

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

**DESENVOLVIMENTO DE REQUEIJÃO CREMOSO COM BAIXO
TEOR DE LACTOSE PRODUZIDO POR ACIDIFICAÇÃO DIRETA E
COAGULAÇÃO ENZIMÁTICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Paula Mattanna

Santa Maria, RS, Brasil

2011

**DESENVOLVIMENTO DE REQUEIJÃO CREMOSO COM BAIXO
TEOR DE LACTOSE PRODUZIDO POR ACIDIFICAÇÃO DIRETA E
COAGULAÇÃO ENZIMÁTICA**

por

Paula Mattanna

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

Orientador (a): Prof^a Dr^a Neila 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 REQUEIJÃO CREMOSO COM BAIXO
TEOR DE LACTOSE PRODUZIDO POR ACIDIFICAÇÃO DIRETA E
COAGULAÇÃO ENZIMÁTICA**

elaborada por
Paula Mattanna

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

Neila Silvia Pereira dos Santos Richards, Dra (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Martha Zavariz de Miranda, Dra (EMBRAPA)

Leadir Lucy Martins Fries, Ph.D (UFSM)

Santa Maria, 14 de fevereiro de 2011.

*Dedico este trabalho a minha mãe, Normelia
(in memoriam), pela dedicação e amor que
sempre demonstrou a mim e aos meus irmãos.
A distância separa nossos olhares,
mas nunca nossos corações! Saudade eterna!*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me proteger, iluminar, guiar e dar esperança.

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

À Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade.

Aos meus pais, Paulo e Normelia (*in memoriam*), obrigada por me ajudarem a
construir meus valores e princípios, sem vocês nada disso seria possível...

Aos meus irmãos, Lucas e Gabi, amor maior do mundo, sem vocês não teria
conseguido seguir em frente, nos momentos mais difíceis que passamos aprendi a
admirá-los ainda mais, obrigada por tudo!

Ao meu amor, meu grande amor, Tarso Mastella. Meu parceiro incondicional!
Obrigada por fazer parte da minha vida e me fazer feliz todos os dias!

As “comadres”, Andri, mãe da minha boneca Lara, e Bruna, mãe da minha boneca
Antonella, minhas amigas para sempre, estiveram comigo no momento que mais
precisei, e como se isso não fosse suficiente, ainda me presentearam com a benção
de ser “dinda”. Obrigada pela amizade fiel e sincera e pela confiança com as
pequenas!

As minhas amigas “divas”, Lari, Marina, Dani, Lu, Carla e Aline, pela amizade
verdadeira que tenho com vocês, todos os momentos são especiais, obrigada pela
parceria e alegria que vocês compartilham comigo!

À Professora Neila Richards, obrigada pela confiança em orientar-me no mestrado e
a partir de março de 2011 no doutorado, pelo apoio, compreensão e amizade!

À minha “baita” parceira de todas as análises, de todos os momentos, estava
sempre lá comigo, minha amiga e colega, Daniele Back, obrigada por tudo!

Aos queridos amigos e estagiários, Regina, Daiane e Mateus. Em especial, o amigo Diego Fontana, que conciliou dois estágios para me ajudar, obrigada pela dedicação e amizade!

Às amigas e colegas, Ana Paula Rezer e Carline Parodia, obrigada pela ajuda na realização das análises, pelo incentivo e obrigada por me ouvirem, sempre dispostas a ajudar!

Aos amigos dos laboratórios, Marialene, Moisés e Welcir, obrigada por toda a ajuda na realização das análises, sempre dispostos a nos “socorrer”, obrigada pela amizade!

À todo o pessoal do laboratório de microbiologia, em especial, Liana, Suelem, Carlos, Diego, Monique, Carol e Sabrina, impossível ir para a UFSM sem passar por lá, obrigada pela amizade, incentivo, apoio e momentos de descontração!

Ao Carlos, funcionário do Nidal, pela ajuda e esclarecimentos sobre cromatografia gasosa, meu sincero agradecimento.

Tantos foram os que fizeram parte, de uma forma ou outra, deste trabalho durante os dois anos de realização, à todos muito obrigada!

*Não é possível existir
Naquilo que eu não fui
Naquilo que eu não vivi
Mas é possível crescer através
Daquilo que eu tentei
Daquilo que eu busquei
Daquilo que eu senti*

(Pablo Neruda)

RESUMO

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

DESENVOLVIMENTO DE REQUEIJÃO CREMOSO COM BAIXO TEOR DE LACTOSE PRODUZIDO POR ACIDIFICAÇÃO DIRETA E COAGULAÇÃO ENZIMÁTICA

AUTORA: PAULA MATTANNA

ORIENTADOR(A): NEILA SILVIA PEREIRA DOS SANTOS RICHARDS

Data e Local de Defesa: Santa Maria, 14 de fevereiro de 2011.

Grande parte da população mundial tem problemas em consumir leite e seus derivados por serem intolerantes à lactose. Para ser absorvida, a lactose necessita ser hidrolisada no intestino pela enzima lactase. As pessoas intolerantes à lactose não produzem a lactase e, portanto, não podem desfrutar dos benefícios do leite e de seus derivados. O presente estudo teve como objetivo elaborar requeijões cremosos com baixo teor de lactose obtidos por dois diferentes processos (acidificação direta e coagulação enzimática) a partir de leites adicionados de enzima lactase em diferentes concentrações (0,2; 0,5 e 0,8g de enzima por litro de leite) e avaliar as suas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais em comparação com requeijões cremosos controle. Quanto às características físico-químicas os requeijões elaborados estão de acordo com a legislação vigente. A lactose foi hidrolisada em mais de 70% para os tratamentos com adição de enzima lactase, suficiente para amenizar os sintomas de intolerância em pessoas que possuem má absorção da lactose. Os teores de lactose encontrados nos requeijões com adição de lactase foram considerados baixos, dentro dos padrões regulamentados pela legislação de alimentos para fins especiais. As contagens de micro-organismos se mantiveram dentro do exigido pela legislação brasileira. Os requeijões foram aceitos sensorialmente, não sendo detectada diferença estatística entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) no teste por escala hedônica. No perfil lipídico dos requeijões, o total de ácidos graxos saturados variou 62,76% a 64,70%, enquanto o total de insaturados variou de 34,36% a 38,36%. Na análise do perfil de textura apenas os parâmetros firmeza e elasticidade diferiram significativamente ($p < 0,05$) durante o período de armazenamento (60 dias). Considerando os resultados obtidos pode-se concluir que a enzima lactase utilizada hidrolisou eficientemente a lactose dos requeijões e não comprometeu as características físico-químicas e sensoriais do produto, sendo este então uma opção viável para indivíduos intolerantes a lactose.

Palavras-chave: requeijão; lactose; lactase.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Graduate Program on Food Science and Technology
Federal University of Santa Maria

DEVELOPMENT OF “REQUEIJÃO CREMOSO” WITH REDUCED LACTOSE CONTENT PRODUCED BY DIRECT ACIDIFICATION AND ENZYMATIC COAGULATION

Author: PAULA MATTANNA

Adviser: NEILA SILVIA PEREIRA DOS SANTOS RICHARDS

Date and Place of Defense: Santa Maria, February 14, 2011.

Much of the world population has problems in consuming milk and dairy products because some people are lactose intolerant. To be absorbed in the intestine lactose needs to be hydrolyzed by lactase enzyme. People with lactose intolerance do not produce lactase and therefore can not enjoy milk and dairy products benefits. This work aim to prepare “requeijões cremosos” by two different processes (direct acidification and enzymatic coagulation) by adding lactase enzyme at different concentrations (0.2; 0.5 and 0.8 g of lactase enzyme per liter of milk, respectively) and evaluating their physico-chemical, microbiological and sensory properties compared with “requeijões” control sample. In relation to physical and chemical characteristics the “requeijões” prepared are in accordance with current law. The lactose was hydrolyzed in more than 70 % for the treatments with adding of the lactase enzyme, enough to alleviate symptoms of intolerance in people who not well absorb lactose. Lactose found in "requeijões" with added lactase are considered low, within the standards regulated by the laws of foods for special purposes. The “requeijões” were sensoring accepted, no difference was detected statistic by Tukey test ($p < 0.05$) in testing by a hedonic scale among treatments. The lipid profile of “requeijões”, the total saturated fatty acids ranged from 62.76% to 64.70%, while total unsaturated ranged from 34.36% to 38.36%. In the texture profile analysis only the firmness and elasticity parameters differed significantly ($p < 0,05$) during the storage period (60 days). Considering the results it is possible conclude that the enzyme lactase used in the experiment efficiently hydrolyzed the lactose of the “requeijões”, and, did not affect the physico-chemical and sensory characteristics of the product, then this is a viable option for the lactose intolerant people.

Key words: “requeijão”; lactose; lactase.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Queijos fundidos ou processados	13
2.1.1 Histórico e características.....	13
2.2 Requeijão	14
2.2.1 Características gerais.....	14
2.2.2 Aspectos da legislação.....	15
2.2.3 Tecnologia de fabricação.....	17
2.2.4 Matéria-prima.....	17
2.2.5 Obtenção da massa.....	18
2.2.5.1 Coagulação ácida por acidificação direta a quente.....	18
2.2.5.2 Coagulação enzimática.....	19
2.2.6 Adição de ingredientes.....	19
2.2.6.1 Sais fundentes.....	20
2.2.6.2 Gordura.....	20
2.2.7 Processo de fusão.....	21
2.2.8 Embalagem.....	22
2.2.9 Resfriamento e estocagem.....	22
2.3 Intolerância à lactose	22
2.4 Lactose	24
2.5 Lactase	25
3 MANUSCRITOS	27
3.1 Manuscrito 1	28
3.2 Manuscrito 2	51
4 DISCUSSÃO GERAL	70
5 CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS	73
ANEXOS	79

1 INTRODUÇÃO

Sendo uma rica fonte de proteínas, gorduras, carboidratos, vitaminas e sais minerais, o leite é um produto importante para os seres humanos por ser de alto valor nutritivo. Porém estima-se que cerca da metade da população mundial não pode desfrutar dos benefícios do leite e de seus derivados devido a algum grau de intolerância à lactose (VESA, MARTEAU & KORPELA, 2000).

A intolerância à lactose é a incapacidade de digerir a lactose em seus componentes, glicose e galactose, devido a baixos níveis de enzima lactase.

Devido a essa incapacidade, a lactose não digerida continua dentro do intestino e chega ao intestino grosso, onde é fermentada por bactérias, produzindo ácido láctico e gases (RUSYNYK & STILL, 2001).

Atualmente o Brasil ainda possui um mercado pouco voltado para produtos específicos aos consumidores intolerantes à lactose, estando disponível para estes consumidores apenas o leite UHT (*ultra high temperature*)

A aplicação da enzima lactase para realizar a hidrólise enzimática da lactose em produtos lácteos tem recebido muita atenção. Em particular, estudos clínicos têm mostrado que as pessoas que sofrem de intolerância à lactose podem consumir produtos lácteos hidrolisados com uma redução considerável dos sintomas desagradáveis (BAKKEN, HILL & AMUNDSON, 1992; FERRONATO et al., 2004).

O requeijão cremoso é um produto lácteo tipicamente brasileiro obtido pela fusão de massa fresca, gordura láctea e sais fundentes (FURTADO & LOURENÇO-NETO, 1994). Segundo a classificação genérica de queijos, o requeijão pertence ao grupo de queijos denominados processados pasteurizados (OLIVEIRA, 1986).

O presente trabalho teve como objetivo geral desenvolver requeijão cremoso com baixo teor de lactose, utilizando para isso a enzima lactase. Além disso,

também foram avaliados os aspectos microbiológicos, físico-químicos e tecnológicos. Assim, os objetivos do estudo foram:

- Desenvolver formulações de requeijões cremosos por dois diferentes processos (acidificação direta e coagulação enzimática) com adição de diferentes teores de enzima lactase (0,2; 0,5 e 0,8%);
- Determinar o teor de lactose nos requeijões adicionados de enzima lactase para determinar sua redução;
- Determinar características físico-químicas e microbiológicas dos requeijões desenvolvidos com baixo teor de lactose em comparação com requeijões controle;
- Avaliar a aceitabilidade sensorial dos requeijões desenvolvidos;
- Determinar as características do perfil lipídico e perfil de textura das formulações de requeijões desenvolvidas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Queijos fundidos ou processados

2.1.1 Histórico e características

A tecnologia dos queijos fundidos ou processados surgiu no início do século XX, como uma necessidade de se deter os processos microbianos e enzimáticos de queijos suíços e alemães de forma a viabilizar a exportação para países de clima quente. Constatou-se, porém, o inconveniente de uma separação da proteína e da gordura no produto.

Em 1991, Gerber e Stettler conseguiram solubilizar o paracaseinato de cálcio da matéria prima por meio de calor, usando citrato de sódio como agente fundente, obtendo assim o que foi chamado de queijo fundido ou processado. O sal sódico sob agitação constante e calor promove uma troca interna de íons, transformando o paracaseinato de cálcio, de hidratação instável, em paracaseinato de sódio, cuja solução é coloidal e estável (MAURER-ROTHMANN & SCHEURER, 2005; GARRUTI et al., 2003).

O princípio de fabricação deste tipo de queijo consiste em fundir os dois elementos principais do queijo, isto é, a proteína e a gordura. A fusão só ocorre de maneira adequada quando a matéria-prima é submetida ao calor e à agitação mecânica em tachos especiais. Além disso, há necessidade do emprego de produtos emulsificantes conhecidos como sais fundentes para evitar a separação de gordura e de água da mistura, o que iria ocorrer normalmente após o aquecimento, se estes aditivos não fossem acrescentados. O objetivo do uso de sais fundentes consiste, portanto, em promover a emulsificação da mistura (gordura, proteína e água), obtendo-se, deste modo, um produto final homogêneo e estável (LEE & KLOSTERMEYER, 2001; VAN DENDER, 2006).

Do ponto de vista legal, os queijos processados ou fundidos devem cumprir os critérios estabelecidos no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo Processado ou Fundido, Processado Pasteurizado e Processado ou Fundido

UHT ou UAT (BRASIL, 1997a). De acordo com este regulamento entende-se por queijo processado *o produto obtido por trituração, mistura, fusão e emulsão por meio de calor e agentes emulsificantes de uma ou mais variedades de queijos, com ou sem adição de outros produtos lácteos e/ou sólidos de origem láctea e/ou especiarias, condimentos ou outras substâncias alimentícias nas quais o queijo constitui o ingrediente lácteo utilizado como matéria prima preponderante na base láctea. O produto definido se denominará “Queijo Processado” ou “Queijo Fundido” ou “Queijo Processado Pasteurizado.”*

A apresentação dos queijos fundidos é bastante variada: podem ser comercializados em blocos para fatiar, em porções embaladas individualmente para lanche, fatiados, em copos ou em bisnagas. Por outro lado, há inúmeras possibilidades de variação do sabor dos queijos fundidos, seja através da combinação de diferentes queijos para compor a mistura ou ainda, e principalmente, mediante utilização de condimentos ou outros ingredientes alimentares de sabor característico (VAN DENDER, 2006).

2.2 Requeijão

2.2.1 Características gerais

Segundo a classificação genérica de queijos, o requeijão pertence ao grupo de queijos denominados processados pasteurizados e é o produto que melhor representa essa classe no Brasil (OLIVEIRA, 1986).

O requeijão surgiu como subproduto feito a partir de leite desnatado, considerado descarte das regiões produtoras de creme para a fabricação de manteiga (MUNCK & CAMPOS, 1984). A produção se restringia ao uso local, mas com a evolução dos meios de transporte, de acondicionamento e de tecnologia, o requeijão se tornou expressivo no mercado de queijos, ocupando a preferência de consumo de muitos brasileiros. Atualmente são muitas as tecnologias empregadas na fabricação de requeijão assim como formato dos produtos, embalagens consistência e coadjuvantes tecnológicos (RODRIGUES, 2006).

Pequenas fábricas semi-artesanais que dispunham de uma desnatadeira separavam o creme e o leite desnatado resultante era deixado coagular espontaneamente para obter a massa que era então transformada em requeijão (MUNCK & CAMPOS, 1984; OLIVEIRA, 1986).

Porém, com o nome de requeijão, existem no mercado queijos com diferente teor de umidade e, conseqüentemente com variações na consistência, havendo desde produtos com elevada cremosidade, com propriedade de espalhabilidade como o requeijão cremoso, até produtos bastante firmes e até mesmo fatiáveis como o requeijão do norte. O mesmo acontece em relação ao teor de gordura, com elevada variação, podendo chegar quase a um creme fermentado, até requeijões praticamente sem gordura (OLIVEIRA, 1986; CAVALCANTE, 1991).

O requeijão é normalmente consumido logo após a fabricação e deve apresentar sabor ligeiramente ácido, agradável ao paladar, aroma característico de produto fermentado por micro-organismos lácticos e massa homogênea, com uma cremosidade ou untuosidade típica. Um requeijão mais consistente, a exemplo do requeijão do norte, pode fugir ligeiramente desta última característica, apresentando-se com massa mais desidratada, de alguma forma lembrando as características de um queijo de massa filada recém fabricado (OLIVEIRA, 1986).

2.2.2 Aspectos da legislação

De acordo com o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Requeijão ou Requesón (BRASIL, 1997b), o requeijão é definido como *produto obtido por fusão da massa coalhada, cozida ou não, dessorada e lavada, obtida por coagulação ácida e/ou enzimática do leite opcionalmente adicionado de creme de leite e/ou manteiga e/ou gordura anidra de leite ou butter oil. O produto poderá ser adicionado de condimentos, especiarias e/ou outras substâncias alimentícias. A denominação requeijão está reservada ao produto no qual a base láctea não contenha gordura e/ou proteína de origem não láctea.*

Existem no Brasil requeijões de consistência untável até bem firmes, que podem ser cortados em fatias. De acordo com a Portaria 359/97 (BRASIL, 1997b), o requeijão pode ser classificado como requeijão, requeijão cremoso e requeijão

manteiga. As diferenças entre eles consistem no tipo de matéria-prima e de sal fundente empregados no processo de fabricação e dos teores de gordura e umidade contidos no produto final.

Ainda, segundo esta portaria, o requeijão deve apresentar algumas características sensoriais essenciais como: consistência untável ou fatiável; textura cremosa, fina, lisa ou compacta; cor característica, odor característico; sabor a creme, levemente ácido e opcionalmente salgado.

Requeijão: é aquele obtido por fusão de uma massa de coalhada dessorada e lavada obtida por coagulação ácida e/ou enzimática do leite com ou sem adição de creme de leite e/ou manteiga e/ou gordura anidra de leite ou *butter oil*.

Requeijão Cremoso: é aquele obtido por fusão de uma massa coalhada dessorada e lavada, obtida por coagulação ácida e/ou enzimática do leite, com adição de creme de leite e/ou manteiga e/ou gordura anidra de leite e/ou *butter oil*.

Requeijão de Manteiga ou norte: é aquele obtido pela fusão prolongada com agitação de uma mistura de manteiga e massa de coalhada de leite integral, semi-desnatado ou desnatado.

Nestas três categorias encontram-se os requeijões com mais ou menos consistência (barra, semi-cremoso de uso culinário, cremoso de copo tradicional) ou qualquer outra modalidade que se encaixem dentro do regulamento técnico (FERNANDES et al., 1985).

O Quadro 1 apresenta os requisitos físico-químicos para os diferentes requeijões.

Requisito	Requeijão	Requeijão Cremoso	Requeijão de Manteiga	Métodos de Análises
Matéria gorda no extrato seco g/100g	45,0 a 54,9	Mín. 55,0	Mín. 25,0 a 59,9	Norma FIL 5B: 1986
Umidade g/100g	Máx. 60,0	Máx. 65,0	Máx. 58,0	Norma FIL 4A: 1982

Quadro 1 - Requisitos físico-químicos para requeijões.

Fonte: Brasil, Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1997b.

Quanto aos padrões microbiológicos, o produto deverá cumprir os seguintes requisitos, de acordo com o quadro 2, a seguir:

Micro-organismo	Critério de Aceitação	Categoria I.C.M.S.F.	Método de Análise
Coliformes/g (30 °C)	n = 5 c = 2 m = 10 M = 100	5	FIL 73 A: 1985
Coliformes/g (45 °C)	n = 5 c = 2 m < 3 M = 10	5	APHA 1992 Cap. 24(1)
Estafilococos Coag. Pos./g	n = 5 c = 2 m = 100 M = 1000	5	FIL 145: 1990

Quadro 2 - Critérios microbiológicos para requeijões.

Fonte: Brasil, Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1997b.

2.2.3 Tecnologia de fabricação

As principais etapas do processo de fabricação dos requeijões em geral são as seguintes: coagulação do leite; retirada do soro; lavagem da massa; adição de cloreto de sódio e sais fundentes; adição da gordura; processo de fusão; envase da mistura líquida a quente; resfriamento do produto embalado e, finalmente, estocagem em temperatura de refrigeração (RODRIGUES, 2006).

2.2.4 Matéria-prima

O leite é a matéria-prima principal, sendo utilizado na fabricação da massa de queijo para o requeijão. Tradicionalmente, o leite utilizado para a fabricação do requeijão é desnatado, prática esta proveniente da época em que a manteiga era o derivado mais valorizado do leite (OLIVEIRA, 1986). Atualmente vários tipos de leite podem ser utilizados: leite desnatado, leite reconstituído, leite integral ou até mesmo leite integral homogeneizado, onde os glóbulos de gordura são fraturados impedindo

que os mesmos sejam perdidos na etapa de dessoragem da massa (VAN DENDER, 2006).

A qualidade do leite empregado exerce forte influência no processamento e nas características básicas desses produtos, no que se refere aos atributos de aparência, consistência, textura, sabor, aroma, bem como na sua vida útil, sendo praticamente impossível obter produto de excelente qualidade a partir de matéria-prima de má qualidade (VALLE, 1981).

2.2.5 Obtenção da massa

Para a produção de massa destinada à fabricação de requeijão cremoso existem várias formas de processamento: coagulação enzimática, adição de fermentos lácteos e a acidificação direta (com ácido láctico ou ácido acético) do leite aquecido (MORENO, VIALTA & VALLE, 2002; VAN DENDER, 2006)

A coagulação do leite por bactérias lácticas não tem sido empregada em função do período longo de coagulação. Assim, para a fabricação de requeijão, tem-se preferido a obtenção da massa pelo processo de acidificação direta ou por meio de coagulação enzimática (SOBRAL, 2007).

2.2.5.1 Coagulação ácida por acidificação direta a quente

Na obtenção da massa pelo processo de acidificação direta a quente do leite, o pH no momento da coagulação das proteínas é maior que 4,6 (ponto isoelétrico da caseína), o que se deve à ação conjunta de calor e ácido, aumentando a taxa de colisão entre as partículas e desidratando parcialmente as proteínas do leite. Deste modo, a redução de pH é suficiente para acelerar a precipitação, ao mesmo tempo que fornece um coágulo mais macio (ORDÓNEZ *et al.*, 2006).

O aumento do ponto isoelétrico das frações de caseína com o aquecimento do leite é presumivelmente devido à associação das frações de caseína com as proteínas do soro. Com isso, a acidificação do leite aquecido resulta num precipitado

de caseína e proteínas desnaturadas do soro com formação de flocos ou grãos, ao invés do gel homogêneo formado pela fermentação láctica ou pela ação da renina. Os requeijões produzidos por este processo possuem como característica uma massa elástica com grande formação de fios (SCOTT, ROBINSON & WILLEY, 2002).

A acidificação direta a quente, ao contrário do uso dos coalhos enzimáticos e fermento láctico, reduz o custo, o tempo de produção do queijo, elimina a manutenção de culturas lácticas, proporciona maior uniformidade na produção, bem como melhores características de conservação do produto. Possibilita ainda automatizar o processo de fabricação, convertendo-o em operação contínua, o que representa uma grande vantagem (FERNANDES & MARTINS, 1980; VAN DENDER, 2006).

2.2.5.2 Coagulação enzimática

No processo de fabricação em que a massa é obtida por meio da coagulação enzimática, emprega-se coalho rico em enzimas proteolíticas de origem animal (ECK, 1987).

A coagulação das micelas devido à ação proteolítica do coalho é dividida em duas fases. Na primeira, há ação enzimática da renina (quimosina) sobre a ligação peptídica Phe 105-Met 106 da fração K-caseína. A segunda fase caracteriza-se por uma agregação do fragmento hidrofóbico denominada paracaseína, a qual, na presença de cálcio solúvel dá origem a um coágulo brilhante, elástico e hidratado denominado paracaseinato de cálcio (VAN DENDER, 2006).

O requeijão elaborado a partir deste tipo de massa não apresenta elasticidade (fios de mel) tradicionalmente promovida pelos requeijões elaborados a partir de massa exclusivamente láctica. Este fato deve-se a presença de cálcio na massa enzimática, que influencia na formação de uma estrutura rígida e menos elástica quando comparado com massas lácticas (sem cálcio) (RODRIGUES, 2006).

2.2.6 Adição de ingredientes

2.2.6.1 Sais fundentes

Os sais fundentes ou emulsificantes são utilizados com o objetivo de remover o cálcio do sistema protéico, peptizar, hidratar, solubilizar e dispersar a proteína, estabilizar a emulsão, controlar o pH, contribuir para a formação de uma estrutura apropriada após o resfriamento e, em alguns casos, atuar como agente bacteriostático. A principal característica de um sal fundente é a capacidade de solubilizar a caseína, com a consequente formação de um sol homogêneo (DIMITRELI & THOMAREIS, 2004; FERNANDES et al., 1985).

Segundo Van Dender (2006) três categorias de sais fundentes são empregadas na fabricação de requeijões: citratos, monofosfatos e polifosfatos. Cada grupo confere ao produto final características básicas de firmeza, espalhabilidade, maciez e poder tampão.

O tipo e a quantidade de sal emulsificante que deve ser adicionado a massa é determinado em função de vários fatores, tais como: pH, grau de maturação e estrutura do queijo usado como matéria-prima, grau de cremificação e características de textura desejadas para o produto final (ZEHREN & NUSBAUM, 1992).

Para queijos jovens (sem maturação), constituídos praticamente só de caseína não degradada, é necessário um sal com grande poder cremificante, pois este tipo de matéria-prima sofre transformações lentas. Se o queijo for relativamente velho e a caseína estiver bastante degradada (estrutura curta) deve-se usar um sal que não modifique ainda mais a massa (FERNANDES et al., 1985).

2.2.6.2 Gordura

As fontes de gordura utilizadas no processo de fabricação dos requeijões podem ser o creme de leite, a manteiga ou *butter-oil*. A gordura no extrato seco desengordurado deste tipo de produto é elevada, predominando na faixa de 50% a 60% (VAN DENDER, 2006).

A quantidade de gordura a ser adicionada depende do teor de gordura que se deseja no extrato seco do produto final e das porcentagens de gordura e sólidos totais da massa inicial (FERNANDES, 1981). Além de realçar o sabor do produto, a gordura exerce um papel importante na sua consistência, tornando-o mais atraente para o consumo e melhorando suas características organolépticas (VALLE, 1981).

2.2.7 Processo de fusão

Durante o processo, a massa de queijo constituída principalmente de proteína e gordura é dispersa, homogeneizada e convertida em uma emulsão. O processo de fusão consiste no tratamento térmico no qual a mistura aquecida é submetida, utilizando tanto vapor direto como indireto, sob agitação constante (VAN DENDER, 2006). A fusão propriamente dita é realizada através do aquecimento e agitação vigorosa da massa, utilizando uma temperatura mínima de 80 °C durante 15 segundos, ou qualquer outra combinação tempo/ temperatura equivalente (BRASIL, 1997b).

A temperatura de fusão é um fator muito importante, pois o calor influencia a peptização da caseína e a estrutura do produto final. A cremificação é consideravelmente maior quando a temperatura é aumentada de 70 °C para até cerca de 90 °C (FERNANDES, 1981). De acordo com Valle (1981), recomenda-se o uso de temperaturas superiores a 75 °C, para assegurar a pasteurização do produto. O tempo necessário para a fusão depende do equipamento utilizado, do tipo de matéria-prima, das propriedades desejadas no produto final e do tipo e quantidade de sal emulsificante usado (ZEHREN & NUSBAUM, 1992). Segundo Fernandes (1981), a temperatura também influencia o tempo de fusão, uma vez que o tratamento térmico é definido pelo binômio tempo x temperatura.

O processo possui algumas fases principais. A primeira consiste na peptização que é a troca de íons cálcio bivalentes da paracaseína por íons sódio monovalentes, promovidas pelos sais fundentes. Ocorre, nesta fase uma dissolução das pontes de cálcio do agregado de caseína e a estrutura passará do estado gel para o estado sol. Na segunda fase, denominada de fase de hidratação, ocorre a

cremificação, ou seja, mudança na consistência do produto pela absorção de água. A última fase, de reestruturação, ocorre durante o resfriamento e após a estocagem, havendo uma estabilização do produto por meio de reorientação das moléculas protéicas (VAN DENDER, 2006).

2.2.8 Embalagem

Quando ainda quente, o requeijão é fluido e nestas condições é então envasado (OLIVEIRA, 1986). Dentre os materiais empregados no envase de requeijão destacam-se os copos de vidro, com ou sem sistema de abertura fácil, copos termoformados de polipropileno e tubos de polietileno (ALVES et al., 2007).

2.2.9 Resfriamento e estocagem

O resfriamento deste produto deve ser feito o mais rápido possível e normalmente é realizado abaixo de 10 °C, embora a utilização destas temperaturas possa promover a formação de cristais (VAN DENDER, 2006).

Com relação ao armazenamento do requeijão cremoso, este requer refrigeração da mesma forma que a maioria dos queijos processados; entretanto, a sua conservação é bem maior quando mantido hermeticamente fechado. Depois de aberto, a sua conservação é limitada a cerca de uma semana, mesmo sob refrigeração adequada (RAPACCI, 1997).

2.3 Intolerância à lactose

Intolerância à lactose é um termo usado para descrever a incapacidade de digerir a lactose devido à deficiência ou ausência da enzima β -galactosidase no sistema digestivo (ANGELIS, 2006; TÉO, 2002).

A lactose que não é hidrolisada em galactose e glicose permanece no intestino e atua osmoticamente para atrair a água para o intestino. As bactérias

colônicas fermentam a lactose não digerida, gerando ácidos graxos de cadeia curta, dióxido de carbono e gás hidrogênio. Pode resultar em inchaço, flatulência, cólicas e diarreia (BEYER, 2002).

A severidade dos sintomas depende da quantidade ingerida e da quantidade de lactose que cada pessoa pode tolerar (SUENAGA et al., 2001).

Estima-se que cerca de metade da população mundial sejam lactase não persistentes. Esta ocorrência varia grandemente entre os grupos étnicos. Na Europa pode variar entre 2% em escandinavos até 70% entre sicilianos (VESA, MARTEAU & KORPELA, 2000). Entre os africanos, árabes e chineses, por exemplo, a incidência é de 80% (RUZYNYK & STILL, 2001). No Brasil, num estudo feito por Pereira Filho & Furlan (2004) obteve-se 44% de intolerantes.

Dados existentes indicam que a população intolerante tende a aumentar (OLIVEIRA, 2005). Por este fato, e visto a sua alta prevalência, a intolerância a lactose seria considerada uma característica normal, enquanto que a continuidade da lactase na fase adulta seria uma condição atípica (ANTUNES & PACHECO, 2009).

Existem descritos na literatura três tipos de deficiência de lactase:

Deficiência genética ou congênita: é uma disfunção rara resultante de herança autossômica recessiva. É uma condição permanente manifestada em recém-nascidos (SHUKLA, 1997).

Deficiência transitória ou primária: se caracteriza por diminuição de quantidade produzida de lactase. As manifestações dessa deficiência, geneticamente determinada, costumam ser evidentes por volta dos 2 aos 15 anos de idade (DUMOND et al., 2006).

Deficiência adquirida ou secundária: é decorrente de doenças que causam algum tipo de dano à mucosa intestinal, ou após cirurgias no aparelho digestivo (FARIAS & FAGUNDES NETO, 2004).

A enzima lactase e leites tratados com ela estão disponíveis para pessoas que não digerem a lactose e possuem desconforto com a ingestão de leite (BEYER, 2002). Em vários estudos, a ingestão de leites com lactose hidrolisada tem reduzido os sintomas em pessoas intolerantes a esse carboidrato (BATISTA et al., 2008).

O leite representa uma importante fonte de micro e macronutrientes na dieta, especialmente cálcio, fósforo, proteínas de alto valor nutricional, ácido linoléico conjugado e vitaminas B2, B12 e, no leite integral, vitaminas A e D.

Os pacientes com intolerância a lactose não são alérgicos ao leite, visto que a alergia ao leite está relacionada à hipersensibilidade às proteínas e não ao dissacarídeo lactose. Portanto, encontradas alternativas lácteas toleráveis, tais pessoas não necessitam abolir o leite e seus derivados da dieta (ANTUNES & PACHECO, 2009).

2.4 Lactose

A lactose é um dissacarídeo constituído por um radical β -D-galactose e um radical D-glicose e 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 lactose tem como características a baixa solubilidade em água (15 a 20%) e o baixo poder adoçante, quando comparada a outros açúcares (TRONCO, 2003).

Quando comparada com a sacarose, é cerca de dez vezes menos solúvel e apresenta um poder edulcorante seis vezes inferior (MAHAUT et al., 2004).

Faz parte, juntamente com as 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 (SCHLIMME & BUCHHEIM, 2002).

Segundo Carminatti (2001) a molécula de lactose contém um número de sítios ativos que a torna sensível a modificações enzimáticas e/ou químicas. Usada em produtos assados promove reação de Maillard, melhorando a coloração do alimento.

A utilização da lactose pela microflora intestinal resulta na produção de ácido láctico e na diminuição do pH, promovendo o desenvolvimento da microflora intestinal lactofílica desejável, inibindo o desenvolvimento de bactérias putrefativas e patogênicas (TRONCO, 2003).

A hidrólise da lactose é uma reação necessária para a digestão da lactose. A lactose é hidrolisada pela enzima lactase, a nível de mucosa intestinal, em dois monossacarídeos, a glicose e a galactose, carboidratos mais simples, que são melhor absorvidos pelo organismo (BEYER, 2002).

A hidrólise da lactose é cada vez mais importante para seu uso alimentar, pois modifica a solubilidade da lactose, o dulçor, o poder redutor e a fermentabilidade e consegue-se, sobretudo, fazer com que seja digerível pelos consumidores intolerantes a esse carboidrato (SCHLIMME & BUCHHEIM, 2002).

Segundo Silva e Cardoso (2004), devido ao alto nível de lactose presente no leite, o consumo deste alimento fica restrito para as pessoas intolerantes e, por este motivo, a redução do teor de lactose no leite e nos seus derivados é de grande importância nutricional e comercial.

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).

A hidrólise da lactose pode ser realizada por dois diferentes métodos: o método químico e o método enzimático. Na hidrólise química, a reação envolve soluções diluídas de ácido fortes como sulfúrico e clorídrico, e condições operacionais severas de pH e temperatura, e por isto acarreta alterações no sabor e cor dos alimentos (SANTIAGO, 2002). Já a hidrólise enzimática é catalisada pela enzima lactase (β -galactosidase), pode ser aplicada no leite sem um tratamento prévio e os produtos obtidos preservam as propriedades nutricionais da matéria-prima, aumentando seu dulçor. Pode ser realizada sob condições operacionais consideravelmente mais brandas (LADERO, SANTOS & GARCÍA-OCHOA, 2000).

Segundo Oliveira (2005) a hidrólise da lactose é um processo promissor para a indústria de alimentos porque possibilita o desenvolvimento de novos produtos sem lactose em sua composição ou com um teor reduzido desse carboidrato, para pessoas com intolerância à lactose.

2.5 Lactase

A enzima β -D-galactosidase galactohidrolase, conhecida como lactase é classificada como uma hidrolase e catalisa, entre outras, a reação de hidrólise da lactose à β -D-galactose e α -D-glicose, monossacarídeos mais facilmente absorvíveis e com maior solubilidade (ANDRADE, 2005; OLIVEIRA, 2005) A velocidade de reação da enzima depende de alguns fatores importantes como: pH, temperatura, tempo de reação e concentração da enzima (PROZYN, 2004). Normalmente a atividade enzimática aumenta com o aumento da temperatura, até atingir um potencial ótimo, aumentando assim a formação do complexo enzimático. Se o aumento da temperatura persistir a enzima será desnaturada e inativada pela ação do calor (RICHARD, 1985).

As enzimas utilizadas podem ser de origem microbiana ou fúngica (MAHAUT et al., 2004). A estabilidade e atividade da enzima depende da fonte de onde procede e por razões de segurança, a β -galactosidase é extraída geralmente das leveduras alimentares *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces fragilis* (GACESA & HUBBLE, 1990). Segundo a legislação brasileira, a enzima lactase utilizada na indústria de alimentos deve ser de origem microbiana, proveniente de levedura *Kluyveromyces lactis* (BRASIL, 2003).

Essa enzima está localizada em todo o intestino delgado e não sofre influência na quantidade e atividade com a ingestão de lactose e outros açúcares (FARIAS & FAGUNDES NETO, 2004).

A lactase pode ser empregada para elaboração de produtos lácteos com teor reduzido de lactose, minimizando problemas de arenosidade causada pela cristalização da lactose e formando açúcares de maior poder adoçante e de maior solubilidade (ANDRADE, BRANDÃO & ALVIM, 2004).

3 MANUSCRITOS

3.1 Manuscrito 1

Manuscrito em fase final de revisão pelos autores para ser submetido Alimentos &
Nutrição

(Configuração conforme as normas da Revista – Anexo C)

DESENVOLVIMENTO DE REQUEIJÃO CREMOSO COM BAIXO TEOR DE LACTOSE: PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS*

Paula MATTANNA**

RESUMO: Milhões de pessoas no mundo são intolerantes à lactose e, portanto, tem problemas em consumir leite e seus derivados. A lactose necessita ser hidrolisada no intestino pela enzima lactase para ser absorvida. As pessoas intolerantes à lactose não produzem a lactase e, por isso, não podem desfrutar dos benefícios do leite e de seus derivados. O presente estudo teve como objetivo elaborar requeijões cremosos por dois diferentes processos (acidificação direta e coagulação enzimática) adicionados de enzima lactase e avaliar as suas características físico-químicas e microbiológicas em comparação com requeijões cremosos controle. Quanto às características físico-químicas os requeijões elaborados estão de acordo com a legislação vigente. A lactose foi hidrolisada em mais de 70% para os tratamentos com adição de enzima lactase, suficiente para amenizar os sintomas de intolerância em pessoas que possuem má absorção da lactose. As contagens de microrganismos se mantiveram dentro dos padrões exigidos pela legislação brasileira.

PALAVRAS-CHAVE: *requeijão cremoso; lactose; lactase.*

*Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor (Bolsista CAPES-Brasil).

**Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (Mestrado), Universidade Federal de Santa Maria – UFSM- Av. Roraima, nº1000, CEP 97105-900 - Santa Maria – RS - Brasil. Email para correspondência: mattannapaula@hotmail.com

INTRODUÇÃO

O leite é um produto importante para os seres humanos por ser de alto valor nutritivo. Sendo uma rica fonte de proteínas, gorduras, carboidratos, vitaminas e sais minerais, seu consumo e o de seus derivados é um hábito saudável, fornecendo quase todos os nutrientes em quantidades consideráveis.^{3,11}

Entretanto, uma grande parte da população mundial tem problemas em consumir leite e seus derivados, por serem intolerantes à lactose, que é o principal carboidrato do leite, ou por apresentarem um quadro de má absorção da lactose.¹³

A intolerância à lactose é um termo usado para descrever a incapacidade de digerir lactose devido a uma deficiência do sistema digestivo.¹⁵

Para ser absorvida, a lactose necessita ser hidrolisada no intestino por uma β -galactosidase, geralmente chamada lactase.³²

As pessoas intolerantes à lactose não produzem a lactase e, portanto, ao consumirem o leite e seus derivados, não ocorre o desdobramento da lactose, que passa diretamente para o intestino grosso onde é metabolizada por grupos microbianos (bactérias) produtores de ácidos e gases (CO_2). Simultaneamente, remove por osmose a água dos tecidos vizinhos. Este fenômeno causa alguns sintomas como estufamento abdominal, produção de gases, flatulências, cólicas e diarreia, o que resulta em desconforto. Por causa destes sintomas desagradáveis, estas pessoas se privam do consumo de leite e seus derivados e, com isto, de seus benefícios nutritivos.^{11,22}

Segundo Oliveira¹⁹ a hidrólise da lactose através da enzima lactase é um processo promissor para a indústria de alimentos, porque possibilita o desenvolvimento de novos produtos sem lactose em sua composição ou com um teor reduzido desse carboidrato, para pessoas com intolerância à lactose.

O requeijão cremoso é um produto lácteo tipicamente brasileiro obtido pela fusão de massa fresca, gordura láctea e sais fundentes.¹² Segundo a classificação genérica de queijos, o requeijão pertence ao grupo de queijos denominados processados pasteurizados.¹⁷

Sua produção aumentou significativamente nos últimos anos, o que coloca em evidência o grande valor comercial deste produto.²

Para a fabricação de requeijão, tem-se preferido a obtenção da massa pelo processo de acidificação direta ou por meio de coagulação enzimática.²⁸

Na obtenção da massa pelo processo de acidificação direta a quente do leite, o pH no momento da coagulação das proteínas é maior que 4,6, o que se deve à ação conjunta de calor e ácido. Deste modo, a redução de pH é suficiente para acelerar a precipitação, ao mesmo tempo que fornece um coágulo mais macio.²⁰ Os requeijões produzidos por este processo possuem como característica uma massa elástica com grande formação de fios.²⁵

No processo de fabricação em que a massa é obtida por meio da coagulação enzimática, emprega-se coalho rico em enzimas proteolíticas de origem animal.¹⁰ O requeijão elaborado a partir deste tipo de massa não apresenta elasticidade (fios de mel) tradicionalmente promovida pelos requeijões elaborados a partir de massa exclusivamente láctea. Este fato deve-se a presença de cálcio na massa enzimática, que influencia na formação de uma estrutura rígida e menos elástica quando comparado com massas lácteas (sem cálcio).²³

Atualmente, para os indivíduos intolerantes à lactose, está disponível somente o leite com baixo teor de lactose, evidenciando a importância de se estudar a adição da enzima lactase em derivados lácteos.

O objetivo deste estudo foi avaliar as características físico-químicas e microbiológicas de requeijões cremosos adicionados de diferentes concentrações de enzima lactase, produzidos por diferentes processos de fabricação durante armazenamento a 8 °C por 60 dias.

MATERIAIS E MÉTODOS

Todas as análises foram realizadas nos laboratórios do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos (DTCA) do Centro de Ciências Rurais (CCR) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Rio Grande do Sul, Brasil.

Os requeijões foram analisados entre o 1º e 5º dia de armazenamento, quanto ao valor de gordura, proteína, umidade, extrato seco total, gordura no extrato seco e cinzas, além das análises microbiológicas. Nos dias 1º, 15º, 30º, 45º e 60º foram realizadas análises do teor de pH, acidez expressa em ácido láctico e lactose. As análises físico-químicas foram realizadas em triplicata e as microbiológicas em duplicata.

Tratamentos

Para o estudo foram preparados oito tratamentos. Os leites utilizados como matéria-prima foram divididos em três lotes e tratados com 0,2; 0,5 e 0,8% de enzima lactase (Enzima β -Galactosidase Lactozym® 3000L HPG, Novozymes)

sendo, a seguir divididos nos tratamentos T1, T2 e T3 onde as amostras de requeijão foram preparadas por acidificação direta e T4, T5 e T6 por coagulação enzimática. O tratamento T7 é o controle (sem adição de enzima) dos requeijões preparados por acidificação direta e o tratamento T8 é o controle dos requeijões preparados por coagulação enzimática.

Preparação do leite adicionado de enzima lactase

Foram utilizados, para cada tratamento, oito litros de leite pasteurizado padronizado em 3% de gordura (Piá®, Cooperativa Agropecuária Petrópolis LTDA, Nova Petrópolis, RS). Cada alíquota de oito litros de leite foi adicionada de diferentes concentrações de enzima lactase. Os tratamentos T1 e T4 foram adicionados de 0,2%, T2 e T5 de 0,5% e T3 e T6 de 0,8% de enzima lactase.

Todos os frascos foram acondicionados em temperatura controlada (8 °C) por 12 horas, para sofrerem hidrólise da lactose. Após esse período os leites passaram pelo processo de aquecimento (92 °C por 3 minutos) para inativação da enzima lactase.

Preparação dos requeijões cremosos

Os tratamentos T1, T2, T3 e T7 foram preparados por acidificação direta a quente, segundo metodologia adaptada de Van Dender.³¹ Os leites foram aquecidos a 82 °C e então adicionados de 0,3% de ácido láctico (solução aquosa, Pantec® Tecnologia, São Paulo, SP). Após a adição do ácido láctico, o leite permaneceu em repouso por 10 minutos. O soro foi retirado e efetuou-se a lavagem da massa com

água gelada (5 °C) por três vezes. Em seguida foi feita a drenagem da coalhada em dessorador de queijos e esta foi mantida em refrigeração a 8 °C por aproximadamente 8 horas.

Os tratamentos T4, T5, T6 e T8 foram preparados por coagulação enzimática, segundo metodologia adaptada de Rodrigues.²³ Os leites foram aquecidos a 35 °C e então adicionados de 0,8mL/L de coalho líquido comercial (Ha-La®, Chr. Hansen, Valinhos, SP). Após 40 minutos de coagulação foi realizado o corte, seguido de descanso por 10 minutos. Após a eliminação do soro a coalhada foi drenada em dessorador de queijos e mantida em refrigeração a 8 °C por aproximadamente 8 horas.

Após a obtenção das massas, todos os tratamentos seguiram o mesmo processo de fabricação, segundo Van Dender.³¹

As massas, juntamente com 0,8% de sal fundente (JOHA S9, BKG Rotem Química do Brasil, São Paulo, SP), 1,2% de cloreto de sódio (Salazir®, Porto Alegre, RS) e 20% de soro de leite líquido (proveniente da coagulação dos leites) foram aquecidas até 85 °C. Após, a mistura foi acrescida de 20% de manteiga sem sal (Batavo®, Brasil Foods, São Paulo, SP) e 0,03% de conservante sorbato de potássio (Dyne®, Rio de Janeiro, RJ). O processo de fusão ocorreu a 85 °C por 8 minutos, a mistura foi então homogeneizada por 3 minutos em processador (Efficace MPR850, Cadence).

Os requeijões foram embalados em potes identificados e mantidos sob temperatura de refrigeração até o momento das análises.

Análise Físico-química

Foram realizadas as seguintes análises físico-químicas nos requeijões: gordura, proteína, cinzas, umidade, extrato seco total, gordura no extrato seco, pH, acidez e lactose. A proteína foi determinada pelo método de Kjeldahl utilizando o fator de correção de 6,38.⁷ O teor de gordura foi determinado pelo butirômetro de Gerber.⁷ A umidade e o extrato seco total foram obtidos por secagem de 5 g de amostra em estufa a 105 °C, até peso constante, e o teor de cinzas determinado por gravimetria pelo aquecimento de 2 g de amostra isenta de umidade em mufla a 550 °C até completa incineração.¹ A gordura no extrato seco foi calculada por diferença, segundo Van Dender.³¹ A acidez titulável (% de ácido láctico) foi determinada de acordo com a AOAC¹ e os valores de pH foram determinados com pHmetro digital (Digimed DM3020, SP Labor, Presidente Prudente, SP, Brasil) previamente calibrado¹. A lactose dos tratamentos T1 a T6 foi determinada através do Kit Glicose Monoreagente K082 Bioclin (determinou-se a glicose para então fazer-se a estequiometria da reação, considerando que para cada molécula de lactose degradada são formadas uma molécula de glicose e uma molécula de galactose). A leitura foi determinada por meio de espectrofotômetro modelo 600, marca FEMTO. A leitura da absorbância foi a 505 nm, e as amostras foram colocadas em banho-maria a 37 °C por 15 minutos. Para a determinação da lactose nos tratamentos controle (T7 e T8) foi adotado o método de Lane-Eynon.⁷

Análise microbiológica

Foram realizadas no 5º dia de armazenamento as análises microbiológicas exigidas pela legislação brasileira para requeijão.⁴

Foram realizadas análises do NMP (número mais provável) de Coliformes a 30 °C e a 45 °C, utilizando para o teste presuntivo o caldo lauril sulfato de sódio, para o teste confirmatório de coliformes 30 °C e 45 °C o caldo verde brilhante bile lactose 2% e o caldo EC, respectivamente.⁶

A Contagem de Estafilococos Coagulase Positiva foi realizada de acordo com a RDC Nº 62 de 2003¹, utilizando-se agar Baird-Parker. As diluições foram semeadas em placas e incubadas a 37 °C por 48h realizando-se as contagens de colônias típicas, de cor preta brilhante com anel opaco, rodeadas por um halo claro transparente e atípicas, acinzentadas ou negras brilhantes, sem halo ou com apenas um dos halos. Três a cinco colônias típicas e atípicas selecionadas foram semeadas em caldo de infusão cérebro-coracão (BHI) para confirmação, em plasma de coelho, do teste de coagulação.

Análise estatística

Os dados do estudo foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas entre si através do teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro. Os resultados foram analisados através do programa SPSS 13.0¹⁶, utilizando o delineamento de blocos inteiramente casualizados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise Físico-química

Os resultados dos valores médios de gordura, proteína, cinzas, umidade, extrato seco total e gordura no extrato seco dos requeijões analisados são apresentados na Tabela 1.

O teor de gordura dos requeijões analisados variou de 20,26% a 24,52%. Os valores são similares aos encontrados por Van Dender³⁰ e Cunha⁸ na análise de requeijões cremosos comerciais. Lubeck¹⁴ ao analisar requeijões cremosos comerciais encontrou valores de gordura que variaram entre 23,4% a 26,7%, valores também similares aos obtidos neste estudo.

Os valores de proteína dos requeijões (10,58% a 12,81%) e cinzas (2,15% a 2,53%) estão de acordo com os resultados encontrados por Lubeck¹⁴, Oliveira¹⁸ e Picollo²¹ para requeijões comerciais.

A legislação brasileira vigente estabelece limites para umidade (máximo de 65%) e gordura no extrato seco (mínimo de 55%) para requeijões cremosos.⁴ A umidade dos requeijões elaborados variou de 58,92% a 62,9%, e a gordura no extrato seco de 55,07% a 59,74%, estando todos os requeijões elaborados de acordo com a legislação.

Segundo Van Dender³¹, o requeijão cremoso deve apresentar um teor de extrato seco total de 38% a 40%, estando os tratamentos T5 e T8 abaixo deste valor (37,1% e 36,8, respectivamente) e o tratamento T6 (41,07%) acima. Os demais tratamentos encontram-se dentro desta faixa e os teores de extrato seco total de todos os tratamentos são similares aos encontrados por Lubeck¹⁴ em análise de requeijões comerciais.

As Tabelas 2 e 3 apresentam os resultados para pH e acidez titulável, respectivamente, para os requeijões elaborados durante os 60 dias de armazenamento. Valores de acidez e pH em requeijões estão relacionados com a

vida útil devido à sua influência na estabilidade microbiológica, além de afetar as características reológicas e sensoriais do produto final.³¹

Os valores de acidez titulável, expressa em % de ácido láctico, aumentaram durante o período de armazenamento, mas não diferiram estatisticamente entre si entre os tempos analisados.

Como esperado, devido à utilização de ácido láctico em sua fabricação, os requeijões produzidos por acidificação direta (tratamentos T1, T2, T3 e T7) apresentaram uma maior acidez em comparação com os requeijões produzidos por coagulação enzimática (tratamentos T4, T5, T6 e T8).

Cunha⁸ analisando duas marcas comerciais de requeijão cremoso produzido por acidificação direta encontrou acidez titulável entre 0,50 e 0,54, valores semelhantes aos encontrados neste estudo para os tratamentos produzidos por acidificação direta (0,50 a 0,55 para o primeiro dia de armazenamento).

Verifica-se que proporcionalmente ao aumento da acidez ocorre a queda do pH dos tratamentos durante os 60 dias de armazenamento.

A diminuição do pH foi semelhante entre os tratamentos produzidos por acidificação direta, variando de 6,03 a 6,17 para o primeiro dia de armazenagem até 5,72 a 5,89 para o último dia de análise.

Silva²⁷ em análise de quatro marcas comerciais de requeijões cremosos produzidos por acidificação direta encontrou valores de pH que variaram de 6,10 a 6,20, valores próximos aos encontrados neste estudo. Drunkler⁹ obteve valor de pH de 6,2 para requeijão cremoso obtido por acidificação direta.

Entre os tratamentos produzidos por coagulação enzimática a diminuição também foi semelhante, variando de 6,57 a 6,74 para o primeiro dia de armazenagem até 6,32 a 6,50 para o último dia de análise.

Os valores de pH diminuíram significativamente ao longo do período de armazenamento. Durante o armazenamento, a diminuição da umidade, a hidrólise de polifosfatos, e as interações entre proteínas influenciam o equilíbrio iônico em queijos processados, alterando seu pH.²⁶

Os resultados dos teores de lactose durante o armazenamento dos requeijões são apresentados na Tabela 4.

É possível observar que o teor de lactose dos tratamentos adicionados de enzima (T1 a T6) é significativamente menor em comparação com os tratamentos controle (T7 e T8).

Os teores de lactose dos tratamentos produzidos por acidificação direta (T1, T2, T3 e T7) são menores do que os tratamentos produzidos por coagulação enzimática (T4, T5, T6 e T8). Esta diferença se deve a lavagem da massa durante o processamento por acidificação direta. Esta lavagem é realizada com o objetivo de diminuir a acidez da massa, e acaba reduzindo a lactose, pois há a eliminação do soro e lactose residual presente.

Os teores de lactose dos requeijões não diferiram significativamente ao longo do período de armazenamento.

A quantidade de lactose que pode ser ingerida varia de acordo com a tolerância individual. Mas em geral, os sintomas da intolerância podem ser minimizados quando a lactose é reduzida em 70%.³²

O teor de lactose do leite pasteurizado padronizado utilizado para a preparação dos requeijões foi de 4,57%. Observamos então que a redução da lactose variou no 1º dia de armazenamento entre os tratamentos de 72,42% (tratamento T4, adicionado de 0,2% de lactase) a 95,84% (tratamento T3, adicionado de 0,8% de lactase).

Alimentos para dietas com restrição a alguns monossacarídeos e/ou dissacarídeos, especialmente formulados para atender às necessidades de portadores de intolerância à sua ingestão e/ou portadores de erros inatos do metabolismo de carboidratos, podem conter no máximo 0,5g do nutriente em referência por 100g ou 100mL do produto final a ser consumido.⁵ Assim pode-se dizer que os requeijões elaborados com leite hidrolisado com 0,8% de lactase (tratamentos T3 e T6) podem ser utilizados por pessoas intolerantes à lactose. Já os tratamentos adicionados de 0,2% e 0,5% apresentaram diminuição do teor de lactose suficiente para amenizar os sintomas de intolerância em pessoas que possuem má absorção da lactose, mas não são capazes de eliminar totalmente os sintomas.

Análise microbiológica

Os resultados relativos da análise microbiológica dos requeijões elaborados são apresentados na Tabela 5. O Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Requeijão ou Requesón, Portaria/MA nº 359⁴ estabelece limites microbiológicos para o requeijão cremoso quanto a coliformes a 30 °C e 45 °C e estafilococos coagulase positiva. Não foi detectada a presença de coliformes totais e fecais nos requeijões analisados, o que indica manipulação adequada, de acordo com as boas práticas de higiene durante a fabricação. Todos os requeijões elaborados encontram-se dentro dos padrões microbiológicos exigidos pela legislação brasileira vigente.

CONCLUSÃO

A adição de 0,2%; 0,5% e 0,8% de lactase na matéria-prima utilizada na elaboração dos requeijões cremosos reduziu o teor de lactose dos tratamentos. As reduções foram maiores que 70%, portanto pode-se dizer que os requeijões cremosos formulados com a enzima lactase podem ser consumidos por pessoas que possuem má absorção da lactose.

As características físico-químicas dos requeijões adicionados de enzima lactase estão de acordo com a legislação, portanto, a adição de lactase não alterou tais características.

Os dois processos de fabricação (coagulação enzimática e acidificação direta) são adequados para produção de requeijões cremosos com a adição da enzima lactase.

Agradecimentos

Os autores agradecem Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil, pela concessão de bolsa de mestrado do primeiro autor.

MATTANNA, P.; BACK, D.; ANDRADE, D. F. RICHARDS, N. S. P. S. Development of “requeijão cremoso” with low lactose: physical-chemical and microbiological parameters.

ABSTRACT

Millions of people around the world are lactose intolerant and, therefore, has problems in consuming milk and dairy products. To be absorbed, lactose in the intestine needs to be hydrolyzed by the enzyme lactase. People with lactose intolerance do not produce lactase and therefore can not enjoy the benefits of milk and dairy products. This research aim to prepare “requeijões cremosos” by two different processes (direct acidification and enzymatic coagulation) by adding lactase enzyme and evaluate their physico-chemical and microbiological characteristics compared with control sample. Regarding physical and chemical characteristics, the “requeijões cremosos” prepared are in accordance with current law. The lactose was hydrolyzed in more than 70% for the treatments with adding of lactase enzyme, enough to relieve symptoms of intolerance in people who not well absorb lactose. The number of microorganisms found, was in range permitted by Brazilian law

KEYWORDS: “requeijão cremoso”, lactose, lactase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**. 16 ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC International, Vol. II.1997.
2. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INDÚSTRIAS DE QUEIJO (ABIQ) Produção Brasil – queijos comuns em estabelecimentos sob inspeção federal em toneladas. São Paulo, 2009. Disponível em: <http://www.abiq.com.br>. Acesso em 5 de agosto de 2010.
3. BARROS, D. L. G. **Avaliação da qualidade físico-química e análise da rotulagem de leites UHT integral, semi-desnatado e desnatado comercializados**

em Brasília-DF. 2003. Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2003.

4. BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Leite e Produtos Lácteos. **Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Requeijão Cremoso ou Requesón**. Portaria nº 359 de 04 de novembro de 1997. Brasília, 1997.

5. _____. Ministério da Saúde. **Regulamento Técnico Referente a Alimentos para Fins Especiais**. Portaria nº 29 de 13 de janeiro de 1998. Brasília, 1998.

6. _____. Ministério da Agricultura, Abastecimento e Pecuária. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água**. Instrução Normativa n. 62 de 26 de agosto de 2003, Brasília, 2003.

7. _____. Ministério da Agricultura, Abastecimento e Pecuária. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos**. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Brasília, 2006.

8. CUNHA, C. R. **Papel da gordura e do sal emulsificante em análogos de requeijão cremoso**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

9. DRUNKLER, D. A. **Produção de requeijão cremoso simbiótico**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Programa de pós-graduação em Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal do Paraná. Paraná, 2009.

10. ECK, A. **O Queijo**. Título original: Le Fromage. Coleção Euroagro, Publicações Europa-America, v. 1, 1987.
11. FERREIRA, C. L. L. F. Valor nutritivo e bioterapêutico de leites fermentados. In: LERAYER, A. L. S.; SALVA, T. J. G. **Leites fermentados e bebidas lácteas: tecnologia e mercado**. Campinas: ITAL, cap. 1, p. 1-7, 1997.
12. FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J. P. M. **Tecnologia de queijos**. São Paulo: Dipemar, 1994.
13. KARDEL, G.; ANTUNES, L. A. F. Culturas lácticas e probióticas empregadas na fabricação de leites fermentados: leites fermentados. In: LERAYER, A. L. S.; SALVA, T. J. G. **Leites fermentados e bebidas lácteas: tecnologia e mercado**. Campinas: ITAL, cap. 2, p. 26-33, 1997.
14. LUBECK, G. M. **Estudo da fabricação de requeijão cremoso como diferentes concentrações de gordura no extrato seco, sal emulsificante e concentrado protéico de soro obtido por ultrafiltração**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.
15. MANAN, D. M. A.; KARIM, A. A.; KIT, W. K. Lactose content of modified enzyme-treated 'dadih'. **Food Chem.**, n. 65, p. 439-443, 1999.
16. NORUSIS, M. SPSS 13.0: **Guide to Data Analysis**. Upper Saddle River, NJ: Prentice-Hall, 2005.
17. OLIVEIRA, J. S. **Queijos: Fundamentos Tecnológicos**. Campinas: Ícone, 1986.
18. OLIVEIRA, L. L. **Utilização de transglutaminase na fabricação de queijos frescos empregando diferentes processos de coagulação**. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2003.

19. 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.
20. ÓRDOÑEZ, J. A. P. **Tecnología de alimentos.** v. 2 – Alimentos de origem animal. Porto Alegre: Artmed, 2005.
21. PICCOLO, K. C. **Avaliação do efeito da enzima transglutaminase no processo de produção de requeijão cremoso.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos), Centro Universitário Instituto Mauá. São Caetano do Sul, 2006.
22. PROZYN. **Prozyn Lactase.** São Paulo, 2004. 4p. Informação técnica.
23. RODRIGUES, F. **Requeijão, Fondue, Especialidade, Queijo Processado.** Juiz de Fora: Do Autor, 2006.
24. SALVA, T. J. G. **Leites fermentados e bebidas lácteas: tecnologia e mercado.** Campinas: ITAL, cap. 2, p. 26-33, 1997.
25. SCOTT, R.; ROBBINSON, R. K.; WILBEY, R. A. **Fabricación de queso.** 2 ed. Zaragoza: Acribia, 2002.
26. SCHAR W.; BOSSET J. O. Chemical and Physico-chemical Changes in Processed Cheese and Ready-made Fondue During Storage. A Review **LWT- Food Sci. Technol.** vol. 35, n. 1, p. 15-20, 2002.
27. SILVA, A. T. **Fabricação de requeijão cremoso e requeijão cremoso “light” a partir de retentado de ultrafiltração acidificado por fermentação ou adição de ácido láctico.** Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

28. SOBRAL, D. **Otimização do processo de fabricação de análogos de requeijão culinário**. 2007. Dissertação (Mestrado em Tecnologia dos Alimentos) Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
29. VALSECHI, O. **Tecnologia de produtos agrícolas de origem animal: o leite e seus derivados**. Araras – SP: UFSCar, Centro de Ciências Agrárias. 36p. Apostila digitada, 2001.
30. VAN DENDER, A. G. F. Caracterização físico-química e análise de perfil de textura de amostras comerciais de requeijão cremoso e de requeijão cremoso *light*. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 58, p. 164-170, 2003.
31. VAN DENDER, A. G. F. **Requeijão cremoso e outros queijos fundidos: Tecnologia de fabricação, controle do processo e aspectos de mercado**. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora, 2006.
32. VESA T. H.; MARTEAU P.; KORPELA R. Lactose Intolerance. **J. Am. Coll. Nutr.**, vol. 19, no. 2, p. 165–175, 2000.

Tabela 1 - Análise físico-química dos requeijões cremosos com baixo teor de lactose e controles.^{a,b}

Tratamento	Gordura*	Proteína*	Cinzas*	Umidade*	EST*	GES*
T1	23,58±0,46 ^{ab}	10,84±0,73 ^b	2,38±0,14 ^{ab}	59,66±0,51 ^{bc}	40,33±0,51 ^{ab}	58,54±1,40 ^a
T2	21,82±0,11 ^{bcd}	11,58±0,45 ^{ab}	2,53±0,16 ^a	61,46±1,05 ^{ab}	38,53±1,05 ^{bc}	56,67±1,71 ^a
T3	21,27±0,72 ^{bcd}	12,81±0,2 ^a	2,48±0,17 ^a	61,46±0,72 ^{ab}	38,53±0,72 ^{bc}	55,22±2,66 ^a
T4	22,89±0,77 ^{abc}	10,61±0,24 ^b	2,28±0,07 ^{ab}	60,34±0,54 ^{bc}	39,65±0,54 ^{ab}	58,20±1,07 ^a
T5	20,68±0,56 ^{cd}	12,36±0,39 ^a	2,15±0,06 ^b	62,9±0,79 ^a	37,1±0,79 ^c	55,75±1,39 ^a
T6	24,52±0,55 ^a	10,58±1,02 ^b	2,38±0,07 ^{ab}	58,92±1,08 ^c	41,07±1,08 ^a	59,74±2,77 ^a
T7	22,78±1,8 ^{abc}	12,73±0,3 ^a	2,31±0,03 ^{ab}	60,47±0,60 ^{bc}	39,53±0,60 ^{ab}	57,63±3,97 ^a
T8	20,26±0,67 ^d	10,68±0,23 ^b	2,47±0,07 ^a	63,2±0,75 ^a	36,8±0,75 ^c	55,07±1,95 ^a

* Os valores são as médias e respectivos desvios padrões de resultados expressos em porcentagem. Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

^a Abreviaturas: EST= extrato seco total, GES= gordura no extrato seco.

^b Tratamentos: T1= requeijão cremoso produzido por acidificação direta com adição de 0,2% de enzima lactase;
T2= requeijão cremoso produzido por acidificação direta com adição de 0,5% de enzima lactase;
T3= requeijão cremoso produzido por acidificação direta com adição de 0,8% de enzima lactase;
T4= requeijão cremoso produzido por coagulação enzimática com adição de 0,2% de enzima lactase;
T5= requeijão cremoso produzido por coagulação enzimática com adição de 0,5% de enzima lactase;
T6= requeijão cremoso produzido por coagulação enzimática com adição de 0,8% de enzima lactase;
T7= requeijão cremoso produzido por acidificação direta sem adição de enzima lactase;
T8= requeijão cremoso produzido por coagulação enzimática sem adição de enzima lactase.

Tabela 2 – Valores de pH dos requeijões cremosos elaborados durante o armazenamento de 60 dias.^{a,b}

Tratamento	1ºdia	15ºdia	30ºdia	45ºdia	60ºdia
T1	6,03±0,02 ^{Ab}	5,99±0,01 ^{ABd}	5,97±0,01 ^{ABd}	5,97±0,01 ^{Bc}	5,89±0,02 ^{Cc}
T2	6,07±0,04 ^{Ab}	6,02±0,02 ^{ABd}	5,95±0,01 ^{BCd}	5,93±0,01 ^{CDc}	5,86±0,04 ^{Dcd}
T3	6,17±0,02 ^{Ab}	6,06±0,04 ^{Bd}	5,96±0,03 ^{Cd}	5,93±0,02 ^{Cc}	5,88±0,02 ^{Cc}
T4	6,57±0,02 ^{Aa}	6,47±0,03 ^{Bc}	6,46±0,02 ^{Bbc}	6,39±0,01 ^{Cb}	6,33±0,02 ^{Db}
T5	6,62±0,08 ^{Aa}	6,59±0,06 ^{Ab}	6,54±0,03 ^{Aab}	6,51±0,03 ^{ABab}	6,36±0,08 ^{Bab}
T6	6,74±0,1 ^{Aa}	6,69±0,01 ^{ABa}	6,63±0,03 ^{ABa}	6,51±0,07 ^{ABa}	6,50±0,10 ^{Ba}
T7	6,04±0,03 ^{Ab}	6,00±0,01 ^{ABd}	5,90±0,02 ^{BCd}	5,83±0,04 ^{Cc}	5,72±0,03 ^{Dd}
T8	6,58±0,07 ^{Aa}	6,53±0,04 ^{ABbc}	6,44±0,05 ^{ABc}	6,39±0,09 ^{BCb}	6,32±0,07 ^{Cb}

^aOs valores são as médias e respectivos desvios padrões de resultados expressos em porcentagem. Letras iguais (maiúsculas) na mesma linha não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras iguais (minúsculas) na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

^bTratamentos:

T1= requeijão produzido por acidificação direta com adição de 0,2% de enzima lactase;

T2= requeijão produzido por acidificação direta com adição de 0,5% de enzima lactase;

T3= requeijão produzido por acidificação direta com adição de 0,8% de enzima lactase;

T4= requeijão produzido por coagulação enzimática com adição de 0,2% de enzima lactase;

T5= requeijão produzido por coagulação enzimática com adição de 0,5% de enzima lactase;

T6= requeijão produzido por coagulação enzimática com adição de 0,8% de enzima lactase;

T7= requeijão produzido por acidificação direta sem adição de enzima lactase;

T8= requeijão cremoso produzido por coagulação enzimática sem adição de enzima lactase.

Tabela 3 – Valores de acidez em % de ácido láctico dos requeijões cremosos durante o armazenamento de 60 dias.^{a,b}

Tratamento	1ºdia	15ºdia	30ºdia	45ºdia	60ºdia
T1	0,52±0,02 ^{Aa}	0,54±0,01 ^{Aa}	0,55±0,01 ^{Aa}	0,56±0,02 ^{Aa}	0,57±0,01 ^{Aa}
T2	0,52±0,02 ^{Ba}	0,57±0,02 ^{Aa}	0,57±0,01 ^{Aa}	0,57±0,01 ^{Aa}	0,58±0,01 ^{Aa}
T3	0,50±0,02 ^{Aa}	0,53±0,02 ^{Aa}	0,54±0,01 ^{Aa}	0,55±0,01 ^{Aa}	0,56±0,01 ^{Aa}
T4	0,42±0,01 ^{Ab}	0,42±0,01 ^{Ab}	0,42±0,01 ^{Ab}	0,43±0,02 ^{Ab}	0,44±0,01 ^{Ab}
T5	0,4±0,01 ^{Ab}	0,42±0,02 ^{Ab}	0,43±0,02 ^{Ab}	0,43±0,01 ^{Ab}	0,44±0,02 ^{Ab}
T6	0,41±0,02 ^{Ab}	0,43±0,02 ^{Ab}	0,44±0,02 ^{Ab}	0,44±0,01 ^{Ab}	0,45±0,02 ^{Ab}
T7	0,55±0,02 ^{Aa}	0,55±0,03 ^{Aa}	0,56±0,02 ^{Aa}	0,57±0,02 ^{Aa}	0,57±0,02 ^{Aa}
T8	0,43±0,03 ^{Ab}	0,44±0,03 ^{Ab}	0,45±0,03 ^{Ab}	0,46±0,02 ^{Ab}	0,46±0,02 ^{Ab}

^aOs valores são as médias e respectivos desvios padrões de resultados expressos em porcentagem. Letras iguais (maiúsculas) na mesma linha não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras iguais (minúsculas) na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

^bTratamentos:

T1= requeijão produzido por acidificação direta com adição de 0,2% de enzima lactase;

T2= requeijão produzido por acidificação direta com adição de 0,5% de enzima lactase;

T3= requeijão produzido por acidificação direta com adição de 0,8% de enzima lactase;

T4= requeijão produzido por coagulação enzimática com adição de 0,2% de enzima lactase;

T5= requeijão produzido por coagulação enzimática com adição de 0,5% de enzima lactase;

T6= requeijão produzido por coagulação enzimática com adição de 0,8% de enzima lactase;

T7= requeijão produzido por acidificação direta sem adição de enzima lactase;

T8= requeijão cremoso produzido por coagulação enzimática sem adição de enzima lactase.

Tabela 4 – Teores de lactose dos requeijões cremosos durante o armazenamento de 60 dias.^{a,b}

Tratamento	1ºdia	15ºdia	30ºdia	45ºdia	60ºdia
T1	1,04±0,04 ^{AcD}	1,02±0,06 ^{AcD}	1,03±0,06 ^{AcD}	1,02±0,06 ^{AcD}	1,01±0,07 ^{Ac}
T2	0,82±0,04 ^{Ad}	0,80±0,03 ^{Ade}	0,79±0,03 ^{Ad}	0,78±0,02 ^{Ad}	0,77±0,02 ^{Ad}
T3	0,19±0,01 ^{Ae}	0,18±0,01 ^{Af}	0,17±0,02 ^{Ae}	0,17±0,02 ^{Ae}	0,16±0,02 ^{Af}
T4	1,26±0,04 ^{Ac}	1,23±0,03 ^{Ac}	1,22±0,02 ^{Ac}	1,16±0,06 ^{Ac}	1,13±0,07 ^{Abc}
T5	1,20±0,1 ^{AcD}	1,13±0,05 ^{AcD}	1,11±0,03 ^{Ac}	1,06±0,04 ^{AcD}	1,04±0,03 ^{Ac}
T6	0,4±0,02 ^{Ae}	0,41±0,02 ^{Aef}	0,40±0,02 ^{Ae}	0,39±0,02 ^{Ae}	0,38±0,02 ^{Ae}
T7	2,42±0,35 ^{Ab}	2,37±0,37 ^{Ab}	2,39±0,20 ^{Ab}	2,32±0,29 ^{Ab}	2,30±0,27 ^{Ab}
T8	2,94±0,07 ^{Aa}	2,91±0,05 ^{Aa}	2,89±0,06 ^{Aa}	2,87±0,02 ^{Aa}	2,85±0,05 ^{Aa}

^aOs valores são as médias e respectivos desvios padrões de resultados expressos em porcentagem. Letras iguais (maiúsculas) na mesma linha não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras iguais (minúsculas) na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

^bTratamentos:

T1= requeijão produzido por acidificação direta com adição de 0,2% de enzima lactase;

T2= requeijão produzido por acidificação direta com adição de 0,5% de enzima lactase;

T3= requeijão produzido por acidificação direta com adição de 0,8% de enzima lactase;

T4= requeijão produzido por coagulação enzimática com adição de 0,2% de enzima lactase;

T5= requeijão produzido por coagulação enzimática com adição de 0,5% de enzima lactase;

T6= requeijão produzido por coagulação enzimática com adição de 0,8% de enzima lactase;

T7= requeijão produzido por acidificação direta sem adição de enzima lactase;

T8= requeijão cremoso produzido por coagulação enzimática sem adição de enzima lactase.

Tabela 5 - Resultados das Contagem de Coliformes a 30 e 45 °C e Estafilococos Coagulase Positiva nos requeijões cremosos (Valores médios – duas repetições).^a

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
Coliformes a 30° e 45° C UFC.mL ⁻¹	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
Estafilococos coagulase positiva UFC.mL ⁻¹	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0

^aTratamentos:

T1= requeijão produzido por acidificação direta com adição de 0,2% de enzima lactase;

T2= requeijão produzido por acidificação direta com adição de 0,5% de enzima lactase;

T3= requeijão produzido por acidificação direta com adição de 0,8% de enzima lactase;

T4= requeijão produzido por coagulação enzimática com adição de 0,2% de enzima lactase;

T5= requeijão produzido por coagulação enzimática com adição de 0,5% de enzima lactase;

T6= requeijão produzido por coagulação enzimática com adição de 0,8% de enzima lactase;

T7= requeijão produzido por acidificação direta sem adição de enzima lactase;

T8= requeijão cremoso produzido por coagulação enzimática sem adição de enzima lactase.

3.2 Manuscrito 2

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

Dairy Journal

(Configuração conforme as normas da Revista – Anexo D)

Parâmetros tecnológicos e sensoriais de requeijões cremosos com baixo teor de lactose*

Paula Mattanna*

**Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de*

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

Resumo

Estima-se que mais de a metade da população mundial tem problemas em consumir o leite e seus derivados por apresentar algum grau de intolerância a lactose. O objetivo deste trabalho foi avaliar a aceitabilidade sensorial, perfil de textura e perfil lipídico de requeijões cremosos com baixo teor de lactose produzidos por dois diferentes processos (acidificação direta e coagulação enzimática) a partir de leites adicionados de enzima lactase em comparação com requeijões controle. Na análise do perfil de textura apenas os parâmetros firmeza e elasticidade diferiram significativamente ($p < 0,05$) durante o período de armazenamento (60 dias). No perfil lipídico dos requeijões, o total de ácidos graxos saturados variou 62,76% a 64,70%, enquanto o total de insaturados variou de 34,36% a 38,36%. Os requeijões foram aceitos sensorialmente, não sendo detectada diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

1. Introdução

Por oferecer uma equilibrada composição de nutrientes que resulta em elevado valor biológico, o leite é considerado um dos mais completos alimentos (Tronco, 2003).

Estima-se que cerca da metade da população mundial não pode desfrutar dos benefícios do leite e de seus derivados devido a algum grau de intolerância a lactose (Vesa et al., 2000).

A intolerância a lactose é a incapacidade de digerir a lactose em seus componentes, glicose e galactose, devido a baixos níveis de enzima lactase.

Devido a essa incapacidade, a lactose não digerida continua dentro do intestino e chega ao intestino grosso, onde é fermentada por bactérias, produzindo ácido láctico e gases. A presença de lactose e destes compostos nas fezes no intestino grosso aumenta a pressão osmótica, causando diarreia ácida e gasosa, flatulência, cólicas e aumento do volume abdominal (Rusnyk & Still, 2001).

A aplicação da enzima lactase para realizar a hidrólise enzimática da lactose em produtos lácteos tem recebido muita atenção. Em particular, estudos clínicos têm mostrado que as pessoas que sofrem de intolerância à lactose podem consumir produtos lácteos hidrolisados com uma redução considerável dos sintomas desagradáveis (Bakken, 1992; Ferronato et al., 2004).

O requeijão cremoso é um tipo de queijo classificado como processado pasteurizado. O princípio de fabricação destes queijos consiste em fundir os dois elementos principais do queijo, a gordura e a proteína, com a adição de sais fundentes, sob agitação e calor.

Os queijos processados, como é o caso particular do requeijão cremoso, consistem em um sistema complexo composto por proteínas, gordura, água, sais minerais e sais emulsificantes, sendo que suas principais características de textura são: firmeza, elasticidade, coesividade e espalhabilidade. Nestes produtos a textura é uma propriedade que exerce um papel fundamental na qualidade do produto final (Van Dender, 2006).

Dentre os diferentes nutrientes que compõem o queijo, a gordura desempenha um papel importante na sua qualidade sensorial e nutricional. Além da quantidade de gordura total, a composição de ácidos graxos é essencial. A textura dos queijos depende diretamente do grau de insaturação da gordura, um maior grau de insaturação leva a uma textura mais suave (Bugaud et al., 2001). Do ponto de vista nutricional, o alto teor de ácidos graxos saturados é um fator limitante para o seu consumo (Zock, 2006). Por outro lado, a gordura dos queijos possui ácidos graxos minoritários, tal como o ácido linoléico conjugado (CLA), que poderia promover favoravelmente a saúde humana (Yaqoob & Tricon, 2006).

O presente estudo teve como objetivo avaliar durante 60 dias a 8 °C o perfil de textura, perfil lipídico e características sensoriais de requeijões cremosos produzidos por diferentes processos de fabricação (acidificação direta e coagulação enzimática) a partir de leites adicionados de diferentes concentrações de enzima lactase (0,2, 0,5 e 0,8%)

2. Materiais e Métodos

2.1 Elaboração dos requeijões cremosos

Foram preparadas oito tratamentos de requeijões cremosos produzidos por diferentes processos utilizando leites com diferentes concentrações de enzima lactase (Tabela 1).

Para cada tratamento, foram utilizados oito litros de leite pasteurizado padronizado em 3% de gordura (Piá®, Cooperativa Agropecuária Petrópolis LTDA, Nova Petrópolis, RS). Cada alíquota de oito litros de leite foi adicionada de diferentes concentrações de enzima lactase. Os tratamentos T1 e T4 foram adicionados de 0,2%, T2 e T5 de 0,5% e T3 e T6 de 0,8% de enzima lactase.

Todos os frascos foram acondicionados em temperatura controlada (8 °C) por 12 horas, para sofrerem hidrólise da lactose. Após esse período os leites passaram pelo processo de aquecimento (92 °C por 3 minutos) para inativação da enzima lactase.

Os tratamentos T1, T2, T3 e T7 foram preparados por acidificação direta a quente, segundo metodologia adaptada de Van Dender (2006). Os leites foram aquecidos a 82 °C e então adicionados de 0,3% de ácido láctico (solução aquosa, Pantec® Tecnologia, São Paulo, SP). Após a adição do ácido láctico, o leite permaneceu em repouso por 10 minutos. O soro foi retirado e efetuou-se a lavagem da massa com água gelada (5 °C) por três vezes. Em seguida foi feita a drenagem da coalhada em dessorador de queijos e mantida em refrigeração a 8 °C por aproximadamente 8 horas.

Os tratamentos T4, T5, T6 e T8 foram preparados por coagulação enzimática, segundo metodologia adaptada de Rodrigues (2006). Os leites foram aquecidos a 35°C e então adicionados de 0,8mL/L de coalho líquido comercial (Ha-La®, Chr. Hansen, Valinhos, SP). Após 40 minutos de coagulação foi realizado o corte, seguido de descanso por 10 minutos. Após a eliminação do soro a coalhada foi

drenada em dessorador de queijos e mantida em refrigeração a 8 °C por aproximadamente 8 horas.

Após a obtenção das massas, todos os tratamentos seguiram o mesmo processo de fabricação, segundo Van Dender (2006).

As massas, juntamente com 0,8% de sal fundente (JOHA S9, BKG Rotem Química do Brasil, São Paulo, SP), 1,2% de cloreto de sódio (Salazir®, Porto Alegre, RS) e 20% de soro de leite líquido deslactosado (proveniente da coagulação dos leites) foram aquecidas até 85 °C. Após, a mistura foi acrescida de 20% de manteiga sem sal (Batavo®, Brasil Foods, São Paulo, SP) e 0,03% de conservante sorbato de potássio (Dyne®, Rio de Janeiro, RJ). O processo de fusão ocorreu a 85 °C por 8 minutos, a mistura foi então homogeneizada por 3 minutos em processador (Efficace MPR850, Cadence).

Os requeijões foram embalados em potes identificados e mantidos sob temperatura de refrigeração durante o período das análises (60 dias).

2.2 Análise do perfil de textura

A determinação do perfil de textura foi realizada segundo adaptações das metodologias descritas por Van Dender (2005) e Rapacci (1997). Foi utilizado texturômetro TA.XTplus / 50 Stable Micro Systems (Haslemere, Reino Unido). Os dados foram coletados pelo Software Texture Exponent 32 (Stable Micro Systems). O probe utilizado foi o de acrílico cilíndrico com extremidade plana e raio com 36 mm de diâmetro (P36). A velocidade pré-teste, teste e pós-teste foi de 2,0 mm. A força empregada foi de 5g por uma distância de 10 mm, durante 5 segundos. Foram

analisados os parâmetros do perfil de textura: firmeza, adesividade, elasticidade e coesividade.

As amostras foram analisadas em cápsulas de alumínio de 5,0 cm de diâmetro interno e 2,6 cm de altura. As amostras permaneceram em temperatura de refrigeração controlada (8 °C) e foram retiradas uma a uma imediatamente antes da realização do teste.

Os tratamentos foram analisados no 4^o dia (tempo inicial) e ao final dos 60 dias de armazenamento (tempo final).

2.3 Análise do perfil lipídico

Para a determinação do perfil lipídico dos requeijões utilizou-se o método de Bligh & Dyer (1959) para a extração dos lipídios das amostras. Posteriormente os lipídios foram esterificados segundo método de Hartman & Lago (1973).

Os ésteres formados foram então analisados através de cromatógrafo a gás Agilent Technologies, série 6890N, equipado com coluna capilar (Supelco, Sigma-Aldrich) de sílica fundida (100m de comprimento x 0,25mm diâmetro interno x 0,2 µm de espessura do filme) e detector por ionização de chama (FID). A coluna foi aquecida a 35 °C por 2 minutos, aumentou-se 10 °C por minuto até atingir 150 °C, permanecendo por 2 minutos, após aumentou-se 2 °C por minuto até atingir 200 °C, permanecendo por 2 minutos e novamente aumentou-se 2 °C por minuto até atingir 220 °C, permanecendo por 21 minutos, totalizando a corrida em 73,5 minutos. Nitrogênio foi usado como gás de arraste a 0,9 mL min⁻¹. O volume de amostra injetada (modo split) foi de 1µL. A temperatura usada para o detector (FID) foi de 280 °C. Os ácidos graxos foram identificados por comparação com os tempos de retenção de padrões de referência (Supelco 37 FAME Mix, Sigma, Bellefonte, EUA).

Para a determinação do Ácido linoléico conjugado (CLA) foi utilizado padrão composto por uma mistura de isômeros (9-cis, 11-trans e 10-trans, 12-cis) de metil-ésteres do ácido octadecadienóico (C18:2) (Supelco, Sigma, Bellefonte, EUA). Os tempos de retenção e as áreas foram computados automaticamente pelo software GC Solution. As análises do perfil lipídico dos requeijões foram realizadas no 10º dia de armazenamento.

2.4 Análise sensorial

A análise sensorial visando a avaliação da aceitabilidade pelos consumidores dos requeijões desenvolvidos foi realizada utilizando-se o método afetivo de aceitação segundo Dutcosky (2007).

Foram realizadas duas sessões sensoriais no 5º dia de armazenamento dos requeijões. Na primeira sessão foram analisados os requeijões produzidos por acidificação direta (tratamentos T1, T2, T3 e T7) e na segunda sessão analisados os requeijões produzidos por coagulação enzimática (tratamentos T4, T5, T6 e T8).

As amostras foram apresentadas com código de três dígitos. Foi empregada escala hedônica de 7 níveis (1- desgostei muitíssimo, 4-indiferente, 7- gostei muitíssimo), onde os atributos analisados foram aparência, sabor, textura e aroma.

Os testes contaram com um grupo de 50 painelistas, com faixa etária entre 18 e 65 anos das classes sociais A, B e C. A análise sensorial foi realizada após aprovação pelo Comitê de Ética em pesquisa da UFSM, sob o processo nº 23081.016423/2009-31.

2.5 Análise estatística

Os dados do estudo foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas entre si através do teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro. Os resultados foram analisados através do programa SPSS 13.0 (Norusis, 2005), utilizando o delineamento de blocos inteiramente casualizados.

3. Resultados e discussão

3.1 Perfil de textura

Os resultados obtidos na avaliação instrumental da textura nos dias 4 e 60 de fabricação dos requeijões cremosos são apresentados na Tabela 2.

Podem-se observar diferenças estatísticas entres os tratamentos para os parâmetros firmeza, elasticidade e adesividade. Segundo Fox et al. (2000) vários são os fatores que podem influenciar a textura de queijos processados, dentre eles composição (umidade e extrato seco desengordurado), pH, tipo e concentração de sal emulsificante e parâmetros de processamento, incluindo tempo, temperatura e velocidade de agitação. As variações na composição e pH entre os tratamentos (dados não mostrados) podem ter gerado estas diferenças, mas de maneira geral os resultados são similares, não apresentando influência da quebra da lactose na textura dos requeijões fabricados.

Ao longo do período de estocagem, a firmeza e a elasticidade dos requeijões são significativamente menores em 60 dias que em 4 dias de estocagem. Os demais atributos de textura de cada requeijão não diferem significativamente ao longo do tempo de estocagem de 60 dias, ao nível de 5% de significância.

A proteólise que ocorre durante o armazenamento dos queijos resulta em modificações na textura deste produto, devido à quebra na sua matriz protéica (Fox et al., 2000). Assim, a proteólise está relacionada com o decréscimo nos valores dos parâmetros de textura, entre eles a firmeza e a elasticidade (Tunick et al., 1997).

3.2 Perfil lipídico

A gorduras do leite contêm uma ampla variedade de ácidos graxos (Collins et al. 2003). Esta situação se reflete nos produtos lácteos. A gordura do leite de vaca contém cerca de 70% ácidos graxos saturados, 25% de ácidos graxos monoinsaturados, e 5% de ácidos graxos poliinsaturados (Grummer, 1991).

A composição de ácidos graxos de todos os tratamentos foi bastante semelhante (Tabela 3). O total de ácidos graxos saturados dos tratamentos variou de 62,76% a 64,70%. Kinik et al. (2005) analisando o perfil de ácidos graxos de queijos turcos encontraram um total de ácidos graxos saturados entre 69,32% a 73,32%. O total de ácidos graxos insaturados variou de 34,36% a 36,36%, sendo o ácido oléico o maior representante com teores que variaram de 24,59% a 25,27%.

Bobbio & Bobbio (2003), relatam a seguinte composição para a gordura do leite e dos produtos lácteos: 20 a 30% de ácido oléico; 20 a 30% de ácido palmítico; 10 a 15% de ácido esteárico e, exclusivamente, o ácido butírico, em quantidades que podem chegar até 15%. Os valores encontrados para os requeijões estão dentro destes valores.

O leite e derivados possuem alto conteúdo de gorduras saturadas, no entanto, as gorduras oriundas de derivados lácteos também são importantes fontes ácido linoléico conjugado (CLA) (Shortt & O'brien, 2004).

Em estudo realizado por Jahreis et al. (1999) o teor de CLA no leite de vaca variou de 0,6% (durante o inverno) a 1,2% (durante o verão).

Diversos estudos comprovaram a potente atividade anticarcinogênica deste ácido graxo, além de atuar como antioxidante, redutor do peso corporal e como agente anti-aterosclerose, entre outras propriedades fisiológicas (Sieber et al., 2004; Luna et al., 2007).

O teor de CLA dos tratamentos variou de 0,88% a 1,15%. Os queijos são reconhecidos como os derivados lácteos com maior concentração de CLA (Van Nieuwenhove et al., 2007). Esta concentração dependente da quantidade original de CLA no leite e das condições de processamento (Kim et al., 2009).

3.3 Análise sensorial

Através das médias das notas de cada atributo sensorial dos requeijões cremosos produzidos (Tabela 4), não foi detectada diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para os parâmetros aparência, sabor, textura e aroma (Tabela). Observa-se que os requeijões obtiveram boa aceitação sensorial, sendo os requeijões produzidos pelos dois diferentes processos de fabricação igualmente aceitos pelos julgadores.

A lactose é um açúcar de fraco poder adoçante, sendo que a quebra da molécula de lactose em glicose e galactose atribui ao leite um sabor mais doce (Vesa et al., 2000). Este sabor mais doce do leite foi amenizado na produção dos requeijões devido a adição de sais fundentes e sal comum, sendo assim, os julgadores aceitaram igualmente os requeijões elaborados com leites adicionados de enzima e os requeijões controles.

4. Conclusões

Apesar das diferenças detectadas no perfil de textura para os parâmetros firmeza e elasticidade, no período de armazenagem das amostras, os resultados são aceitáveis para este produto.

Foram determinadas as concentrações de CLA dos tratamentos, ácido graxo que possui importantes propriedades fisiológicas.

A adição de diferentes concentrações de enzima lactase de modo geral não influenciou na percepção sensorial dos julgadores, sendo as médias das notas intermediárias entre os termos hedônicos “gostei” e “gostei muito” para todos os parâmetros e estatisticamente iguais aos tratamentos-controle.

Assim, demonstra-se a viabilidade da adição da enzima lactase na elaboração de requeijões cremosos com baixo teor de lactose, sem que esta adição afete a aceitabilidade do consumidor pelo produto.

Agradecimentos

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

Referências

- Bakken, A. B.; Hill, C. G. Jr.; Amundson, C. A., 1992. Hydrolysis of lactose in skim milk by immobilized β -galactosidase (*Bacillus circulance*). *Biotechnology and Bioengineering* 39, 409-417.
- Bligh, E.G.; Dyer, W. J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal Biochemistry Physiology* 27, 911-917.
- Bobbio, P. A.; Bobbio, F. O., 2003. *Introdução a química de alimentos*. 3 ed. São Paulo: Varela, 238 p.
- Bugaud, C.; Buchin, S.; Noe I, Y.; Teissier, L.; Pochet, S.; Martin, B., 2001. Relationships between Abondance cheese texture, its composition and that of milk produced by cows grazing different types of pastures. *Lait*, 81, 593–607.
- Collins, Y. F.; Mcsweeney, P. L. H.; Wilkinson, M.G., 2003. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal* 13, 841–866.
- Dutcoski, S. D., 2007. *Análise sensorial de alimentos*. 2. ed. rev. e ampl. Curitiba: Champagnat, 239 p.
- Ferronato, D. D. Z.; Farinã, L. O.; Jorge, A. S.; Costa, M. C. D., 2004. *Avaliação dos teores de lactose em iogurtes e leites fermentados produzidos no Paraná como subsídio para orientação nutricional de pacientes com intolerância à lactose*. In: XXI CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 2004, Juiz de Fora. Anais. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 156-159.
- Fox, P. F.; Guinee, T. P.; Cogan, T. M.; Mcsweeney, P. L. H., 2000. *Fundamentals of cheese science*. USA: Aspen Publications, 587p.

- Grummer, R. R., 1991. Effect of feed on the composition of milk fat. *Journal of Dairy Science* 74, 3244–3257.
- Hartman, L.; Lago, R. C. A., 1973. Rapid preparation of fatty acids methyl esters. *Laboratory Practices*. London, v. 22, p. 475–476.
- Jahreis G.; Fritsche J.; Möckel P.; Schöne F.; Möller U.; Steinhart H., 1999. The potential anticarcinogenic conjugated linoleic acid, cis-9,trans-11 C18:2, in milk of different species: cow, goat, sow, mare, woman. *Nutrition Research* 19, 1541–1549.
- Kim, J. H.; Kwon, O.; Choi, N.; Oh, S. J.; Jeongman-Kang, H.; Jeong, S. I.; Kim, Y. J., 2009. Variations in Conjugated Linoleic Acid (CLA) Content of Processed Cheese by Lactation Time, Feeding Regimen, and Ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 3235–3239.
- Kinik, O.; Gursoy, O.; Seckin, A. K., 2005. Cholesterol content and fatty acid composition of most consumed Turkish hard and soft cheeses. *Czech Journal of Food Sciences* 23, 166–172.
- Luna, P.; Juárez, M.; De La Fuente, M. A., 2007. Conjugated linoleic acid content and isomer distribution during ripening in three varieties of cheese protected with designation of origin. *Food Chemistry* 103, 1465-1472.
- Norusis, M., 2005. *SPSS 13.0: Guide to Data Analysis*. Upper Saddle River, NJ: Prentice-Hall.
- Rappaci, M., 1997. *Estudo comparativo das características físicas e químicas, reológicas e sensoriais do requeijão cremoso obtido por fermentação láctica e acidificação direta*. Campinas, 144p. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- Rodrigues, F., 2006. *Requeijão, Fondue, Especialidade, Queijo Processado*. Juiz de Fora: Do Autor.

- Rusnyk, R.; Still, A., 2001. "Lactose Intolerance." *Journal of the American Osteopathic Association* 101.
- Shortt, C.; O'Brien, J., 2004. *Handbook of functional dairy products*. Washington: CRC Press, 294p.
- Sieber, R.; Collomb, M.; Aeschlimann, P.; Jelen, H.; 2004. Impact of microbial cultures on conjugated linoleic acid in dairy products – a review. *International Dairy Journal* 14, 1-15.
- Tronco, V. M., 2003. *Manual para inspeção da qualidade do leite*. Santa Maria: Ed. da UFSM, 3ª ed.
- Tunick, M. H.; Cooke, P. H.; Malin, E. L.; Smith, P. W.; Holsinger, V. H., 1997. Reorganization of casein Submicelles in Mozzarella cheese during storage. *International Dairy Journal* 7, 149-155.
- Van Dender, A. G. F., 2006. *Requeijão cremoso e outros queijos fundidos: Tecnologia de fabricação, controle do processo e aspectos de mercado*. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora.
- Van Dender, A. G. F.; Trevisan Jr. N.; Yotsuyanagi, K.; Anjos, V. D. A., 2005. Variação nos parâmetros obtidos na análise do perfil de textura (TPA) em queijos processados com o tipo de recipiente utilizado para conter a amostra. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes* 60, 393-397.
- Van Nieuwenhove, C. P.; Oliszewskia, R.; González, N; S.; Chaia, A. B. P. 2007. Influence of bacteria used as adjunct culture and sunflower oil addition on conjugated linoleic acid content in buffalo cheese. *Food Research International* 40, 559-564.
- Vesa, T. H.; Marteau, P.; Korpela, R., 2000. Lactose Intolerance. *Journal of the American College of Nutrition* 19, 165–175.

Yaqoob, P.; Tricon, S., 2006. *Conjugated linoleic acids (CLAs) and health*. In C. Williams, & J. Buttriss (Eds.), *Improving fat content of foods* (pp. 182–212). Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited.

Zock, P. L., 2006. *Health problems associated with saturated and trans fatty acids intake*. In C. Williams, & J. Buttriss (Eds.), *Part 1. Dietary fat and health. Improving fat content of foods* (pp. 3–24). Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited.

Tabela 1: Composição dos diferentes tratamentos dos requeijões cremosos quanto a concentração de enzima lactase e o processo de fabricação.

Tratamento	Concentração de enzima (%)	Coagulação
T1	0,2	Acidificação direta
T2	0,5	Acidificação direta
T3	0,8	Acidificação direta
T4	0,2	Coagulação enzimática
T5	0,5	Coagulação enzimática
T6	0,8	Coagulação enzimática
T7 (controle)	–	Acidificação direta
T8 (controle)	–	Coagulação enzimática

Tabela 2: Médias da avaliação dos parâmetros de textura instrumental no 4º e 60º dia de armazenamento dos requeijões cremosos.

Tratamento	Firmeza (g) (4º dia)	Adesividade* (4º dia)	Elasticidade (4º dia)	Coabilidade (4º dia)	Firmeza (g) (60º dia)	Adesividade* (60º dia)	Elasticidade (60º dia)	Coabilidade (60º dia)
T1	57,66±1,06 ^{Af}	209,16±6,14 ^{Ad}	0,946±0,007 ^{Abc}	0,852±0,03 ^{Aa}	51,01±1,40 ^{Bf}	206,01±2,40 ^{Ad}	0,926±0,001 ^{Bbc}	0,816±0,06 ^{Aa}
T2	67,63±0,58 ^{Ac}	368,30±11,00 ^{Ab}	0,934±0,004 ^{Ac}	0,813±0,02 ^{Aa}	63,03±2,63 ^{Bc}	361,50±3,59 ^{Ab}	0,919±0,001 ^{Bc}	0,793±0,05 ^{Aa}
T3	53,13±0,88 ^{Ag}	258,83±10,26 ^{Ac}	0,961±0,01 ^{Ab}	0,796±0,02 ^{Aa}	50,23±1,15 ^{Bf}	255,43±14,90 ^{Ac}	0,934±0,004 ^{Bb}	0,792±0,02 ^{Aa}
T4	61,46±1,23 ^{Ae}	404,81±9,22 ^{Aa}	0,994±0,002 ^{Aa}	0,753±0,03 ^{Aa}	57,16±2,00 ^{Be}	401,40±12,79 ^{Aa}	0,978±0,002 ^{Ba}	0,726±0,02 ^{Aa}
T5	83,46±0,66 ^{Aa}	361,80±26,97 ^{Ab}	0,993±0,003 ^{Aa}	0,853±0,04 ^{Aa}	77,01±2,00 ^{Ba}	357,60±20,80 ^{Ab}	0,972±0,005 ^{Ba}	0,844±0,02 ^{Aa}
T6	64,63±1,76 ^{Ad}	411,43±10,77 ^{Aa}	0,991±0,003 ^{Aa}	0,783±0,06 ^{Aa}	59,96±1,26 ^{Bd}	409,86±10,79 ^{Aa}	0,977±0,002 ^{Ba}	0,753±0,07 ^{Aa}
T7	72,96±0,56 ^{Ab}	267,83±9,52 ^{Ac}	0,947±0,01 ^{Abc}	0,822±0,06 ^{Aa}	68,90±1,41 ^{Bb}	262,86±14,28 ^{Ac}	0,917±0,006 ^{Bc}	0,786±0,12 ^{Aa}
T8	59,05±1,00 ^{Af}	212,46±10,80 ^{Ad}	0,987±0,004 ^{Aa}	0,773±0,05 ^{Aa}	56,06±1,01 ^{Be}	207,06±5,78 ^{Ad}	0,968±0,003 ^{Ba}	0,736±0,03 ^{Aa}

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

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

*Valores negativos (expressos em g.s).

Tabela 3: Perfil de ácidos graxos e CLA expressos em porcentagem (%) em requeijões cremosos.^{a,b}

Ácido Graxo	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
C6	0,73±0,17 ^a	0,72±0,07 ^a	0,64±0,04 ^a	0,68±0,11 ^a	0,66±0,12 ^a	0,68±0,07 ^a	0,72±0,15 ^a	0,67±0,10 ^a
C8	0,54±0,04 ^a	0,52±0,02 ^a	0,47±0,02 ^a	0,60±0,15 ^a	0,49±0,07 ^a	0,41±0,11 ^a	0,47±0,07 ^a	0,48±0,07 ^a
C10	1,39±0,04 ^a	1,48±0,0 ^a	1,62±0,04 ^a	1,46±0,15 ^a	1,53±0,03 ^a	1,56±0,14 ^a	1,53±0,09 ^a	1,34±0,12 ^a
C12	2,16±0,18 ^a	2,37±0,07 ^a	2,16±0,05 ^a	2,27±0,06 ^a	2,44±0,06 ^a	2,18±0,10 ^a	2,20±0,17 ^a	2,24±0,12 ^a
C14	10,83±0,61 ^a	10,59±0,35 ^a	11,12±0,09 ^a	11,22±0,07 ^a	10,98±0,35 ^a	10,89±0,34 ^a	10,81±0,71 ^a	11,12±0,11 ^a
C15	1,10±0,02 ^a	1,20±0,07 ^a	1,26±0,06 ^a	1,17±0,09 ^a	1,13±0,09 ^a	1,23±0,11 ^a	1,11±0,10 ^a	1,14±0,05 ^a
C16	28,22±0,20 ^{bc}	28,70±0,36 ^{ab}	29,50±0,40 ^a	28,33±0,15 ^{ab}	28,36±0,60 ^{ab}	29,16±0,70 ^{ab}	27,13±0,72 ^c	28,53±0,35 ^{ab}
C16:1	1,26±0,05 ^{ab}	1,31±0,07 ^{ab}	1,36±0,20 ^{ab}	1,31±0,11 ^{ab}	1,06±0,11 ^b	1,21±0,07 ^{ab}	1,44±0,05 ^a	1,29±0,10 ^{ab}
C18	14,53±0,37 ^a	15,36±0,47 ^a	14,25±0,25 ^a	14,87±0,91 ^a	15,03±0,96 ^a	14,51±0,27 ^a	15,25±0,67 ^a	14,73±0,69 ^a
C18:1t11	3,65±0,12 ^a	3,46±0,10 ^a	3,80±0,04 ^a	3,78±0,03 ^a	3,39±0,16 ^a	3,73±0,07 ^a	3,41±0,29 ^a	3,45±0,22 ^a
C18:1n9C	24,59±0,34 ^a	24,87±0,09 ^a	24,97±0,25 ^a	24,92±0,64 ^a	25,11±0,34 ^a	24,63±0,60 ^a	25,27±0,89 ^a	25,08±0,18 ^a
C18:2n6C	1,45±0,06 ^a	1,39±0,14 ^a	1,15±0,05 ^a	1,28±0,16 ^a	1,23±0,11 ^a	1,25±0,21 ^a	1,17±0,03 ^a	1,36±0,15 ^a
C18:3n3	0,75±0,11 ^{ab}	0,71±0,11 ^{ab}	0,47±0,07 ^{ab}	0,72±0,16 ^{ab}	0,64±0,16 ^{ab}	0,43±0,12 ^b	0,79±0,07 ^a	0,63±0,09 ^{ab}
CLA total	1,07±0,03 ^{ab}	1,12±0,09 ^a	0,88±0,03 ^b	1,11±0,02 ^a	1,07±0,04 ^{ab}	1,11±0,08 ^a	1,15±0,09 ^a	1,03±0,11 ^{ab}
AGS	63,13±0,65 ^{cd}	64,23±0,35 ^{abc}	64,70±0,60 ^a	62,76±0,25 ^d	63,23±0,49 ^{bcd}	64,40±0,36 ^{ab}	64,50±0,10 ^a	62,80±0,10 ^d
AGMI	30,63±0,77 ^a	30,14±1,09 ^a	30,86±0,80 ^a	31,56±0,40 ^a	31,50±0,45 ^a	30,46±0,25 ^a	29,90±0,10 ^a	31,33±0,15 ^a
AGPI	5,36±0,51 ^a	4,56±0,50 ^a	4,36±0,37 ^a	4,80±0,30 ^a	4,53±0,47 ^a	5,13±0,20 ^a	4,46±0,30 ^a	4,93±0,15 ^a

^aOs valores são as médias ± DP. Letras iguais não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey (p<0,05).

^bAbreviaturas: AGS= Σácidos graxos saturados; AGMI= Σácidos graxos monoinsaturados; AGPI= Σácidos graxos poliinsaturados; CLA= ácido linoléico conjugado.

Tabela 4: Média das notas atribuídas para os parâmetros de aparência, sabor, textura e aroma, pelo teste afetivo de aceitação, para requeijões cremosos produzidos com diferentes concentrações de enzima lactase.*

Tratamentos	Aparência	Sabor	Textura	Aroma
T1	5,75 ^a	5,82 ^a	5,73 ^a	5,45 ^a
T2	5,68 ^a	5,84 ^a	5,68 ^a	5,68 ^a
T3	5,72 ^a	5,78 ^a	5,65 ^a	5,55 ^a
T4	5,81 ^a	5,73 ^a	5,76 ^a	5,42 ^a
T5	5,80 ^a	5,74 ^a	5,62 ^a	5,53 ^a
T6	5,75 ^a	5,80 ^a	5,71 ^a	5,57 ^a
T7	5,72 ^a	5,69 ^a	5,70 ^a	5,47 ^a
T8	5,74 ^a	5,75 ^a	5,62 ^a	5,43 ^a
DP**	1,0289	1,1035	1,0956	1,0865

* Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$)

** Desvio Padrão.

4 DISCUSSÃO GERAL

A deficiência da enzima beta-galactosidase (lactase) no organismo é considerada uma desordem genética muito comum entre a população mundial.

As pessoas com intolerância à lactose dependem de uma dieta diferenciada para não sofrerem dos sintomas decorrentes da ausência da enzima lactase no organismo.

Por oferecer uma equilibrada composição de nutrientes que resulta em elevado valor biológico, o leite é considerado um dos mais completos alimentos, sendo assim os intolerantes a lactose devem privar-se do consumo deste alimento e seus derivados.

Com base no exposto acima, ressalta-se a importância de se desenvolver produtos lácteos com baixo teor de lactose, assim desenvolveu-se o presente trabalho com o objetivo de produção de requeijão cremoso com baixo teor de lactose.

A utilização da enzima lactase no leite, matéria-prima dos requeijões, durante doze horas, foi eficaz na hidrólise da lactose. Houve coerência nos resultados encontrados em relação aos diferentes teores de lactase utilizados, ou seja, nas mesmas condições de tempo e temperatura, quanto maior a concentração da enzima utilizada, maior foi a hidrólise obtida.

Os tratamentos adicionados de lactase apresentaram baixos teores de lactose estando de acordo com os padrões regulamentados pela legislação de alimentos para fins especiais, podendo assim, ser utilizados por intolerantes à lactose.

Os requeijões elaborados foram aceitos sensorialmente pelos provadores, viabilizando seu desenvolvimento pelos laticínios.

Na análise das características físico-químicas dos requeijões produzidos, concluí-se que encontram-se dentro dos padrões exigidos pela legislação brasileira vigente. Os parâmetros físico-químicos, em geral, estão de acordo com a bibliografia consultada.

Os dois processos de fabricação (acidificação direta e coagulação enzimática) mostraram-se eficientes para a produção de requeijões cremosos com baixo teor de lactose, sendo igualmente aceitos pelos provadores.

Os requeijões desenvolvidos estão de acordo com a legislação brasileira vigente quanto aos critérios microbiológicos.

5 CONCLUSÃO

- A enzima lactase utilizada na matéria-prima dos requeijões reduziu eficientemente o teor de lactose dos tratamentos;
- Os dois processos de fabricação foram eficientes para a produção de requeijões adicionados de enzima, sendo que os requeijões produzidos por acidificação direta tiveram valores de lactose menores;
- Os requeijões produzidos ficaram de acordo com as características físico-químicas exigidas pela legislação (gordura no extrato seco e umidade), e as demais características físico-químicas são coerentes com a bibliografia encontrada.
- Apesar de ter ocorrido algumas diferenças significativas ($p < 0,05$), a adição de diferentes concentrações de enzima lactase não afetaram as características no perfil lipídico e perfil de textura das formulações;
- Os requeijões desenvolvidos foram aceitos sensorialmente, demonstrando a viabilidade de sua produção em larga escala.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, R. M. V. et al. Effect of light and packages on stability of spreadable processed cheese. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 17, p. 365-373, 2007.

ANDRADE, V. T.; BRANDÃO, S. C. C.; ALVIM, T. C. Sorvete de doce de leite deslactosado. In: XXI CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 2004, Juiz de Fora. Anais... **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 126-130, jul/ago. 2004.

ANDRADE, A. C. de. **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. 123p. 2006.

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

BAKKEN, A. B.; HILL, C. G. JR.; AMUNDSON, C. A. Hydrolysis of lactose in skim milk by immobilized β -galactosidase (*Bacillus circulance*). **Biotechnology and Bioengineering** 39, 409-417, 1992.

BATISTA, A. L. et al. Lactose intolerance: possibility of ingesting fermented dairy products. **Milch-wissenschaft**, v. 63, n. 4, p. 364-367, 2008.

BEYER, P.L. Terapia clínica nutricional para distúrbios do trato gastrointestinal baixo. In: MAHAN, L.K.; ESCOTT-STUMP, S. (Ed.). **Krause alimentos, nutrição & dietoterapia**. 10aed. São Paulo: Roca, p. 643-670, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Leite e Produtos Lácteos. Portaria nº 356. **Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de queijo processado ou fundido, processado pasteurizado ou fundido UHT (UAT)**. Brasília, 1997a.

_____. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal.

Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Leite e Produtos Lácteos. Portaria nº 359 de 04 de novembro de 1997. **Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Requeijão Cremoso ou Requesón**. Brasília, 1997b.

_____. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº. 348. **Utilização de enzimas na indústria de alimentos**. Diário Oficial da União, Brasília, 02 dez. 2003.

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

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.

CAVALCANTE, A. B. D. (1991) **Desenvolvimento e padronização de formulação para o processamento de requeijão tradicional**. Viçosa, 1991. Faculdade de Engenharia dos Alimentos, 112p. Tese de Mestrado – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 1991.

DIMITRELI, G.; THOMAREIS, A. S. Effect of temperature and chemical composition on processed cheese apparent viscosity. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 64, p. 265-271, 2004.

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.

ECK, A. **O Queijo**. Título original: Le Fromage. Coleção Euroagro, Publicações Europa-America, 1º volume, p. 337, 1987.

FARIAS, F. F.; FAGUNDES NETO, U. Intolerância aos carboidratos. **The Electronic Journal of Pediatric**, v. 8, n. 3, dec 2004. Disponível em: <http://www.egastroped.com.br/dec04/intolerancia.htm>. Acesso em: 27 de abril de 2009.

FERNANDES, A. G.; MARTINS, J. F. P. Fabricação de requeijão cremoso a partir de massa obtida por precipitação ácida à quente do leite de búfala e de vaca. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.35, n.212, p.7 -13, 1980.

FERNANDES, A. G. **Parâmetros fundamentais para o processamento de queijo fundido**. In: MARTINS, J.F.P.; FERNANDES, A.G. (Ed.) **Processamento de**

requeijão cremoso e outros queijos fundidos. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, p.1-11, 1981.

FERNANDES, A. G. et al. Formulação de sais emulsificantes para a elaboração de requeijão cremoso e outros tipos de queijos fundidos. Parte II. **Revista do Instituto Cândido Tostes**. V.40, n.237. p.27-39,1985.

FERRONATO, D. D. Z. et al. Avaliação dos teores de lactose em iogurtes e leites fermentados produzidos no Paraná como subsídio para orientação nutricional de pacientes com intolerância à lactose. In: XXI CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 2004, Juiz de Fora. Anais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 156-159, 2004.

FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J. P. M. **Tecnologia de queijos**. São Paulo: Dipemar,1994.

GACESA, P.; HUBBLE, J. **Tecnologia de las enzimas**. Zaragoza: Acribia S.A., p. 206, 1990.

GARRUTI, D. et al. Desenvolvimento do Perfil Sensorial e Aceitação de Requeijão Cremoso. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 23(3), p. 434-440, set/dez, 2003.

LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCÍA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis by an immobilized J-galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 583-592, 2000.

LEE, S. K.; KLOSTERMEYER, H. The effect of pH on the rheological properties of reduced-fat model processed cheese spreads. **Lebensm.-Wiss.u.-Technol.**,[S.l.], v. 34, p. 288-292, 2001.

MAHAUT, M. et.al. **Productos lácteos industriales**. Zaragoza: Acribia, S.A., p. 177, 2004.

MAURER-ROTHMANN, A.; SCHEURER, G. Stabilization of milk protein systems. **A Joha Guide**. BK Giulini GmbH, Ludwigshafen, Germany, p. 50, 2005.

MORENO, I; VIALTA, A; VALLE, J. Efeitos das varias etapas do processamento de requeijao e queijos fundidos na microbiota do leite. **Caderno fazer melhor**. p.63-65, 2002.

MUNCK, A. V.; CAMPOS, W. A. **Requeijão: um produto brasileiro**. Informe Agropecuário, v. 42, n. 115, p. 35-38, 1984.

ÓRDOÑEZ, J. A. P. et al. **Tecnología de alimentos**. v. 2 – Alimentos de origem animal. Porto Alegre: Artmed, 2006.

OLIVEIRA, J. S. **Queijos: Fundamentos Tecnológicos**. Campinas: Ícone, 1986.

OLIVEIRA, C.C.M. de. **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.

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**, v. 5, n. 1, p. 24-30, 2004.

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

RAPACCI, M. **Estudo comparativo das características físicas e químicas, reológicas e sensoriais do requeijão cremoso obtido por fermentação láctica e acidificação direta**. Tese de doutorado, UNICAMP, Campinas, 1997.

RICHARD, H. Enzimologia e Biocatálise. In: SCRIBAN, R. (Coord.). **Biotecnologia**. São Paulo: Manole, Parte 3: Engenharia Enzimática, cap.1, p. 179-207, 1985.

RODRIGUES, F. **Requeijão, Fondue, Especialidade, Queijo Processado**. Juiz de Fora: Do Autor, 2006.

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 da 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.

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

SCOTT, R.; ROBBINSON, R. K.; WILBEY, R. A. **Fabricación de queso**. 2 ed. Zaragoza: Acribia, 2002.

SILVA, D. O.; CARDOSO, V. L. **Hidrólise da lactose do soro de queijo utilizando a enzima galactosidase**. 2004. Disponível em: http://www.propp.ufu.br/revistaeletronica/edicao2004/exatas/hidrolise_da_lactosePDF. Acesso em: 26 abril de 2009.

SOBRAL, D. **Otimização do processo de fabricação de análogos de requeijão culinário**. 2007. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 2007.

SUENAGA, C. I. et al. **Intolerância à lactose**. UNIFESP: Escola Paulista de Medicina. 2001. Disponível em: <http://www.virtual.epm.br/material/tis/currbio/trab2001/grupo1/intolerancia.htm>. Acesso em: 8 de maio de 2009.

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

TÉO, C. R. P. A intolerância à lactose: uma breve revisão para o cuidado nutricional. **Arq. Cienc. Saúde Unipar**, v. 6, n. 3, p. 135-140, set./dez. 2002.

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

VALLE, J. L. E. **Qualidade físico-química da matéria-prima e produto acadabao**. In: MARTINS, J. F. P; FERNANDES, A. G. (Ed) **Processamento de requeijão cremoso e outros queijos fundidos**, Campinas. Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1981.

VAN DENDER, A. G. F. **Requeijão cremoso e outros queijos fundidos: Tecnologia de fabricação, controle do processo e aspectos de mercado**. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora, 2006.

VESA, T. H.; MARTEAU, P.; KORPELA, R. Lactose intolerance. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 19, n. 2, p. S165-S175, 2000.

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.

ZEHREN, V. L.; NUSBAUM, D. D. **Process cheese**. New Holstein: Cheese Reporter, 1992, 364p.

ANEXOS

ANEXO A – Carta de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa – 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 requeijão cremoso com baixo teor de lactose produzido por acidificação direta e coagulação enzimática

Número do processo: 23081.016423/2009-31

CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética): 0305.0.243.000-09

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:

Dez/ 2010- Relatório final

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

DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO: 18/03/2010

Santa Maria, 22 de março de 2010.



Elisete Medianeira Tomazetti
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa-UFSM
Registro CONEP N. 243.

ANEXO B – Ficha da avaliação sensorial por escala hedônica.

Nome: _____

Data: _____

AVALIAÇÃO SENSORIAL DE REQUEIJÃO CREMOSO

Muito obrigada por participar de nosso teste! Sua colaboração é muito importante para nós!

Você está recebendo uma amostra de requeijão cremoso. Prove-a e responda as questões abaixo:

Amostra nº: _____

	APARÊNCIA	SABOR	TEXTURA	AROMA
Gostei muitíssimo				
Gostei muito				
Gostei				
Indiferente				
Desgostei				
Desgostei muito				
Desgostei muitíssimo				

ANEXO C – Normas para publicação na revista Alimentos & Nutrição.

Informações gerais

A revista ALIMENTOS E NUTRIÇÃO/BRAZILIAN JOURNAL OF FOOD AND NUTRITION é um periódico trimestral, especializado e arbitrado, aberto à comunidade científica nacional e internacional, que publica artigos originais, notas prévias e trabalhos de revisão relativos às áreas de Alimentos (ciência e tecnologia) e Nutrição. Os manuscritos podem ser encaminhados em português, inglês ou espanhol e serão aceitos mediante aprovação de revisores. Os trabalhos de revisão devem representar uma análise crítica de assunto atual e relevante baseando-se, inclusive, em artigos do(s) próprio(s) autor(es) e estarão condicionados à disponibilidade de publicação considerando que em cada fascículo são publicados, no máximo, dois trabalhos dessa natureza.

É vedada a reprodução dos trabalhos em outras publicações ou sua tradução para outro idioma sem a autorização da Comissão Editorial. Os originais deverão ser acompanhados de documento de transferência de direitos autorais, contendo a assinatura do(s) autor(es) e, também, de documento contendo os dados completos dos autores (nome, endereço, telefone, e-mail, área de atuação, titulação atual, local de trabalho, cargo ocupado). Lembrando que, toda mudança de endereço deverá ser comunicada imediatamente à revista.

PREPARAÇÃO DOS ORIGINAIS

APRESENTAÇÃO: Os trabalhos devem ser apresentados em duas vias e cópia das ilustrações. Textos em disquetes serão acompanhados do printer (cópia impressa fiel, do disquete), no programa word; apresentados em lauda-padrão - A4 (30 linhas de 70 toques e espaços duplos); os textos devem Ter de 15 a 30 páginas, no máximo.

ESTRUTURA DO TRABALHO: Os trabalhos devem obedecer à seguinte seqüência: Título; Autor(es) (por extenso e apenas o sobrenome em maiúscula);Filiação científica do(s) autor(es) (indicar em nota de rodapé: Departamento, Instituto ou Faculdade, Universidade-sigla, CEP, Cidade, Estado, País); Resumo (com o máximo de 200 palavras); Palavras-chave (com até 7 palavras retiradas de Thesaurus da área, quando houver); Texto (Introdução, Material e Método(s), Resultado(s), Discussão, Conclusão); Agradecimentos; Abstract e keywords (versão para o inglês do resumo e palavras-chave precedida pela Referência Bibliográfica do próprio artigo); Referências Bibliográficas (trabalhos citados no texto).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS: Devem ser dispostas em ordem alfabética pelo sobrenome do primeiro autor e numeradas consecutivamente, seguir a NBR 6023 (agosto2000) da ABNT.

Livros e outras monografias:

CERVO, A. L.; BERVIAN, P. A. Metodologia científica: para uso dos estudantes universitários. 2. Ed. São Paulo: McGraw-Hill, 1978. 144p.

Capítulos de livros:

DEL NEGRO, G. Doenças produzidas por fungos. In: GUIMARÃES, R.X.; GUERRA, C. C. Clínica e laboratório: interpretação P.255-259 Clínica das provas laboratoriais. São Paulo: Sarvier, 1976. p.255-259.

Dissertações e teses:

VEIGA NETO, E. R. Aspectos anatômicos de glândula lacrimal e de sua inervação no macaco-prego (*Cebus apela*), (Linnaeus, 1758). 1988. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1988.

Artigos de periódicos:

ABREVIATURAS: Os títulos de periódicos deverão ser abreviados conforme o Biological Abstract, Chemical Abstract, Index Medicus, Current Contents. Exemplos: SOUZA, V. Indicação de grampos para extremidades livres. Rev. Odont. UNESP, São Paulo, v.20, p.299-310, 1991.

Trabalhos de congressos ou similar (publicado):

TRAINA JUNIOR, C. GEO: um sistema de gerenciamento de base de dados orientado a objeto: estado atual de desenvolvimento e implementação. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE BANCOS DE DADOS, 6, 1991, Manaus. Anais...Manaus: Imprensa Universitária da FUA, 1991. P.193-207.

CITAÇÃO NO TEXTO: Utilizar sistema numérico. A citação de um autor no texto (quando necessária) deverá ser pelo sobrenome e o número da referência na entrelinha superior. No caso de dois autores, os sobrenomes devem ser separados por &. Mais de dois autores, indicar apenas o sobrenome do primeiro seguido de et al.

NOTAS: Devem ser reduzidas ao mínimo e colocadas no pé de página. As remissões para o rodapé devem ser feitas por asteriscos, na entrelinha superior.

ANEXOS E/OU APÊNDICES: Serão incluídos somente quando imprescindíveis à compreensão do texto.

TABELAS: Devem ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e encabeçadas pelo título.

FIGURAS: Desenhos, gráficos, mapas, esquemas, fórmulas, modelos (em papel vegetal e tinta nanquim, ou computador); fotografias (em papel brilhante); radiografias e cromos (em forma de fotografia). As figuras e suas legendas devem ser claramente legíveis após sua redução no texto impresso de 10 X 17cm. Devem-se indicar, a lápis, no verso: autor, título abreviado e sentido da figura. Legenda das ilustrações nos locais em que aparecerão as figuras, numeradas consecutivamente em algarismos arábicos e iniciadas pelo termo FIGURA.

UNIDADE DE MEDIDA E SÍMBLOS: Devem restringir-se apenas àqueles usados convencionalmente ou sancionados pelo uso. Unidades não usuais devem ser claramente definidas no texto. Nomes comerciais de drogas citados entre parênteses, utilizando-se no texto, o nome genérico das mesmas. Os trabalhos que

não se enquadrarem nestas normas serão devolvidos aos autores, ou serão solicitadas adaptações., indicadas por carta pessoal.

ANEXO D – 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, 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 I.
- Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.
- For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.
- All equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses.
- The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Also powers of e are often more conveniently denoted by exp
- Levels of statistical significance which can be mentioned without further

explanation are $P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.001$.

- In chemical formulae, valence of ions must be given as e.g. Ca^{2+} and CO_3^{2-} , not as Ca^{++} or CO_3^{--} .
- Isotope numbers should precede the symbols, e.g. ^{18}O .
- The repeated writing of complicated chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound followed by its abbreviation (ethylene-diamine-tetra-acetic acid, EDTA) should be given in full. The abbreviation is to be used in the case of a very long name or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P_2O_5).

Footnotes

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

References

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

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

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
3. Three or more authors: first author's name followed by et al. and the year of publication. Citations may be made directly or parenthetically. Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown..." The list of references must be arranged alphabetically on authors' names, and should be as full as possible, listing all authors, the full title of articles and full title of journals, publisher and year. Titles of periodicals mentioned in the list of references must be spelled out in full. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added. References concerning unpublished data and "personal communications" must not be cited in the reference list but may be mentioned in the text, giving the full details (name and affiliation of the contact). References included in the reference list as "in press" should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication data with "in press". Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication. In the final publication, material referenced as "submitted" is not acceptable - if it cannot be referenced as "in press" then the text needs to be revised to state "unpublished results" and the

reference deleted from the reference list. Citing and listing of web references. As a minimum, the full website address (URL) should be given. Any further information, if known (author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list. Use of web references should be minimised and limited to verifiable, credible sources only. The following are examples of reference layouts. Please use a hanging indent (second and subsequent lines indented).

Reference to a chapter in a monograph:

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

Reference to a chapter in a book

De 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/Titlpage.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.