce
Comentários:	

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA E CIÊNCIA DOS ALIMENTOS LABORATÓRIO DE ANÁLISE SENSORIAL	
NOME: _____	DATA: ____/____/____
Você está recebendo 6 amostras de queijo Minas Frescal. Por favor, prove cuidadosamente cada uma das amostras e ordene-as da menor à maior intensidade quanto ao GOSTO ÁCIDO .	
_____ _____ _____ _____ _____ _____	
Gosto menos ácido	Gosto mais ácido
Comentários:	

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA E CIÊNCIA DOS ALIMENTOS LABORATÓRIO DE ANÁLISE SENSORIAL	
NOME: _____	DATA: ____/____/____
Você está recebendo 6 amostras de queijo Minas Frescal. Por favor, prove cuidadosamente cada uma das amostras e ordene-as da menor à maior intensidade quanto à TEXTURA .	
_____ _____ _____ _____ _____ _____	
Textura menos macia	Textura mais macia
Comentários:	

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

 <p>MINISTÉRIO DA SAÚDE Conselho Nacional de Saúde Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)</p>	<p>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 de queijo minas frescal probiótico com teor reduzido de lactose

Número do processo: 23081.006882/2010-40

CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética): 0085.0.243.000-10

Pesquisador Responsável: Neila Sílvia Pereira dos Santos Richards

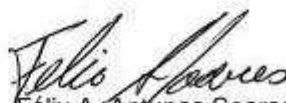
Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes estabelecidas na Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê.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

Janeiro/ 2011- Relatório final

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

DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO: 08/06/2010.

Santa Maria, 15 de Junho de 2010.



Félix A. Antunes Soares

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

ANEXO B – Normas para publicação na Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes

Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes

NORMAS PARA APRESENTAÇÃO E PUBLICAÇÃO DE ARTIGOS

ISSN 0100-3674 VERSÃO IMPRESSA

A **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes** publica artigos e comunicações científicas na área de Leite e Derivados. Os trabalhos deverão ser apresentados em português, inglês ou espanhol, devendo observar as disposições normativas relacionadas abaixo.

Os trabalhos serão submetidos à revisão pela **Comissão Editorial**, sendo que cada trabalho será analisado por membros do **Corpo Revisor** conforme área de atuação destes profissionais. Em caso de parecer desfavorável e favorável dos revisores, um terceiro relator será consultado, e somente se dois pareceres analisados forem favoráveis é que será tomada a decisão final a cerca da publicação pela **Comissão Editorial**.

O(s) parecer(es) do(s) relator(es) será(ao) encaminhado(s) aos autores para que verifiquem as sugestões e procedam às modificações que se fizerem necessárias.

Informações sobre publicações e ou trabalhos deverão ser obtidas via email revistadoilct@epamig.br ou pelo telefone (32) 3224 3116.

NORMAS GERAIS

Os artigos e comunicações submetidos para publicação poderão ser apresentados em **meio digital** (CD ou DVD) ou via email revistadoilct@epamig.br

Utilizar o processador de texto **Microsoft Word for Windows**: ser escrito em português, inglês ou espanhol. No material em meio digital deverá constar, o artigo **original** que será codificado pela Revista do ILCT e arquivado juntamente com uma cópia sem identificação dos autores e suas credenciais (para serem enviadas ao Corpo Revisor). Caso tenha agradecimentos e quaisquer informações que possam identificar os autores, também serão retiradas na cópia sem autores.

Usar somente nomenclaturas oficiais e abreviaturas consagradas, não empregando abreviaturas no título do artigo.

Se o artigo for enviado pelos Correios, juntamente com o CD ou DVD, deverão ser enviadas 1 (uma) cópia impressa original com numeração de linhas em todo o texto, com todas as figuras, quadros e tabelas; Toda cópia impressa deverá ser feita em papel branco, tipo A4 (21cm x 29,7cm), ou em formulário contínuo em uma só face, fonte: Times New Roman, tamanho: 12, espaçamento 1,5 (exceto título, autores e sumários em português e inglês que são espaçamento simples), observada uma margem de 2,5 cm para o lado esquerdo e de 2,5 cm para o direito, 2,5 cm para margem superior e inferior, 2,5 cm para o cabeçalho e 2,5 cm para o rodapé.

Cada trabalho deverá ter no máximo 16 páginas e junto do mesmo deverá ser encaminhado ofício dirigido a Comissão Editorial da REVISTA DO ILCT solicitando a publicação do artigo. Esse ofício deverá ser assinado por todos os autores, constando:

- nome dos autores sem abreviação;
- data;
- titulação de cada;
- endereço profissional completo (logradouro, número, bairro, caixa postal (se houver), CEP, cidade, estado, país), telefone e e-mail de contato de todos;
- informação da **área em que o artigo se enquadra (Vide tabela anexa)**; e
- **Termo de concordância e cessão de direitos de reprodução gráfica:** Os abaixo assinados, autores do artigo intitulado "título", declaram ter lido e aprovado o manuscrito na sua totalidade e concordam em submetê-lo à Revista do ILCT para avaliação e possível publicação como resultados originais. Esta declaração implica que o manuscrito, independente do idioma, não foi submetido a outros periódicos ou revistas com a mesma finalidade. Sendo assim, "Declaro(amos) que aceito(amos) ceder o direito de reprodução gráfica para a Revista do ILCT no caso do artigo com o título descrito acima (ou título que posteriormente chegar a ser adotado, para atender às sugestões de editores e revisores) venha ser publicado na Revista do ILCT. Em adição (necessário se existir mais que um autor), concordamos em nomear _____ como sendo o autor a quem toda correspondência e 1 (um) exemplar deverão ser enviados."

Qualquer inclusão, exclusão ou alteração na ordem dos autores deverá ser notificada mediante ofício assinado por todos os autores (inclusive do autor excluído).

Se a submissão for via email, a Revista do ILCT irá enviar email a todos os co-autores do artigo, consultando-os a respeito da participação no referido artigo, o que dispensa envio de material impresso e ofício. Os trâmites de avaliação, comprovação etc serão sempre os mesmos independente de como tenha sido a submissão, se pelos Correios ou email.

NORMAS ESPECÍFICAS DO ARTIGO

1) Título e Autores

Letras MAIÚSCULAS e
espaçamento simples

INSTRUÇÕES PARA PREPARAÇÃO E ENCAMINHAMENTO DE TRABALHOS¹

ESPAÇAMENTO SIMPLES e
ALINHADOS À DIREITA

Marciano F. PRIMEIRO²

Júlio E. SECOND²

Denis R. ÚLTIMO²

*Endereços para correspondência do **autor responsável pela submissão** e email dos demais autores devem constar no rodapé da primeira página obrigatoriamente.*

IMPORTANTE: e-mail de todos os autores que receberão notificação da Revista, consultando-os sobre a concordância de ter seus nomes na publicação.

Caso um dos autores discorde de seu nome na publicação, a Revista do ILCT irá retirar o nome deste, notificando o autor responsável imediatamente.

2) Corpo geral do artigo

O **artigo científico** deverá conter os seguintes tópicos: a) **TÍTULO**, suficientemente claro, conciso e completo, evitando palavras supérfluas. Recomenda-se começar pelo termo que represente o aspecto mais importante do trabalho, com os demais termos em ordem decrescente de importância. Centralizado, em negrito e espaçamento simples; b) **NOME(S) DO(S) AUTOR(ES) com o sobrenome para citações bibliográficas destacado EM LETRAS MAIÚSCULAS**, alinhados à direita, em espaçamento simples, um nome debaixo do outro, e no rodapé da primeira página, deverão vir a formação acadêmica e o endereço profissional completo de todos os autores, com e-mail e no máximo com 6 (seis) autores; c) **SUMÁRIO** (de acordo com NBR6028 da ABNT). O sumário não deve ultrapassar a **250 (duzentos e cinquenta) palavras**, não deve possuir parágrafos e estar centralizado logo abaixo da lista dos autores, em espaçamento simples. Após o **Sumário** deve-se incluir **TERMOS PARA INDEXAÇÃO**, 3 (três) a 6 (seis) palavras-chave que deverão ser apresentadas no idioma deste, separados por ponto e vírgula e evitando-se a utilização de termos já usados no título e sumário. d) **SUMMARY** vindo imediatamente abaixo o **TÍTULO EM INGLÊS** em Negrito e somente com a primeira palavra em letra maiúscula e quando houver nome ou palavra que inicie com letra maiúscula – obrigatório, exceto quando o artigo for escrito na íntegra em língua inglesa - incluindo, em seguida, o resumo em inglês propriamente dito, que não deve ultrapassar **250 (duzentos e cinquenta) palavras**, não deve possuir parágrafos e estar centralizado logo abaixo da lista dos autores, em espaçamento simples. **INDEX TERMS (Keywords)** da mesma forma do item c, logo abaixo do resumo em inglês; e) **INTRODUÇÃO** (incluindo a Revisão de Literatura/Referencial Teórico); f) **MATERIAL E MÉTODOS**; g) **RESULTADOS E DISCUSSÃO** (podendo conter tabelas, quadros e figuras) podendo ser separados, se necessário; h) **CONCLUSÕES**; i) **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** e j) **AGRADECIMENTOS** (opcional).

A apresentação do texto deverá ser em uma coluna somente. As páginas devem ser numeradas sequencialmente. As linhas deverão ser numeradas continuamente desde o título até a última palavra do artigo.

Instrução sequencial:

Arquivo > Configurar página > layout > número de linhas > numerar linhas > contínua > OK

3) Orientações específicas

A **comunicação** poderá conter os seguintes tópicos assim apresentados:

1. **TABELAS e QUADROS:** deverão ser feitos no Word e inseridos após citação dos mesmos dentro do próprio texto, salvo em doc. **Pode-se usar neste caso, espaçamento simples.**

2. Caso o artigo contenha **FOTOGRAFIAS, GRÁFICOS, FIGURAS, SÍMBOLOS e FÓRMULAS**, essas deverão obedecer às seguintes normas:

- **Fotografias:** deverão ser apresentadas em **preto e branco**, nítidas e com contraste, inseridas no texto após a citação das mesmas e também em um arquivo à parte, **salvas em extensão “JPEG” com resolução de 300 dpi;**
- **Figuras** deverão ser apresentadas em **preto e branco**, nítidas e com contraste, inseridas no texto após a citação das mesmas. As figuras deverão ser elaboradas com letra **Times New Roman, tamanho 10, sem negrito; sem caixa de textos e agrupadas;**
- **Gráficos** deverão ser inseridos após citação dos mesmos, dentro do próprio texto, elaborado preferencialmente em Excel, com letra Times New Roman, tamanho 10, **sem negrito;**
- **Símbolos e Fórmulas Químicas** deverão ser feitas em processador que possibilite a formatação para o programa **Page Maker** (ex: Equation), sem perda de suas formas originais.

3. **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:** a lista de referências bibliográficas normalizada conforme a NBR6023/2002 da ABNT.

A exatidão das referências constantes da listagem e a correta citação no texto são de responsabilidade do(s) autor(es) do artigo.

Orientações gerais:

- Deve-se apresentar todos os autores do documento científico (fonte);
- O nome do periódico deve ser descrito por extenso, não deve ser abreviado;
- Em todas as referências deve-se apresentar o local de publicação (cidade), a ser descrito no lugar adequado para cada tipo de documento;
- As referências devem ser ordenadas alfabeticamente.

EXEMPLIFICAÇÃO (TIPOS MAIS COMUNS):

ARTIGO DE PERIÓDICO:

NETO, A. R.; PINTO, S. M.; ABREU, L. R.; PEREIRA, R. G. F. A.; MAGALHÃES, F. A. R. Avaliação físico-química de pão de queijo fabricado com gordura de leite fracionada. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.54, n.313, p.46-49, mar./abr. 2000.

LIVRO:

a) livro no todo:

FURTADO, M. M. **Queijos finos maturados por fungos**. São Paulo: Milkbizz,, 2003. 128p.

b) Parte de livro com autoria específica:

BRITO, J.R.; PINTO, S.M.; BRITO, M. A. V. P. Boas práticas de produção de leite bovino na agricultura familiar. In: NETO, F. N. **Recomendações básicas para a aplicação das boas práticas agropecuárias e de fabricação na agricultura familiar**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. p. 196-205.

c) Parte de livro sem autoria específica:

ABREU, L. R. Características e formas de aproveitamento do soro do queijo. In: _____. **Processamento do leite e tecnologia de produtos lácteos**. Lavras: FAEPE, 2005. cap. 5, p. 91-157.

DISSERTAÇÃO E TESE:

RIBEIRO, L.C. **Produção, composição e rendimento em queijos do leite de ovelhas Santa Inês**. 2005. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

MATIOLI, G. P. **Influência do leite proveniente de vacas mastíticas no rendimento de queijo fresco**. 2000. 55 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

Nota: “A folha é composta de duas páginas: anverso e verso. Alguns trabalhos, como teses e dissertações são impressos apenas no anverso e, neste caso, indica-se f.” (ABNT, NBR6023/2002, p. 18).

TRABALHOS DE CONGRESSO E OUTROS EVENTOS:

SOBRAL, D.; VIOTTO, W. H. Requeijões culinários análogos. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 24, 2007, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: EPAMIG/ILCT, 2007. p. 541-546.

DOCUMENTOS ELETRÔNICOS:

As obras consultadas *online* são referenciadas conforme normas específicas para cada tipo de documento (monografia no todo e em parte, trabalho apresentado em evento, artigo de periódico, artigo de jornal, etc.), **acrescidas de informações sobre o endereço eletrônico apresentado entre braquetes (< >), precedido da expressão “Disponível em:” e da data de acesso ao documento, precedida da expressão “Acesso em:”**. Nota: “Não se recomenda referenciar material eletrônico de curta duração nas redes”

(ABNT, NBR6023/2000, p. 4). Segundo padrões internacionais, a divisão de endereço eletrônico, no fim da linha, deve ocorrer sempre após barra (/).

Monografia (acesso online):

a) livro no todo

TAKAHASHI, T. (Coord.). **Tecnologia em foco**. Brasília: Socinfo/MCT, 2000. 90 p. Disponível em: <<http://www.socinfo.org.br>>. Acesso em: 22 ago. 2000.

b) parte de livro

TAKAHASHI, T. Mercado, trabalho e oportunidades. In: _____. **Sociedade da informação no Brasil**: livro verde. Brasília: Socinfo/MCT, 2000. cap. 2, p. 13-24. Disponível em: <<http://www.socinfo.gov.br>>. Acesso em: 22 ago. 2000.

c) Parte de congresso, seminário, etc.

GIESBRECHT, H. O. Avaliação de desempenho de institutos de pesquisa tecnológica: a experiência de projeto excelência na pesquisa tecnológica. In: CONGRESSO ABIPTI, 2000, Fortaleza. **Gestão de institutos de pesquisa tecnológica**. Fortaleza: Nutec, 2000. Disponível em: <<http://www.abipti.org.br>>. Acesso em: 01 dez. 2000.

d) Tese

SILVA, E. M. **Arbitrariedade do signo**: a língua brasileira de sinais (LIBRAS). 1997. 144 p. Dissertação (Mestrado em Linguística Aplicada e Estudo de Língua) - Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo, 1997. Disponível em: <<http://www.terra.com.br/virtualbooks/freebook/port/did/teses.htm>>. Acesso em: 28 nov. 2000.

Artigo de periódico (acesso on-line):

RESENDE, A. M. G. Hipertexto: tramas e trilhas de um conceito contemporâneo. **Informação e Sociedade**, Recife, v. 10, n. 1, 2000. Seção Educação. Disponível em: <<http://www.informacoesociedade.ufpb.br/>>. Acesso em: 30 nov. 2000.

CITAÇÃO: PELO SISTEMA ALFABÉTICO (AUTOR-DATA) (conforme ABNT, NBR10520/2002)

Dois autores - Steel & Torrie (1960) ou (STEEL & TORRIE, 1960).

Três ou mais autores - Valle et al. (1945) ou (VALLE et al., 1945).

Quando forem citados dois autores de uma mesma obra deve-se separá-los pelo sinal & (comercial)

4. A **Comissão Editorial da REVISTA do ILCT** notificará o autor do recebimento do original e, posteriormente, o informará sobre sua publicação. Os artigos que necessitarem

de modificações serão devolvidos ao autor designado como representante e responsável pela publicação para a devida revisão.

5. Os artigos não aprovados serão devolvidos.

6. Os artigos serão publicados em ordem de **aprovação**.

7. O não-cumprimento dessas normas implicará na devolução do artigo ao autor.

8. Processo para publicação de trabalhos

Os **artigos** submetidos à REVISTA do ILCT para publicação são encaminhados a **Comissão Editorial** que fará o registro (protocolo de recebimento) para que seja verificado se está apresentado de acordo com as normas editoriais. Imediatamente após essa verificação, o autor representante do artigo receberá em seu **email um documento de submissão do artigo para fins comprobatórios**.

Posteriormente é encaminhado a 2 (dois) membros do **Corpo Revisor** para emitirem seus pareceres. Se aprovado por ambos, o artigo é re-enviado aos autores para as correções (se necessário); depois de corrigido retorna aos consultores para verificarem se as sugestões foram atendidas para emissão do parecer final. O autor representante receberá notificação via **email, de aceite para publicação**.

Finalmente o artigo é encaminhado para correções de Inglês, Referências Bibliográficas e Português. A seguir o artigo é encaminhado para editoração e publicação. Caso o(s) autor(es) não sejam assinantes da REVISTA do ILCT, o autor representante receberá pelos Correios 1 (um) exemplar do número em que consta o artigo submetido. Demais exemplares deverão ser solicitados à parte mediante pagamento antecipado, incluindo despesas de envio.

9. Os documentos contendo artigos, cópia digital e outros deverão ser enviados em um único volume para o seguinte endereço:

Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes

Comissão Editorial A/C Luiz Carlos Gonçalves Costa Júnior

Endereço: Rua Tenente Luiz de Freitas, número 116 – Bairro Santa Terezinha

CEP 36.045-560 Juiz de Fora – MG

ESTAS NORMAS DE PUBLICAÇÃO ESTARÃO DISPONÍVEIS NO SITE DA EPAMIG:

www.epamig.br/revistadoilct

ÁREAS PARA AVALIAÇÃO PELO CORPO EDITORIAL

- *Produção animal, zootecnia, veterinária;*
- *Microbiologia, sanificação, higienização:• Leites fermentados, culturas lácteas;*

- *Queijos processados, requeijão;*
- *Tecnologia de queijos;*
- *Físico-química, química de lácteos;*
- *Concentrados, desidratados, soro;*
- *Análise sensorial;*
- *Equipamentos, instalações, operações unitárias;*
- *Tecnologia sorvetes e gelados comestíveis;*
- *Tecnologia UHT/UAT;*
- *Tecnologia manteiga;*
- *Desenvolvimento novos produtos;*
- *Legislação, rotulagem;*
- *Economia/ Administração/Gerência/Inovação;*
- *Qualidade do leite;*
- *Gestão ambiental / tratamento resíduos e efluentes.*

Estamos trabalhando para garantir maior dinâmica nos trâmites para publicação, o que irá contribuir para melhoria na qualidade da REVISTA DO ILCT, e em breve disponibilizaremos on-line todo o processo de publicação e consulta das edições.

REVISTA do ILCT

ANEXO C – 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 Journalc/o Professor P. Jelen, Editor-in-Chief University of Alberta Alberta, Canada-mail: idj.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⁻¹, not g/mL). However, the solidus can be used in cases of % w/w or % w/v. The unit billion (10⁹ in America, 10¹² 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. Ca²⁺ and CO₃²⁻, not as Ca⁺⁺ or CO₃⁻⁻.
- Isotope numbers should precede the symbols, e.g. ¹⁸O.
- 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 P₂O₅).

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 Kruif, 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 offprints 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.