João Henrique Alarcon Alegro

Desenvolvimento de queijo Minas frescal probiótico com *Lactobacillus Acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* isolados e em co-cultura

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

_____

Profa. Dra. Susana Marta Isay Saad

(Orientadora/Presidente)

_____

(1° examinador)

_____

(2° examinador)

São Paulo, 2003.

Dedicatória

Aos meus pais, Roberto Biagi Alegro e Maria Helena Alarcón Alegro, pelo total apoio em toda minha vida de estudos e pela insistência inicial diante de minha resistência ao mestrado.

Aos meus irmãos pelo apoio, seja de longe de minha irmã Maria Martha, como o apoio e suporte de perto de meu irmão Luiz Gustavo, por quem me inspirei neste trabalho.

A minha esposa e amiga, Lina Casale Aragon Alegro, pelo respeito, apoio e ajuda em todas as horas.

AGRADECIMENTOS

Aos meus irmãos de república e de coração, Luiz Gustavo Alarcon Alegro e Gianmarco Stoef, pelo apoio e companheirismo.

Aos meus novos pais, Teresinha Casale e Flávio Ferrari Aragon e meus cunhados Davi e Caio pelas palavras de apoio.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, Chiu, Cezar, Maurício, Denise, Virgílio, Juliana, Camila e Haissa entre outros pela sempre presente ajuda.

Aos meus amigos de outros laboratórios, também colegas em aulas e trabalhos pelas horas de convivência.

Às “minhas estagiárias” e amigas Juliana e Flávia, que, com suas excelentes ajudas, tornaram meu trabalho mais suave.

Aos professores e funcionários, que com seus conhecimentos e dedicação, ajudaram grandemente em minha formação.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani, da UNESP Botucatu pelo enorme auxílio na análise estatística de meus dados.

À bibliotecária Adriana de Almeida Barreiros, pela enorme ajuda na correção de minhas referências.

À EMPRESA Christian Hansen, por ter fornecido as culturas probióticas

À FAPESP, pelo apoio financeiro – bolsa e auxílio à pesquisa (processos 00/14681-0 e 00/03803-7).

À Capes, pela verba destinada ao PROAP.

À minha orientadora Prof. Dra. Susana Marta Isay Saad pela prestimosa orientação neste trabalho.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE TABELAS E FIGURAS..... IV

RESUMO..... VII

ABSTRACT..... VIII

1. INTRODUÇÃO..... 1

1.1. Aspectos gerais sobre a comercialização de queijos..... 1

1.2. Aspectos gerais sobre legislação de alimentos funcionais..... 3

1.3. Aspectos tecnológicos da fabricação de queijo Minas frescal..... 5

1.4. Propriedades reológicas de queijos..... 8

1.5. Aspectos higiênico-sanitários na fabricação de queijo Minas frescal 12

1.6. Utilização de culturas láticas na tecnologia de fabricação de queijos 15

1.7. Culturas probióticas e seu papel nos alimentos funcionais..... 18

2. OBJETIVOS..... 25

3. MATERIAL E MÉTODOS..... 26

3.1. Fabricação do queijo Minas frescal..... 26

3.2. Avaliação do rendimento do processo..... 28

3.3. Armazenamento e períodos de amostragem..... 28

3.4. Determinação dos parâmetros microbiológicos..... 28

Página

3.4.1. Contagens populacionais de microrganismos probióticos e bactérias láticas totais..... 29

3.4.2. Contagens populacionais de microrganismos indicadores..... 29

3.5. Determinações de parâmetros microbiológicos no leite e durante o processamento dos queijos 30

3.6. Determinação dos parâmetros físico-químicos dos queijos..... 30

3.7. Determinação do perfil de textura instrumental dos queijos..... 30

3.8. Delineamento experimental e análise estatística..... 31

3.9. Análise sensorial..... 32

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES……..... 33

4.1. Rendimento..... 33

4.2. Umidade..... 35

4.3. Atividade de água, pH e acidez livre..... 35

4.4. Evolução dos perfis populacionais microbianos…..... 38

4.4.1. Evolução das populações de microrganismos probióticos e bactérias láticas totais..... 38

4.4.2. Evolução das populações de microrganismos indicadores..... 43

4.4.3. Análise conjunta das evoluções das populações de microrganismos probióticos, bactérias láticas e bactérias indicadoras nos diferentes queijos estudados..... 45

4.5. Evolução dos perfis de textura instrumental..... 47

4.6. Análise sensorial……. 51

5. CONCLUSÕES..... 53

Página

6. TABELAS..... 55

7. FIGURAS..... 58

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 68

9. ANEXO I – Formulação dos meios de cultura para bactérias probióticas…….....……....…….. 82

10. ANEXO II – Modelo do questionário de análise sensorial ....……. 84

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

TABELA 1 - Mediana e semi-amplitude total do rendimento, umidade, atividade de água, pH e acidez livre segundo tratamento e dia de amostragem.....Página 55

TABELA 2 - Mediana e semi-amplitude total de *Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium lactis,* Bactérias láticas totais, *Staphylococcus* spp. e coliformes totais segundo tratamento e dia de amostragem.....Página 56

TABELA 3 - Mediana e semi-amplitude total da dureza, coesividade, elasticidade, mastigabilidade, gomosidade e adesividade segundo tratamento e dia de amostragem.....Página 57

FIGURA 1 - Fluxograma de produção do queijo Minas frescal.....Página 27

FIGURA 2 - Valores médios dos rendimentos obtidos para as diferentes formulações de queijo Minas frescal estudados.....Página 58

FIGURA 3 - Valores médios de umidade obtidos para as diferentes formulações de queijo Minas frescal estudados, durante armazenamento sob refrigeração.....Página 58

FIGURA 4 - Valores médios de pH obtidos para as diferentes formulações de queijo Minas frescal estudados, durante armazenamento sob refrigeração.....Página 59

FIGURA 5 - Valores médios de acidez livre obtidos para as diferentes formulações de queijo Minas frescal estudados, durante armazenamento sob refrigeração.....Página 59

FIGURA 6 - Valores médios das populações de *Lactobacillus acidophilus* obtidos para os queijos adicionados de *L. acidophilus* (T2) e *L. acidophilus* + *B. lactis* (T4) durante seu processamento e armazenamento a sob refrigeração.....Página 60

FIGURA 7 - Valores médios das populações de *Bifidobacterium* spp. obtidos para os queijos adicionados de *B. lactis* (T3) e *L. acidophilus* + *B. lactis* (T4) durante seu processamento e armazenamento sob refrigeração.....Página 60

FIGURA 8 - Valores médios das populações de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* spp. obtidos para os queijos adicionados de *L. acidophilus* + *B. lactis* (T4) durante seu processamento e armazenamento sob refrigeração.....Página 61

FIGURA 9 - Valores médios das populações de bactérias láticas totais obtidos para as diferentes formulações de queijo Minas frescal estudados, para a matéria prima (leite), durante seu processamento e armazenamento sob refrigeração.....Página 61

FIGURA 10 - Valores médios das populações de *Staphylococcus* spp. obtidos para as diferentes formulações de queijo Minas frescal estudados, para a matéria prima (leite), durante seu processamento e armazenamento sob refrigeração. .....Página 62

FIGURA 11 - Valores médios das populações de coliformes totais obtidos para as diferentes formulações de queijo Minas frescal estudados, para a matéria prima (leite), durante seu processamento e armazenamento sob refrigeração.....Página 62

FIGURA 12 - Valores médios das populações de bactérias indicadoras e de bactérias láticas totais obtidos para a formulação de queijo Minas frescal não adicionado de culturas probióticas - queijos controle (T1), para a matéria prima (leite), durante seu processamento e armazenamento sob refrigeração.....Página 63

FIGURA 13 - Valores médios das populações de bactérias indicadoras, bactérias láticas totais e de microrganismos probióticos obtidos para a formulação de queijo Minas frescal adicionado da cultura probiótica *Lactobacillus acidophilus* - queijos 2 (T2), para a matéria prima (leite), durante seu processamento e armazenamento sob refrigeração.....Página 63

FIGURA 14 - Valores médios das populações de bactérias indicadoras, bactérias láticas totais e de microrganismos probióticos obtidos para a formulação de queijo Minas frescal adicionado da cultura probiótica *Bifidobacterium lactis* - queijos 3 (T3), para a matéria prima (leite), durante seu processamento e armazenamento sob refrigeração.....Página 64

FIGURA 15 - Valores médios das populações de bactérias indicadoras, bactérias láticas totais e de microrganismos probióticos obtidos para a formulação de queijo Minas frescal adicionado das culturas probióticas *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* - queijos 4 (T4), para a matéria prima (leite), durante seu processamento e armazenamento sob refrigeração.....Página 64

FIGURA 16 - Curva típica de análise do perfil de textura obtida para queijo Minas frescal empregando-se analisador de textura TA-XT2 (Stable Micro Systems). Dureza = H; Coesividade = A_2/A_1; Adesividade = A_3; Elasticidade = T_2/T_1; Mastigabilidade = H x (A_2/A_1) x (T_2/T_1) e Gomosidade = H x (A_2/A_1) x 100. .....Página 65

FIGURA 17 - Valores médios de dureza obtidos para as diferentes formulações de queijo Minas frescal estudados, durante armazenamento sob refrigeração.....Página 65

FIGURA 18 - Valores médios de coesividade obtidos para as diferentes formulações de queijo Minas frescal estudados, durante armazenamento sob refrigeração.....Página 66

FIGURA 19 - Valores médios de elasticidade obtidos para as diferentes formulações de queijo Minas frescal estudados, durante armazenamento sob refrigeração.....Página 66

FIGURA 20 - Valores médios de mastigabilidade obtidos para as diferentes formulações de queijo Minas frescal estudados, durante armazenamento sob refrigeração.....Página 67

FIGURA 21 - Valores médios de gomosidade obtidos para as diferentes formulações de queijo Minas frescal estudados, durante armazenamento sob refrigeração.....Página 67

RESUMO

O interesse do consumidor por produtos alimentícios saudáveis e até capazes de prevenir doenças, como alimentos funcionais probióticos, tem aumentado visivelmente nos últimos anos. A possibilidade de se desenvolver produtos lácteos de grande aceitabilidade nacional como o queijo Minas frescal com microrganismos probióticos tem futuro promissor. O presente trabalho teve como objetivo verificar a influência do emprego de culturas probióticas compostas pelos microrganismos *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* isolados e em co-cultura na tecnologia de fabricação de queijo Minas frescal sobre as características do produto ao longo de seu armazenamento refrigerado.

Os queijos foram preparados com acidificação com ácido lático e 4 tratamentos (em quadruplicata) foram empregados para se avaliar a ação dos microrganismos probióticos: T1 (controle), T2 (adição de *L. acidophilus*), T3 (adição de *B. lactis*) e T4 (adição de *L. acidophilus* + *B. lactis*). Avaliou-se o comportamento de *L. acidophilus, B. lactis,* bactérias láticas totais, *Staphylococcus* spp., coliformes totais e *E. coli*. Paralelamente, foi feita a determinação do perfil de textura dos queijos através de teste de dupla compressão de amostras cilíndricas, em analisador de textura TA-XT2 (Stable Micro System) e determinação de umidade, pH, acidez titulável e atividade de água. As análises foram realizadas no dia de processamento (dia 1) e após 7, 14 e 21 dias de armazenamento a 5°C. As análises microbiológicas também foram realizadas no leite e no queijo em processamento. A comparação entre os queijos foi estudada também através de análise sensorial, empregando-se teste de aceitação/preferência.

Os queijos T4 revelaram-se mais apropriados quanto à multiplicação das bactérias probióticas. Com relação a multiplicação de coliformes, *Staphylococcus* spp. e bactérias láticas totais, não foi observada diferença significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos. Houve, porém, aumento significativo ao longo do armazenamento para *Staphylococcus* spp. nos queijos T3 e para coliformes totais nos queijos T1 ($p<0,05$). *E. coli* não foi detectado em nenhum dos queijos.

A atividade de água não atuou como obstáculo no desenvolvimento de microrganismos, ficando sempre acima de 0,97 em todos os queijos. O pH e a acidez mostraram-se estatisticamente iguais ($p>0,05$) em todos os 4 queijos. Houve, porém, queda estatisticamente significativa do pH médio e aumento significativo da acidez ($p<0,05$) nos queijos T1 e T2. Nos parâmetros de textura, observou-se aumento significativo da dureza que é o parâmetro mais importante, na primeira semana para todos os queijos ($p<0,05$) e nas datas seguintes, tendência à estabilidade exceto para T3 que mostrou novos aumentos significativos ($p<0,05$) em 7 e 14 dias. A coesividade, a elasticidade e a adesividade mostraram-se estatisticamente iguais ($p>0,05$) em todas as datas de amostragem em todos os queijos. Na avaliação sensorial dos queijos, não foi observada aceitabilidade diferenciada para nenhum dos queijos.

Concluiu-se que o queijo frescal probiótico tipo Minas frescal mostrou-se com propriedades sensoriais, de textura e microbiológicas adequadas e apropriado como veículo para *L. acidophilus* e *B. lactis*, porém com melhor desenvolvimento destes quando em co-cultura (T4), associado ao fato deste queijo ter se comportado da forma mais estável dentre os queijos estudados, quando avaliados todos os pontos de variação significativa ao longo do armazenamento.

ABSTRACT

Functional foods consuming habits have been increasing over the years, particularly in the case of probiotic dairy food. The possibility of developing new probiotic dairy products, like the popular Brazilian Minas fresh cheese, is very promising. The objective of the present work was to verify the influence of the probiotic cultures containing Lactobacillus acidophilus and *Bifidobacterium lactis*, added individually and in co-culture during fresh Minas cheese production, over the microbiological, textural and physico-chemical behavior of the product during refrigerated storage.

Four treatments were prepared (four times each), all of them were made through direct acidification with lactic acid: T1 (control), T2 (addition of *L. acidophilus*), T3 (addition of *B. lactis*) e T4 (addition of *L. acidophilus* + *B. lactis*). Microbiological counts of *L. acidophilus, Bifidobacterium* spp., total lactic acid bacteria (LAB), coliforms, *Staphylococcus* spp. and *E. coli* and analysis of pH, acidity, moisture content and water activity proceeded after 1, 7, 14 and 21 days of storage at 5°C. Microbiological analysis was also conducted in milk and during cheese manufacturing process. Additionally, texture properties of cheeses were evaluated during storage, employing a TA-XT2 Texture Analyser (Stable Micro Systems, Haslemere, England), using a two-bite compression of cylindrical samples. Parameters measured consisted of hardness, elasticity, cohesiveness, chewiness, gumminess and adhesiveness. Comparison of cheeses was also conducted through sensory evaluation after 7 days of storage, using Preference-Ranking test.

Cheeses T4 revealed to be more appropriate for growth of both probiotic bacteria, maintaining populations of 6 log CFU/g or above. No significant differences ($p>0.05$) between treatments were observed in relation to coliforms, *Staphylococcus* spp. and LAB, though *Staphylococcus* spp. and coliforms increased significantly during storage of cheeses T3 and T1, respectively ($p<0.05$). *E. coli* was not detected in any of the cheese and milk samples. Water activity values stayed above 0.970 for all samples, therefore proper for microbial growth. Mean pH and acidity did not differ significantly among treatments ($p>0.05$). Nevertheless, cheeses T1 and T2 revealed a significant decrease in pH (6.2 to 5.9 and 6.7 to 6.1, respectively) and increase in acidity from day 1 to day 21 of storage ($p<0.05$). As for the texture profile of cheeses, a significant increase in hardness ($p<0.05$) was detected for all cheeses studied in the first week of storage, followed by a tendency for stability during the subsequent storage period, except for cheeses T3, for which a significant increase in hardness was also detected from day 7 to day 14 of storage. Cohesiveness, springiness and adhesiveness showed to be statistically equal ($p>0.05$) for all cheeses and for all sampling days. No significant differences were detected through sensory evaluation between the four kinds of cheeses studied ($X0<\chi2$).

Results indicated that probiotic fresh Minas cheese presented adequate sensorial, textural and microbiological properties. Therefore, Minas cheese is a suitable vehicle for delivery of L. acidophilus and B. lactis, especially when they are in a co-cultural system, condition which resulted in a slightly better survival rate of both probiotic strains and in a more stable product during refrigerated storage.

freqüentemente fabricado de maneira artesanal e, em muitos casos, precária. A legislação brasileira determina a utilização de leite pasteurizado na elaboração de queijo Minas, com a finalidade de eliminar a flora patogênica (BRASIL, 1980; BRASIL, 1997). Apesar disso, a comercialização desse tipo de queijo em desacordo com essa especificação legal é bastante ampla (PEREIRA et al., 1991). Aliado a esse fato, os leites B e C pasteurizados freqüentemente encontram-se fora dos padrões legais no que diz respeito à presença de coliformes fecais (NADER FILHO et al., 1996).

No mercado europeu observa-se um crescimento no desenvolvimento de produtos lácteos fermentados e funcionais, refletindo grande interesse no estudo de alimentos que demonstrem benefícios para a saúde. Atualmente, estima-se que cerca de 13% do total de iogurtes vendidos na Europa contenham probióticos (DALY et al. 1998). Estima-se que este mercado perfaça um total de 889 milhões de dólares, sendo que o mercado francês é considerado como o maior, atingindo cerca de 219 milhões de dólares (STANTON et al., 2001).

Atualmente, há mais de 70 produtos lácteos contendo *Bifidobacterium e Lactobacillus acidophilus* sendo produzidos mundialmente, incluindo cremes fermentados, manteiga, iogurte, leites em pó e sobremesas geladas. Somente no Japão, há mais de 53 diferentes tipos de produtos lácteos contendo microrganismos probióticos (SHAH, 2001).

Segundo SANDERS (1999), o mercado de produtos probióticos nos Estados Unidos é pouco desenvolvido e de difícil acesso. No Brasil, segundo dados da indústria, estima-se um consumo de leites fermentados contendo probióticos de cerca de 120 mil toneladas/ano (LEITES, 2000). São encontrados no mercado brasileiro alguns produtos alimentícios contendo probióticos, como leite fermentado aromatizado ou não, iogurtes, leite em pó destinado a recém nascidos e sobremesa láctea fermentada. Dentre os produtos considerados como farmacêuticos comercializados no Brasil, podem ser citados alguns na forma de suplemento alimentar, suspensão oral e cápsulas contendo microrganismos probióticos, os últimos dois, em sua maioria, destinados ao consumo após dissolução prévia em bebidas frias (OLIVEIRA et al., 2001).

1.2. Aspectos gerais sobre legislação de alimentos funcionais

O objetivo primário dos alimentos funcionais é melhorar, manter e reforçar a saúde dos consumidores via alimentação. Consumidores e resultados científicos devem dar suporte às exigências para que um ingrediente ou alimento seja regulamentado. Autoridades ligadas à saúde, em colaboração com a indústria de alimentos e instituições de pesquisa, têm a responsabilidade de realizar procedimentos para autorização das alegações. O estabelecimento da lista positiva e a avaliação do dossiê contendo todos os resultados científicos avaliados devem ser analisados por um comitê multidisciplinar. O comitê deve estabelecer um diálogo entre representantes científicos e da indústria visando estabelecer as principais justificativas que dão suporte as atribuições (ROBERFROID, 2000).

O registro de alimentos funcionais é um problema de difícil resolução, particularmente no que diz respeito aos medicamentos e aos rótulos dos produtos alimentícios. Discussão vem sendo feita no sentido de se estabelecer se o controle feito através da legislação existente é suficiente para a regulamentação dos alimentos funcionais ou se devem ser introduzidos registros específicos. No Japão, a denominação legal do alimento funcional foi estipulada de acordo com o sistema “Alimento Destinado a Uso Específico de Saúde” (Food for Specific Health Use – FOSHU) da legislação de alimentos japonesa. De acordo com essa legislação, o alimento funcional é definido como aquele ao qual é atribuído um efeito positivo sobre a saúde (LEE et al., 1999).

No Brasil, a legislação é recente (Brasil, 1999a, b, c, d). A resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (ANVS/MS) número 15 de 30/04/1999 institui junto à Câmara Técnica de Alimentos, a Comissão de Assessoramento Técnico Científico de alimentos funcionais e novos alimentos. Esta passa a ter a incumbência de prestar consultoria e assessoramento em matérias relacionadas com os alimentos funcionais e novos alimentos, bem como a segurança de consumo e alegação de função nos rótulos. A portaria de número 16 de 30/04/1999 corresponde ao regulamento técnico de procedimentos para o registro de alimentos e/ou de novos ingredientes. Alimentos ou novos ingredientes são os alimentos ou substâncias sem histórico de consumo no país, ou alimentos com substâncias já consumidas e que, entretanto, venham a

ser adicionadas ou utilizadas em níveis muito superiores aos atualmente observados nos alimentos utilizados na dieta regular. Uma avaliação técnica de segurança deve ser feita por uma comissão de Assessoramento Técnico Científica em alimentos funcionais e novos alimentos constituída pela ANVS. A portaria ANVS/MS número 18 de 30/04/1999 dá as diretrizes básicas para a análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas na rotulagem de alimentos. São discutidos três tipos de alegações sobre o conteúdo, a função metabólica e de saúde, sendo permitidas apenas as alegações de prevenção contra o aparecimento de doenças. A alegação de propriedades funcionais ou de saúde é permitida em caráter opcional. O alimento ou ingrediente que alegar propriedades funcionais ou de saúde pode, além de funções nutricionais básicas, quando se tratar de nutriente, produzir efeitos metabólicos, fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica.

A portaria ANVS/MS número 19 de 30/04/1999 regulamenta os procedimentos para registro de alimentos com alegação de propriedades funcionais e/ou de saúde em sua rotulagem. Dentre a documentação necessária estão previstos o texto e cópia do leiaute dos dizeres da rotulagem do produto e as diretrizes básicas para a análise e comprovação de propriedade funcional ou de saúde alegadas na rotulagem do produto. Alimentos que já possuem registro e que queiram fazer alegações de propriedades funcionais, além de adotar os procedimentos administrativos para a modificação de fórmula e de rotulagem, devem apresentar o relatório técnico científico.

Segundo recomendações das Comissões Tecnocientíficas de Assessoramento em alimentos funcionais e novos alimentos, aprovadas pela Diretoria de Alimentos e Toxicologia (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2001a), alegações em rótulos para leites fermentados à base de *Lactobacillus acidophilus* e/ou *Bifidobacterium lactis* ou estes em pó para adição em líquidos podem conter as afirmações a seguir: “mantém a flora intestinal em equilíbrio”; “aumentam os microrganismos benéficos”; “diminuem as bactérias nocivas” e auxiliam na manutenção do equilíbrio do intestino”. É citado, ainda, que o fabricante deve garantir a viabilidade do probiótico, com um mínimo de 10^6 UFC do ingrediente/grama, dentro do prazo de validade do produto.

Deve ser salientado que a legislação brasileira em vigência trata do assunto probióticos de forma falha, visto que somente cita a regulamentação do seu uso em leites fermentados e em pós para adição em líquidos, deixando desta forma outros alimentos como sobremesas lácteas, queijos e alimentos de base não láctea de fora desta regulamentação. Outra falha cometida está na citação de somente duas cepas específicas de microrganismos probióticos, enquanto que é amplamente conhecido o fato de que muitas outras cepas de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são seguras e exercem seus efeitos benéficos além de já serem amplamente utilizados no mercado de produtos lácteos.

1.3. Aspectos tecnológicos da fabricação de queijo Minas frescal

O queijo é considerado como sendo o produto fresco ou maturado resultante da separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído, ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho (BRASIL, 1996). O processo de fabricação de queijos é essencialmente um processo de concentração do leite por um fator de 6 a 12 vezes, dependendo da variedade do queijo (FOX et al., 1990; FOX & McSWEENEY, 1998). A primeira etapa da tecnologia de fabricação de queijo é constituída pela coagulação, primeiramente lenta e depois rápida, do leite após o seu tratamento com enzimas coagulantes (quimosina, pepsina ou proteinases microbianas). Esse fenômeno resulta de dois processos, o primeiro deles sendo o ataque à κ-caseína, proteína responsável pela estabilização das micelas de caseína e o segundo, a subseqüente coagulação das micelas desestabilizadas pelo ataque enzimático. Um terceiro processo envolve as modificações das propriedades e da estrutura do coágulo após a sua formação (DALGLEISH, 1993).

Durante o processo de coagulação do leite, a camada de κ-caseína, localizada na superfície das micelas de caseína presente e responsável pela sua estabilidade, sofre hidrólise enzimática na ligação Phe105-Met106. A porção N-terminal da molécula de κ-caseína, denominada para-κ-caseína, permanece ligada à micela de caseína, enquanto que a porção C-terminal, conhecida como caseíno-macropeptídio (CMP ou glicomacropeptídio), é perdida no meio aquoso. Conseqüentemente, na presença de cálcio e em temperaturas adequadas, ocorre

uma aglomeração das micelas desestabilizadas de caseína, resultando na formação do coalhada (FOX et al., 2000).

O queijo Minas frescal é definido pela legislação brasileira como sendo o queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias láticas específicas (BRASIL, 1997). É um queijo para o consumo imediato e de curta durabilidade no mercado, sendo produzido em fábricas tanto de pequeno e médio quanto de grande porte e consumido por todas as camadas da população ao longo de todo o ano, em lanches, cafés da manhã ou sobremesas (FURTADO, 1999).

O rendimento médio da fabricação de queijo Minas frescal é bastante variável, sendo 6,0 a 6,5 litros de leite para cada quilograma de queijo produzido considerado normal. A variação do rendimento pode ser atribuída à grande variação no teor de umidade desses queijos (55 a 62%), os quais possuem baixos teores de gordura (em geral, entre 17 e 19%). Assim como os outros queijos, o queijo Minas frescal é um produto em evolução, sofrendo modificações constantes em suas características físico-químicas e microbiológicas, modificações estas que interferem diretamente sobre a sua durabilidade no mercado. Atualmente, a fabricação desse queijo é feita com a adição de pequenas quantidades de culturas láticas mesofílicas ou sem nenhuma adição de cultura e sim de ácido lático (FURTADO, 1999).

Por ser um produto alimentício com alto teor de umidade e baixo teor de sal, o queijo Minas frescal tende a sofrer alterações em poucos dias de exposição no mercado, as quais podem torná-lo inaceitável para o consumidor. Entre essas alterações destaca-se a queda acentuada de pH, o que torna o produto sensorialmente ácido tornando-o inaceitável. Essa queda de pH é normalmente mais acentuada nos queijos processados com a adição de culturas láticas mesofílicas, caindo de cerca de 5,2 para menos de 4,9 após uma semana, uma vez que as culturas adicionadas degradam rapidamente a lactose presente, havendo intensa produção de ácido lático. Com a adição apenas de ácido lático durante o processamento do queijo, também ocorre queda acentuada de pH, mais

alto no início (cerca de 6,3 a 6,5), podendo chegar a 5,2-5,4, dependendo do nível de contaminação e das condições de comercialização (FURTADO, 1999).

Outras alterações que tornam o queijo Minas inaceitável do ponto de vista do consumidor são as mudanças em sua consistência e em sua coloração, tornando-se pastoso e amarelado. Essas alterações são conseqüentes da proteólise da caseína por ação das enzimas do coalho e proteases e peptidases de origem bacteriana (FURTADO, 1999). Existem dois tipos básicos de proteólise, que são primária e secundária. A proteólise primária é devida ao coalho residual na coalhada, enquanto a proteólise secundária é devida à plasmina, protease alcalina do leite, (ataque da plasmina na β-caseína, formando pequenos peptídeos, aminoácidos livres e frações de γ-caseína). O pH ótimo da plasmina é em torno de 7,5 e esta não é termorresistente, sendo destruída na pasteurização e durante o cozimento da massa em queijos com esta etapa fabril. (FOX et al. 2000). Normalmente, a ocorrência de proteólise é mais rápida nos processos tecnológicos envolvendo a adição de culturas láticas. Entretanto, essa proteólise é bastante influenciada pelo tipo de coalho empregado, sendo peculiarmente acentuada quando se lança mão de coalhos de origem fúngica (coalhos microbianos), cujo uso também tende a diminuir o rendimento do processo. Os referidos coalhos consistem de proteases ácidas bem mais proteolíticas, quando comparados à quimosina e à pepsina bovinas, presentes nos coalhos de origem animal (FURTADO, 1999).

Segundo FOX, et al. (2000), grande parte do coalho adicionado ao leite é perdido no soro ou desnaturado nos processos de cozimento da massa do queijo. Os valores podem ser de 0% de retenção para queijos de massa cozida (Parmesão e Mussarela), em torno de 6% para o Cheddar e em torno de 20% de retenção para queijos de alta umidade e não cozidos como o Camembert. Para a quimosina, esta retenção é pH dependente, ou seja, quanto menor o pH, maior a retenção (HARBOE & BUDTZ, 1999). O coalho residual tem afinidade proteolítica pela α-s1-caseína (α-s1-CN), tendo seu sítio primário de ação a ligação fenil-alanina_23 – fenil-alanina_24 desta caseína. O amolecimento do queijo é atribuído à quebra desta ligação, e o pequeno peptídeo αs1-CN (fragmento1-23)

produzido, é rapidamente hidrolisado pelas proteinases das bactérias iniciadoras (FOX et al. 2000).

A retenção do coalho na massa do queijo é altamente influenciada pelo pH no momento da dessoragem, assim como sua atividade, sendo que quanto mais ácido estiver o leite e a massa de queijo, maior a retenção de coalho nesta e maior a proteólise primária subseqüente (FOX & McSWEENEY, 1996; FOX & McSWEENEY, 1998).

ISEPON & OLIVEIRA (1995) concluíram que a adição de culturas láticas simples ou mistas não afetou o rendimento do processo de produção de queijo Minas frescal, podendo ser importante para o desenvolvimento do sabor lático (acidez lática) para os queijos processados com leite pasteurizado. Os autores observaram, também, que a adição de cultura lática mista, constituída de *Streptococcus lactis* e *Streptococcus cremoris* (atualmente denominados *Lactococcus*) a 1%, resultou em uma maior acidez titulável em queijo elaborado com leite não pasteurizado, quando comparada à adição de cultura lática simples, constituída de *Streptococcus lactis* a 1%.

1.4. Propriedades reológicas de queijos

A reologia envolve o estudo da deformação e fluxo de materiais quando submetidos a uma tensão ou compressão (FOX et al., 2000). O comportamento reológico de qualquer material está diretamente relacionado à sua arquitetura interna. Assim sendo, medidas reológicas são particularmente adequadas para investigar a estrutura do queijo e estão intimamente relacionadas com a composição e o valor de pH (GONZALEZ et al., 1998). Entre os principais objetivos para estudos de textura e propriedades reológicas dos queijos destacam-se o estudo de sua estrutura e a procura por medidas físicas que possam ajudar o fabricante (PRENTICE et al., 1993).

A textura é uma característica sensorial, mensurável de maneira direta somente através de análise sensorial. Desta forma, obtém-se dados sobre as características visuais, de toque e de degustação (contato com a língua,

resistência ao corte dos dentes, mastigação e deglutição) do produto alimentício. Entretanto, manter um painel treinado é caro e difícil e um método instrumental é de utilização simples, requer pouco pessoal treinado e é simples de se padronizar. Os testes instrumentais são geralmente baseados em força de compressão que tem a função de simular a mastigação entre os molares. A amostra é submetida a duas “mordidas” ou corridas, que simulam melhor o ato de mastigação. O tempo recomendado em cada “mordida” é de 5 segundos. Quando o pistão deforma a amostra, o movimento do suporte é detectado e uma curva de força - compressão é traçada. A partir dessa curva, obtém-se valores dos parâmetros fraturabilidade, dureza, coesividade, adesividade, elasticidade, mastigabilidade e gomosidade (FOX et al., 2000).

Os referidos parâmetros compõe as características mecânicas dos queijos, sendo agrupados em propriedades primárias (dureza, coesividade, elasticidade e adesividade) e secundárias (fraturabilidade, mastigabilidade e gomosidade). A dureza representa a força requerida para comprimir o queijo entre os dentes molares ou entre a língua e o palato (ponto de deformação ou penetração); a coesividade é definida como a extensão que o queijo pode ser deformado até que haja ruptura; a elasticidade é o grau de recuperação da deformação causada pela compressão após o cessar da força aplicada; a adesividade representa a força requerida para remover o queijo que aderiu ao céu da boca (palato) durante a mastigação; a fraturabilidade é a força com que o queijo se esmigalha, quebra, sendo resultado de um alto grau de dureza e baixo grau de adesividade; a mastigabilidade é o tempo ou número de mastigações necessárias para o queijo estar pronto para ser deglutido, sendo o produto da dureza, coesividade e elasticidade e a gomosidade é a energia requerida para desintegrar um pedaço de queijo, tornando-o apto para ser deglutido, sendo produto de um baixo grau de dureza e alto de coesividade (FOX et al., 2000).

As propriedades reológicas dos queijos exercem um papel fundamental por afetarem diretamente as características de manipulação, fracionamento e embalagem, as qualidades de textura e de consumo, a sua utilização como ingrediente, a sua capacidade de conservar uma determinada forma a uma dada temperatura e a sua capacidade de reter gases e formar olhaduras. Características como a composição do queijo, o arranjo estrutural de seus

componentes (a sua microestrutura), o estado físico-químico de seus componentes e sua macroestrutura (presença de mais ou menos pontos heterogêneos como junções, rachaduras ou fissuras) refletem diretamente sobre as suas propriedades reológicas (FOX et al., 2000).

Assim como a maioria dos alimentos sólidos e semi-sólidos, o queijo apresenta natureza viscoelástica, uma vez que possui características tanto de um sólido elástico como de fluido Newtoniano. A viscoelasticidade do queijo resulta da contribuição reológica interativa de seus componentes individuais, particularmente proteínas, gorduras e umidade. A massa do queijo processado com coalho natural é essencialmente uma matriz de fosfato de paracaseinato de cálcio. A integridade da matriz é mantida por várias interações hidrofóbicas e eletrostáticas, sendo interrompida por poros de gordura, substâncias dissolvidas e enzimas. A matriz também contém vários microrganismos. Existe um equilíbrio dinâmico entre a concentração de cálcio e fosfato inorgânico na matriz de paracaseina. Este é influenciado pelo pH e outros fatores com concentração de sódio no soro (FOX et al., 2000).

A rede de paracaseina é essencialmente contínua em todas direções, podendo haver interrupções devido à presença de junções nos grânulos da coalhada. Nessa rede há presença de gordura e soro encapsulados, formando uma trama. A rigidez da mesma depende de seu grau de abertura, da quantidade de água adjacente à caseína e da presença de gordura e água livre. A interação entre a gordura e a caseína ocorre apenas por fricção. A quantidade de água ligada é bem pequena, a maioria se encontra livre em sais dissolvidos. A estrutura da rede de caseína é determinada no início da fabricação do queijo (PRENTICE et al., 1993; FOX et al., 2000). O pH na dessoragem determina largamente o conteúdo mineral do queijo. A perda de cálcio e fosfato da micela de caseína determina a extensão das ligações entre as micelas e isto determina a estrutura básica e textura dos queijos. Em geral, queijos de baixo pH de dessoragem tendem a ter uma textura quebradiça, enquanto os de alto pH tendem a ter uma textura mais elástica (LAWRENCE, 1983; STANLEY 1998; FOX et al., 2000).

Várias modificações físico-químicas ocorrem nos componentes estruturais durante a maturação do queijo. O tipo e a extensão dessas modificações

mediadas pelo coágulo residual, microrganismos e suas enzimas e mudanças no equilíbrio entre o soro e a matriz de paracaseina, dependem da variedade, da composição e das condições de maturação do queijo. Desta forma, o queijo pode ser considerado um sistema dinâmico do ponto de vista químico, biológico e bioquímico, cujos componentes estruturais sofrem modificações físico-químicas e microestruturais relacionadas ao armazenamento, como hidrólise e hidratação da caseína, intumescência da matriz, coalescência da gordura e/ou hidrólise da gordura. Essas modificações, responsáveis pela conversão da coalhada fresca em queijo, exercem efeitos sobre as propriedades reológicas e outras características do queijo (FOX et al., 2000).

Entre essas modificações, a decomposição da lactose em ácido reduz o pH e proporciona o aparecimento do sabor e aroma característicos. A degradação das proteínas dos queijos (proteólise), por sua vez, é o resultado da atividade de enzimas como as do coalho, proteases e peptidases do fermento lácteo ou da microbiota natural do leite. Quanto maior a proteólise do queijo, mais macia será sua consistência e seu aroma pronunciado. O tipo e a intensidade da proteólise de queijos dependem de vários fatores tais como tempo e temperatura de armazenamento, composição do queijo, umidade e concentração de sal e dos tipos e atividades das enzimas e microrganismos presentes no produto (JURKIEWICZ, 1999).

A proteólise resulta em modificações na matriz do queijo, quebrando a rede protéica, contribuindo de maneira expressiva com modificações texturais. Também diminui a atividade de água pela ligação da água livre com grupos carboxila e aumento do pH pela liberação de grupos amina, que facilitam o desprendimento de compostos sápidos durante a mastigação (SOUZA et al., 2001).

As modificações bioquímicas e enzimáticas que atuam intensamente na proteólise agem, conseqüentemente, na textura, que é uma característica importante para estabelecer a aceitação do consumo e qualidade do queijo (GONZÁLEZ et al., 1998).

Propriedades sensoriais dos queijos são determinadas em grande extensão por proteólise, lipólise e glicólise durante a maturação. Estas reações são

influenciadas pelas condições químicas do queijo (atividade de água e pH) e a liberação das enzimas intracelulares microbianas durante a autólise. As atividades catabólicas são causadas por enzimas do leite, coagulantes, culturas e da microbiota nativa (BACHMANN et al., 1999).

1.5. Aspectos higiênico-sanitários na fabricação de queijo Minas frescal

O leite contém diversos tipos de compostos antimicrobianos, sendo os mais importantes os sistemas da lactoferrina e o da lactoperoxidase. Outros compostos antimicrobianos incluem a lisozima, imunoglobulinas específicas e sistemas que se ligam ao ácido fólico e à vitamina B12, tornando-os não biodisponíveis. A lactoferrina é uma glicoproteína que atua como antimicrobiano por seqüestrar o ferro presente. Apesar de em pequena quantidade no leite bovino quanto comparado ao leite humano essa proteína inibe microrganismos aeróbios psicrotróficos que freqüentemente deterioram o leite refrigerado (FRANK, 1997).

O sistema da lactoperoxidase, fator antimicrobiano natural mais efetivo, catalisa a oxidação de tiocianato e a redução simultânea de peróxido de hidrogênio, resultando no acúmulo de hipotiocianato. Conseqüentemente, há oxidação dos grupos sulfidrílicos de proteínas, resultando em inativação enzimática e dano à membrana citoplasmática bacteriana. Bactérias láticas, coliformes e diversos patógenos são inibidos por esse sistema (WOLFSON & SUMNER, 1993). JAY (2000), citou ser este sistema efetivo contra bactérias Gram-positivas psicrotróficas, nas concentrações de 0,5 a 1,0 ppm em lactoperidase, 100 U/mL em H_2O_2 e 0,25 mM em tiocianato. O leite contém normalmente 30 ppm de lactoperidase, 1 a 2 U/mL de H_2O_2 e 0,02 a 0,25 mM de tiocianato.

O objetivo primário da fabricação de queijos foi a de estender o prazo de validade e conservar os nutrientes do leite. Isto se deve tanto à produção de ácido quanto à desidratação (BERESFORD et al., 2001).

Enquanto a fração protéica do leite que precipita com o processamento, dando origem aos diferentes tipos de queijos é composta de caseínas, as

proteínas do soro permanecem solúveis, sendo compostas de β-lactoglobulina, α-lactalbumina e imunoglobulinas (FRANK, 1997).

A microbiota do leite cru é bastante diversificada. Com a pasteurização, esse alimento deixa de possuir uma microbiota típica. Assim sendo, a adição de culturas selecionadas de bactérias láticas durante a elaboração de produtos lácteos é freqüente. Particularmente no caso dos queijos, a adição de cultura lática pode contribuir para suas características (ISEPON & OLIVEIRA, 1995).

Laticínios como os queijos são produtos alimentícios susceptíveis a contaminações microbianas resultantes tanto do leite utilizado como matéria-prima, freqüentemente leite cru, como de contaminações cruzadas no pós-processamento. Essas contaminações cruzadas podem ser de diversas origens, incluindo o ambiente de processamento, utensílios, manipuladores e matérias primas. A presença de *E. coli* em queijo, incluindo sorotipos de *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e enterotoxigênica (ETEC) foi relatada (VARNAM & EVANS, 1991).

AMARAL et al. (1991) apontaram a própria salmoura, freqüentemente empregada na salga de queijos através de imersão, como importante veículo para a contaminação desses produtos alimentícios. No caso do queijo Minas frescal, a imersão em salmoura ocorre por um período de cerca de 5 horas, sendo que é freqüente a sua reutilização. Segundo os autores, essa prática não recomendável encontra amparo na legislação brasileira, que proíbe apenas a utilização de "salmouras turvas, sujas, alcalinas, com cheiro amoniacal, fermentadas ou inadequadas por qualquer razão" (BRASIL, 1980). AMARAL et al. (1991) observaram um aumento de coliformes e de coliformes fecais de zero para cerca de 10^{12} UFC/g com a utilização da salmoura por 21 dias. Segundo os autores, os coliformes fecais passaram de <3 (dia zero) para 10^{6} UFC/g, 10^{8} UFC/g, 10^{10} UFC/g e 10^{12} UFC/g após 3, 6, 9 e 12 dias de utilização da salmoura, respectivamente.

Relatos indicam que queijos do tipo Minas frescal comercializados no Brasil são amplamente contaminados por coliformes fecais. Assim, PEREIRA et al. (1997) observaram, em Belo Horizonte, que 90% das amostras de queijo Minas

frescal analisadas no período de 1996-97 apresentaram coliformes fecais acima dos limites estabelecidos por lei. Paralelamente, ARAÚJO et al. (1997) observaram que 100% das amostras de queijo Minas frescal analisadas, obtidas em supermercados e padarias localizadas na cidade do Rio de Janeiro, revelaram a presença de coliformes fecais em níveis acima dos tolerados. OLIVEIRA et al. (1998) relataram a detecção de coliformes e de coliformes fecais acima dos permitidos em 46,9% e em 9,4% das amostras de queijo Minas elaboradas por 6 fábricas de laticínios localizadas na região nordeste do estado de São Paulo, respectivamente.

Aliado a esse fato, *E. coli* e bactérias patogênicas como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Listeria* spp. e *E. coli* O157:H7 revelaram capacidade de sobreviver ao processamento de alguns tipos de queijo (BARBOSA et al.,1993a,b; BORGES et al., 1990; VIEIRA et al., 1993; REITSMA & HENNING, 1996). CERQUEIRA et al. (1994) relataram a ocorrência de um surto, possivelmente por *Salmonella* spp. e toxina estafilocócica, ocasionado pelo consumo de queijo Minas frescal, no município de Pará de Minas, Minas Gerais.

Paralelamente, relatos sobre a contaminação de queijo Minas frescal por patógenos são freqüentes. Assim, GOMES & GALLO (1995) detectaram a presença de *Staphylococcus aureus* em 22,2% das amostras de queijo Minas frescal analisadas, comercializadas em Piracicaba, com contagens variando de 4,7 x 10^4 a 1,4 x 10^6 UFC/g. SABIONI & MAIA (1998) relataram contagens de *Staphylococcus aureus* superiores a 10^6 UFC/g em 70% das amostras de queijo Minas frescal analisadas, adquiridas no comércio em Ouro Preto, Minas Gerais. SILVA et al. (1998) relataram a mais alta taxa de isolamento *de Listeria monocytogenes* de queijo Minas frescal (41,2%), dentre sete tipos diferentes de queijo analisados, adquiridos no comércio da cidade do Rio de Janeiro. Os autores atribuíram a alta taxa de isolamento desse patógeno ao fato desse queijo Minas frescal ser freqüentemente fabricado com leite cru e em condições higiênicas insatisfatórias, não sendo submetido à inspeção sanitária federal. Anteriormente, DESTRO et al. (1991) haviam detectado *Listeria monocytogenes* em 10% das amostras de queijo Minas frescal analisadas, comercializadas em Campinas.

Testes de rotina para *E. coli* são usados como indicadores de contaminação fecal e indicam a possibilidade de presença de patógenos entéricos como *Shigella* e *Salmonella*. Estes testes são, contudo, também usados como indicadores de *E. coli* O157:H7 devido ao fato desse microrganismo patogênico ser normalmente encontrado no leite cru em contagens muito baixas (LAW, 1999).

1.6. Utilização de culturas láticas na tecnologia de fabricação de queijos

Com a finalidade de repor parte das bactérias láticas eliminadas durante o processo de pasteurização do leite, culturas láticas (denominadas culturas "starter" ou fermentos láticos) são normalmente adicionadas ao leite para a produção de diversos tipos de queijos. Esses fermentos desempenham um papel fundamental, tanto durante a produção quanto durante a maturação dos queijos. Segundo BERESFORD et al. (2001), a microbiota dos queijos pode ser dividida em 2 grupos: fermentos láticos e microrganismos secundários. Os fermentos láticos estão envolvidos na produção de acidez durante a fabricação dos queijos e contribuem para a maturação dos mesmos. Os microrganismos secundários não contribuem para a produção de acidez durante o processo fabril, mas geralmente têm grande influência na maturação. A microbiota secundária compreende as bactérias láticas não "starter" que crescem internamente na maioria dos queijos e outras bactérias, bolores e/ou leveduras, que crescem internamente ou externamente e são usadas exclusivamente em tipos específicos de queijos.

A multiplicação dos fermentos no leite resulta na conversão de lactose a ácido lático, o que irá garantir um pH adequado para a coagulação (HOIER et al., 1999). Este fato resulta na maior rapidez de atuação da renina do coalho quando em meio mais ácido (FURTADO et al. 1980b). Esse fato irá influenciar o pH final da coalhada, o conteúdo final de umidade do queijo, bem como o desenvolvimento de suas características sensoriais e de textura durante a maturação (HOIER et al., 1999).

Bactérias láticas proteolíticas têm revelado exercer um papel importante no desenvolvimento de um sabor e textura balanceados durante a maturação de queijos. As bactérias láticas com atividade proteolítica podem produzir enzimas

como proteinases extracelulares e inúmeras peptidases intracelulares, além de diversos sistemas de transporte de peptídeos. Esses fatores combinam-se para transformar a caseína em um complexo e dar origem a combinações variadas de peptídeos e amino-ácidos que contribuem para a determinação do sabor e da textura do produto final (DALY et al., 1998).

A acidificação direta funciona como método alternativo à adição de culturas, obtendo-se queijos com um maior teor de umidade e maior rendimento de fabricação. Esse método apresenta vantagens em certos casos, como na produção de determinados queijos Mussarela, resultando em um produto com determinadas características funcionais - como o ponto de fusão, mais adequadas (KINDSTEDT et al., 1999).

As culturas láticas empregadas na produção de queijo constituem-se em culturas mesofílicas e termofílicas, com temperaturas ótimas de crescimento de cerca de 30°C e de 45°C, respectivamente. As culturas termofílicas são compostas basicamente de culturas isoladas de *Streptococcus thermophilus* ou associadas a diversas espécies de *Lactobacillus*. As culturas mesofílicas são classificadas em 2 tipos: culturas tipo LD, caracterizadas pela produção de aroma e CO_2 a partir do citrato, e tipo O, pela produção de ácido não acompanhada da produção de gás (HOIER et al., 1999).

As culturas mesofílicas tipo LD, constituídas principalmente de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Lc. lactis* subsp. *lactis* biotipo *diacetylactis* e *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, são empregadas na produção de queijos macios (como Camembert e Port-Salut) e semi-duros (como Gouda, Tilsit e Samso). As culturas mesofílicas tipo O, constituídas principalmente dos microrganismos *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e subsp. *cremoris*, são empregadas na produção de queijos que requerem uma acidificação sem a formação de olhaduras, como os queijos Cheddar, Feta, Cottage (HOIER et al., 1999) e Minas (ISEPON & OLIVEIRA, 1995).

Além de exercerem uma influência considerável sobre as características físico-químicas e sensoriais dos queijos, muitas bactérias láticas podem ser úteis por possuírem atividade inibitória através da criação de um ambiente hostil para os

microrganismos patogênicos e deteriorantes presentes (SHAH, 2000). Essas bactérias podem produzir diversos metabólitos com atividade antimicrobiana. Dentre esses compostos estão incluídos ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, álcoois, diacetil e bacteriocinas (DILLON & COOK, 1994). O efeito antimicrobiano dos ácidos orgânicos como ácido propiônico e ácido lático é devido, tanto à queda do pH abaixo da faixa de crescimento dos microrganismos quanto à inibição metabólica pelas moléculas de ácido não dissociadas (JAY, 2000).

Segundo SHAH (2001) a atividade antimicrobiana observada com o emprego destas bactérias é maior contra bactérias Gram- positivas do que contra bactérias Gram-negativas. Bifidobactérias e *L. casei* são produtoras de L (+) ácido lático, sendo que este enantiômero do ácido lático, além de ter propriedades antimicrobianas, é facilmente metabolizado.

Segundo ALAKOMI et al. (2000) as propriedades antimicrobianas do ácido lático são devidos ao abaixamento do pH e, no caso específico de bactérias Gram-negativas, pela permeabilização da membrana externa resultante da liberação dos lipopolissacarídeos, ocasionando, assim, a perda da viabilidade celular.

A inibição de microrganismos indesejáveis por bactérias láticas é um fator importante na produção de queijo. Na prática, isto significa que a vida de prateleira do queijo Minas frescal é altamente influenciada pela população de bactérias láticas, que é diretamente regulada pelo teor de lactose residual no queijo após o processamento deste. O teor de lactose vai diminuindo conforme os dias de armazenamento se passam, como resultado da ação hidrolítica dos microrganismos presentes e da perda do teor em água do queijo, perda esta que desfavorece a multiplicação das bactérias (WOLFSCHOON-POMBO et al., 1984).

BONASSI et al. (1984) citam um predomínio de produção de ácido acético dentre os ácidos orgânicos voláteis em experimentos em queijos Minas inoculados com bactérias láticas homofermentativas e heterofermentativas e em experimentos nos quais não foi feita inoculação.

Com a emergência dos patógenos psicrotróficos de origem alimentar, a descoberta de novos tipos de processamento e a demanda por produtos “naturais”, as bactérias láticas passaram a ser consideradas como

bioconservantes em potencial (DAVIDSON & HOOVER, 1993; MONTVILLE & WINKOWSKI, 1997). O interesse pelo desenvolvimento de produtos comerciais baseados na utilização de microrganismos como bioconservantes tem sido considerável. Experimentos têm sido feitas no sentido da utilização de culturas bacterianas mistas como bioconservantes em laticínios (DILLON & COOK, 1994).

1.7. Culturas probióticas e seu papel nos alimentos funcionais

O efeito benéfico de determinados tipos de alimentos sobre a saúde do hospedeiro é conhecido há muito tempo. Apesar disso, o estudo desses alimentos, atualmente denominados alimentos funcionais, e de seus componentes responsáveis por esse efeito, tornou-se intenso apenas nos últimos anos.

Segundo ZIEMER & GIBSON (1998), a suplementação de componentes com atividade reconhecidamente benéfica à saúde, como cálcio e vitaminas, constituía os alimentos funcionais de primeira geração. Nos últimos anos, por outro lado, ainda segundo os autores, esse conceito voltou-se principalmente para aditivos alimentares que podem exercer efeito benéfico sobre a composição da microbiota intestinal. Os prebióticos e os probióticos são atualmente os aditivos alimentares que compõe esses alimentos funcionais.

Ocorre que, nas condições normais, inúmeras espécies de bactérias estão presentes no intestino, a maioria delas anaeróbias estritas. Essa composição torna o intestino capaz de responder a possíveis variações anatômicas e físico-químicas (LEE et al., 1999). Essa microbiota intestinal exerce influência considerável sobre uma série de reações bioquímicas do hospedeiro. Paralelamente, essa microbiota, quando em equilíbrio, impede que microrganismos potencialmente patogênicos nela presentes exerçam os seus efeitos. Por outro lado, o desequilíbrio dessa microbiota pode resultar na proliferação de patógenos, com conseqüente infecção bacteriana (ZIEMER & GIBSON, 1998).

Os prebióticos, por sua vez, são ingredientes não digeríveis incorporados aos alimentos no sentido de selecionar determinadas bactérias da microbiota intestinal, através de sua atuação como um substrato seletivo ao nível do cólon (ZIEMER &

GIBSON, 1998; LEE et al., 1999). ZUBILLAGA et al. (2001) refere-se a prebióticos como sendo substâncias como a lactulose, lactitol, xilitol, inulina e certos oligossacarídeos não digeríveis que estimulam seletivamente o crescimento de bifidobactérias no cólon. Aparentemente, dentre as bactérias do cólon, as bifidobactérias são umas das mais eficientes na utilização de carboidratos não digeríveis, fato este que resulta em vantagem competitiva na sua multiplicação em relação a outras espécies quando os prebióticos são consumidos. A sua tolerância ao micro-ambiente ácido formado pela fermentação dos prebióticos e pela produção dos ácidos graxos de cadeia curta como acetato, propionato, butirato e lactato também contribuem para sua seleção (GRITTENDEN, 1999).

Além de atuarem favoravelmente no produto alimentício ao qual foram adicionados, determinadas bactérias láticas e outras bactérias fazem parte dos microrganismos capazes de exercer efeitos benéficos no hospedeiro. São os denominados microrganismos probióticos. Um microrganismo probiótico deve necessariamente sobreviver às condições adversas do estômago e colonizar o intestino, mesmo que temporariamente, através da adesão ao epitélio intestinal (ZIEMER & GIBSON, 1998; LEE et al., 1999).

FULLER (1989) definiu probióticos como sendo suplementos alimentares à base de microrganismos vivos que afetam beneficamente o animal hospedeiro, promovendo o balanço de sua microbiota intestinal. Segundo GOMES & MALCATA (1999), atualmente os probióticos são definidos como microrganismos viáveis (bactérias láticas e outras bactérias ou leveduras aplicadas como células secas ou em um produto fermentado) que produzem um efeito benéfico sobre a saúde do hospedeiro mediante ingestão, através da melhoria das propriedades de sua microbiota autóctone.

HOLZAPFEL et al. (1998) optaram pela definição de probióticos proposta por HAVENAAR et al. (1992), que definiu probióticos como “culturas puras ou mistas de microrganismos vivos (bactérias láticas e outras bactérias ou leveduras aplicadas como células secas ou em um produto fermentado) que quando aplicadas aos animais ou ao homem, têm efeitos benéficos ao hospedeiro promovendo o balanço de sua microbiota intestinal”. Os autores discutem que esta definição é mais ampla e vantajosa, uma vez que não restringe os efeitos

queijo em cada experimento. O rendimento foi expresso em percentagem de gramas de queijo produzidas por 10 L leite segundo a fórmula [(g de queijo produzida / mL de leite) x 100]. Este rendimento é considerado segundo FURTADO, 1999, como rendimento econômico que se refere à quantidade de quilos de queijo produzido por quilos de leite usados na sua produção. A mensuração do rendimento da fabricação do queijo foi feita no dia seguinte a produção, anteriormente à embalagem do queijo.

3.3. Armazenamento e períodos de amostragem

O queijo foi armazenado sob refrigeração (cerca de 5°C) em uma cabine refrigerada (Metalfrio, mod. VB43R, São Paulo, Brasil). As determinações dos parâmetros microbiológicos, de textura instrumental e físico-químicos das amostras foram feitas (em duplicata) no produto em processamento (anteriormente à enformagem), no dia seguinte à fabricação – dia 1 (produto final) – e após 7, 14 e 21 dias de armazenamento. As análises sensoriais foram feitas 7 dias após a fabricação, tendo em vista o tempo necessário para o equilíbrio dos componentes bioquímicos do queijo que interferem no seu sabor e a segurança dos provadores.

3.4. Determinação dos parâmetros microbiológicos

Decorridos os tempos de armazenamento descritos no item 3.3, porções de 25 g de queijo (retiradas em condições de assepsia) foram homogeneizadas com 225mL de água peptonada 0,1% (diluição 10^{-1}), utilizando-se um “Bag Mixer” (Interscience, St Norm, França). Diluições decimais subseqüentes foram preparadas, utilizando o mesmo diluente.

3.4.1. Contagens populacionais de microrganismos probióticos e bactérias láticas totais

Nos queijos processados com a adição de *Lactobacillus acidophilus* (T2 e T3) *e Bifidobacterium lactis* (T3 e T4) foi feita a contagem dessas bactérias probióticas, de acordo com as instruções do fabricante das culturas (Christian Hansen). Para esse fim, alíquotas de 1 mL de cada diluição das amostras foram transferidas para placas de Petri estéreis. Em seguida, foi adicionado ágar MRS-IM (formulação no anexo I) adicionado de maltose, para a contagem de *Lactobacillus acidophilus*, ou de glicose e das soluções estéreis A, B e C (constantes no anexo I) para a contagem de *Bifidobacterium* spp., fundido e resfriado a cerca de 45°C. Após a homogeneização e o endurecimento do ágar, as placas para a contagem de *Lactobacillus acidophilus* foram incubadas em aerobiose a 37°C por 48 horas (T2 e T4) e as placas para a contagem de *Bifidobacterium* spp. foram incubadas em anaerobiose (Sistema de Anaerobiose Anaerogen, Oxoid Inc., Ogdensburg, NY, EUA) a 37°C por 72 horas (T3 e T4).

Para a contagem populacional de bactérias láticas totais, alíquotas de 0,1 mL de cada diluição das amostras foram transferidas para placas contendo ágar DeMan-Rogosa-Sharpe – MRS, (Oxoid) e, feito o espalhamento, incubadas a 30°C por 48 horas (VANDERZANT & SPLITTSTOESSER, 1992; MARSHALL, 1992).

3.4.2. Contagens populacionais de microrganismos indicadores

Alíquotas de 0,1 mL de cada diluição das amostras foram transferidas para placas contendo ágar Baird-Parker – BP (base para ágar Baird-Parker, Oxoid, adicionado de telurito e gema de ovo – suplemento SR054C, Oxoid) e incubadas a 37°C por 48 horas para a contagem populacional de *Staphylococcus* spp.. Alíquotas de 1 mL de cada diluição das amostras foram transferidas para placas Petrifilm^{TM} *E. coli* Count Plates (Petrifilm^{TM}EC, 3M Microbiology, St. Paul, MN, EUA) e incubadas a 37°C por 24 horas, para a contagem de coliformes e de *E. coli*, de acordo com as instruções do fabricante. (VANDERZANT & SPLITTSTOESSER, 1992; MARSHALL, 1992).

3.5. Determinações de parâmetros microbiológicos no leite e durante o processamento dos queijos

No leite empregado como matéria prima e entre as etapas de dessoragem e enformagem no decorrer da produção dos diversos tipos de queijo Minas frescal, foi feita a contagem de coliformes, de *E. coli*, de *Staphylococcus* spp. e de bactérias láticas totais. Durante o processamento dos queijos, também foi feita a contagem de *Lactobacillus acidophilus,* no caso de T2 e T4 e de *Bifidobacterium* spp., em T3 e T4. As análises microbiológicas foram efetuadas como descrito no item 3.4.

3.6. Determinação dos parâmetros físico-químicos dos queijos

Decorridos os tempos de armazenamento sob refrigeração, descritos no item 3.3, foram feitas as determinações de:

- umidade, a partir de 5 g de amostra moída em estufa a vácuo modelo MA 030/12 (Marconi Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP, Brasil) (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985) a 70°C por 12 horas,
- acidez titulável, segundo o INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985),
- pH, em medidor de pH - pH Analyser modelo 300 M (Analyser Comércio e Industria Ltda, São Paulo, SP, Brasil), empregando eletrodo de penetração modelo DME-CF (Digimed, São Paulo, SP, Brasil),
- atividade de água a 25°C em aparelho “Novasina” aw Center (Novasina AG, Zürich, Suiça)

3.7. Determinação do perfil de textura instrumental dos queijos

Decorridos os tempos de armazenamento sob refrigeração, descritos no item 3.3, o perfil de textura foi determinado através de teste de dupla compressão de amostras cilíndricas de diâmetro (2 cm) e altura (3 cm) constantes, utilizando placa

de alumínio retangular de 10 x 9 cm, em analisador de textura TA-XT2 (Stable Micro System, Haslemere, Inglaterra). Os parâmetros empregados foram distância e velocidade de compressão de 6 mm (20% de compressão) e de 2,0 mm/s, respectivamente, e tempo de 5s. Foram analisados os atributos de textura dureza, coesividade, elasticidade, mastigabilidade, gomosidade e adesividade. Os dados foram obtidos através do programa "Texture Expert for Windows" – versão 1.20 (Stable Micro Systems).

3.8. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, utilizando-se um esquema fatorial 2^2x5, constituído de 4 tipos de combinações em termos das culturas probióticas e/ou ácido lático adicionados durante a produção dos queijos (somente ácido lático, ácido lático + *Lactobacillus acidophilus*, ácido lático + *Bifidobacterium lactis*, ácido lático + *Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium lactis*) e de 5 tempos (durante o processamento, 1, 7, 14 e 21 dias após o processamento), com 4 repetições.

O estudo estatístico das variáveis físico-químicas (rendimento, umidade, atividade de água, pH e acidez titulável), das variáveis microbiológicas (população de bactérias probióticas *L. acidophilus* e *Bifidobacterium lactis,* população de bactérias láticas totais, de bactérias do gênero *Staphylococcus* e de coliformes totais) e das variáveis de textura (dureza, coesividade, adesividade, elasticidade, mastigabilidade e gomosidade) segundo tratamento e dia de amostragem foi realizado pela técnica da análise de variância não paramétrica, considerando o modelo com dois fatores, sendo um para populações independentes (tratamentos) e o outro para medidas repetidas (dia de amostragem), e complementados com os respectivos testes de comparações múltiplas (NORMAN & STREINER, 1994).

A comparação de resultados entre as datas de amostragem dentro do mesmo tratamento foi feita através de análise de variância, utilizando-se teste não paramétrico de Friedman, considerando-se um nível de significância $p<0,05$. A comparação de resultados entre os diferentes tratamentos fixando-

se o dia de amostragem foi conduzida utilizando-se o teste Kruskal – Wallis, considerando também um nível de significância de 5% (GOMES, 1987; NORMAN & STREINER, 1994; BARROS NETO et al., 1995; BEIGUELMAN, 1996; COSTA NETO, 1998).

3.9. Análise sensorial

A análise sensorial dos queijos foi feita no 7º dia, tendo em vista o tempo necessário para o equilíbrio dos componentes bioquímicos do queijo que interferem no seu sabor e a segurança dos provadores, conforme descrito no item 3.3. A referida análise foi conduzida segundo o delineamento de ordenação em blocos casualizados com 40 provadores não treinados, empregando-se aceitação/preferência. Os dados foram tratados via teste não paramétrico de Friedman, seguido de comparação múltipla e do coeficiente de concordância de Kendall (SHIROSE & MORI, 1994; LAWLESS & HEYMANN, 1999).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores empregados para a construção dos gráficos (figuras 2 a 15 e 17 a 21 nas páginas 57 a 66) são resultados da média de 4 produções de cada tratamento proposto.

Para a indicação das significâncias das comparações, utilizou-se letras latinas maiúsculas e minúsculas, conforme o interesse da discussão. Ou seja, na comparação dos tratamentos fixado o dia de amostragem, adotou-se as letras minúsculas e, nas comparações dos dias de amostragem em cada tratamento, as letras maiúsculas.

As informações qualitativas do procedimento estatístico para os dados foram apresentados em tabelas (tabelas 1 a 3 nas páginas 54 a 56) contendo a mediana, a semi-amplitude total e as letras indicando as significâncias.

Para a interpretação da leitura dos resultados, deve-se proceder da seguinte maneira:

i) Comparação entre os tratamentos - duas medianas seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula, o mesmo dia de amostragem para os 4 tratamentos estudados (T1, T2, T3 e T4), não diferiram entre si ao nível de significância de 5%;

ii) Comparação entre os dias de armazenamento para um mesmo tratamento - duas medianas seguidas de pelo menos uma mesma letra maiúscula, dentro de um mesmo tratamento (T1, T2, T3 ou T4), não diferiram entre si ao nível de significância de 5%.

4.1. Rendimento

Segundo FURTADO, 1999, existem dois tipos de rendimento, o chamado rendimento econômico, que se refere à quantidade de quilos de queijo produzido por quilos de leite usados na sua produção, e o rendimento técnico. Este último se refere ao aproveitamento dos constituintes do leite que são transferidos ao queijo, ou seja, determinação do aproveitamento de elementos como a gordura, proteínas totais (ou somente caseína), extrato seco total, desengordurado entre outros. No presente trabalho foi calculado o rendimento denominado econômico de acordo com a definição acima.

A figura 2 mostra o rendimento médio de obtenção dos queijos processados segundo os diferentes tratamentos. Os valores são expressos em percentagem. Na análise dos dados obtidos, observa-se que o tratamento controle (T1) e o tratamento T3 tiveram rendimentos médios semelhantes (cerca de 23%), porém superiores aos demais, enquanto o tratamento T4 revelou o menor rendimento médio (média de 22,2%). Apesar destas diferenças visuais, os dados não se mostraram diferentes estatisticamente ($p>0,05$) (tabela 1). Os rendimentos obtidos são considerados altos em relação a valores descritos na literatura para queijos processados segundo tecnologia com emprego de cultura mesofílica tipo O (*Lactococcus cremoris* + *Lactococcus lactis*), que é em torno de 16 – 17% (FURTADO et al. 1980a, b; FURTADO, 1999). Este acréscimo é devido a um maior teor de umidade encontrado nos queijos processados por adição de ácido lático, conforme observado por FURTADO et al. (1980a, b).

No presente trabalho, empregou-se leite homogeneizado como matéria prima. Segundo EMMONS et al. (1980), o fato de o leite ter sofrido o processo de homogeneização da gordura, faz com que este tenha a taxa de sinerese (expulsão do soro da rede de paracaseinato de cálcio) fortemente diminuída. O comportamento da sinerese do coágulo é determinado por aspectos estruturais e da cinética das interações proteína-proteína e proteína-gordura. As maiores forças de interação entre as proteínas durante a coagulação enzimática do leite são interações hidrofóbicas. Contudo, forças eletrostáticas e pontes de hidrogênio contribuem com a estabilidade das interações. Estas mudanças nas características físico-químicas do leite afetam as forças intermoleculares envolvidas nas interações proteína-proteína (LOPEZ & DUFOUR, 2001). O fato

do leite ter sofrido homogeneização pode estar aumentando sobremaneira o rendimento alcançado nas produções dos queijos estudados no presente trabalho quando comparados aos dados experimentais de FURTADO et al. (1980a, b) e outros estudos de nossos laboratórios (dados não mostrados).

4.2. Umidade

A figura 3 mostra os valores de umidade ao longo do armazenamento dos queijos. Observa-se inicialmente valores semelhantes - em torno de 68% - para os queijos T2 e T4 no dia 1, sendo que os mesmos mantêm-se próximos nos dias subseqüentes, chegando ao dia 21 com valores médios de 63%. T1 e T3 tiveram comportamento semelhante no dia 1 (produto final) ao dia 14, diferindo somente no dia 21. Os queijos T1 e T4 e os queijos T2 e T3 tiveram perfil de pH semelhantes entre si inicialmente (figura 4), ligeiramente inferior para os queijos T1 e T3, quando comparados, respectivamente a T2 e T4. Essa observação indica que o pH influencia na retenção de umidade em queijos, promovendo uma maior desmineralização da rede protéica nas coalhadas mais ácidas, o que permite, por sua vez, uma maior dessoragem espontânea do queijo (FURTADO 1980b). BONASSI et al., (1983) obtiveram resultados semelhantes quando estudaram queijos Minas com e sem adição de bactérias láticas. Os autores obtiveram valores de umidade maiores para queijos não adicionados de culturas láticas iniciadoras e concluíram que a presença de maiores quantidades de ácido lático foi o fator que contribuiu para a eliminação do soro durante e logo após a elaboração dos queijos. Estatisticamente, os dados de umidade foram iguais quando comparados os tratamentos nos mesmos dias ($p>0,05$). Porém, quando analisados os dados dos tratamentos isolados, observa-se que os queijos T1 foram os de menor variação no tempo enquanto T2, T3 e T4 apresentaram variações semelhantes entre si (figura 3, tabela 1). Para todos os queijos estudados houve diminuição significativa na umidade entre os dias 1 e 7 ($p<0,05$).

Apesar das variações significativas de umidade ocorridas durante o período de armazenamento para todos os tratamentos, não houve nenhuma variação entre os tratamentos, ou seja, eles foram estatisticamente iguais nas mesmas datas de amostragem.

4.3. Atividade de água, pH e acidez titulável

Os valores de atividade de água (a.a.) obtidos (tabela 1) mostram uma proximidade inicial entre os valores médios dos queijos controle (T1) e com *Lactobacillus acidophilus* (T2), sendo estes os valores mais elevados. Os queijos T3 e T4 revelaram também perfis semelhantes porém não tão próximos quanto os demais, sendo que os valores de a.a. do T3 foram sempre os menores. O perfil geral da atividade de água foi de queda na primeira semana de armazenamento, estabilidade na semana seguinte e queda novamente na ultima semana de amostragem, porém isto não foi verificado para a terceira semana dos queijos T4, que mostrou aumento no valor de a.a.. Em nenhum ponto se observou um valor de a.a. que pudesse funcionar como barreira para a multiplicação de bactérias deteriorantes (a.a. mínimo de 0.90). Bactérias patogênicas como *E. coli* e *S. aureus* têm valores de atividade de água mínima para sua multiplicação de 0.96 e 0.86, respectivamente (FRANCO & LANDGRAF, 1996; JAY, 2000). Estatisticamente, os valores de atividade de água não diferiram ($p>0,05$) entre os tratamentos, fixada a data de amostragem. Segundo COGAN (2000), uma queda nos valores de a.a. pode ocorrer pela perda de água por evaporação, salga e pela hidrólise das proteínas para peptídeos e amino-ácidos e triglicerídeos para glicerol e ácidos graxos. A hidrólise de cada peptídeo ou ligação éster requer uma molécula de água.

A diminuição dos valores de atividade de água pode ter sido ocasionada por proteólise, mas isto somente é uma hipótese baseada em relatos de literatura, visto que esta análise não foi feita (FOX et al., 2000).

Quanto aos dados de pH, não se observou até o último dia de análise uma queda tão acentuada que pudesse vir a ser um fator limitante para a proliferação de bactérias patogênicas como *E. coli* ou *S. aureus* (pH mínimo de 4,5 e 4,0 e máximo de 9,0-10,0 e 9,8 respectivamente) (FRANCO & LANDGRAF, 1996; JAY, 2000) ou probiótica como *L. acidophilus* (pH min. 4,0 e pH max. 7,0) (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Segundo BERESFORD et al. (2001), o pH ótimo para a multiplicação das bactérias mais comuns é em torno do neutro e a multiplicação destas é deficiente em valores de pH menores que 5.0. Os principais ácido orgânicos detectados em queijos são ácido lático, ácido acético e ácido propiônico, os quais têm pK_as (constante de dissociação) de 3.08, 4.75 e 4.87, respectivamente. Assim, teoricamente, o ácido lático é menos efetivo que o ácido acético ou ácido propiônico no abaixamento do pH (quando em mesma concentração) no queijo.

O pH ainda tem grande influência nas reações de formação da coalhada, visto que o cálcio e o fosfato se dissociam das micelas de caseína quando há um abaixamento do pH, o que determina o estado destas substâncias e de outros minerais na massa do queijo formado. Quanto maior o pH, menor é a desmineralização e maior é a elasticidade da massa do queijo formado. Influência ainda é vista na taxa de sinerese da coalhada encontrada, com conseqüência na umidade final do produto, indicando que, quanto mais baixo o pH, maior a expulsão de soro e menor a umidade final (LOMHOLT & QVIST, 1999). Na verificação dos dados referentes às afirmações acima, isto não foi observado em todas as datas de amostragem. As diferenças não foram detectadas como estatisticamente significativas ($p>0,05$) entre os tratamentos em nenhuma das datas de amostragem, e dentro dos tratamentos só foi verificada diferença para os queijos T1 e T2 (tabela 1).

Quanto aos valores de acidez titulável expressos em ácido lático (figura 5, tabela 1), observou-se uma predominância de produção de acidez inicial para os queijos T3 (Bb-12) e final para os queijos T2 (LA-5), porém essas diferenças não foram significativas ($p>0,05$). Não se observou, porém, que os queijos T3 inicialmente e os T2 no final, tenham revelado um valor de pH menor (figura 4). Isto pode ter acontecido por algum fator de tamponamento do meio como liberação de aminas pela proteólise.

Segundo JAY (2000), na determinação da quantidade de ácidos orgânicos em alimentos, a acidez titulável é mais expressiva que o pH isolado, uma vez que a medição do pH é dada pela concentração de íons hidrogênio e os ácidos orgânicos podem não estar completamente dissociados. Ainda segundo o

autor, a acidez titulável é o melhor indicador da quantidade de acidez presente em alguns produtos alimentícios.

4.4. Evolução dos perfis das populações microbianas

Populações microbianas foram determinadas na matéria prima, no queijo em processamento, no produto final (dia 1) e 7, 14 e 21 dias após a fabricação, onde os queijos permaneceram armazenados a 5°C.

4.4.1. Evolução das populações de microrganismos probióticos e bactérias láticas totais

Nas figuras 6 e 7, encontram-se as curvas demonstrativas das evoluções das populações de microrganismos probióticos *L. acidophilus* e *B. lactis* respectivamente. Tanto para a cepa LA-5 como para a cepa Bb-12, obteve-se um pequeno, porém melhor desenvolvimento das culturas adicionadas no queijo T4, para o qual os dois microrganismos foram adicionados ao mesmo produto, em co-cultura. Na comparação entre as espécies probióticas dos queijos T4 (figura 8), deve ser ressaltado que essa diferença foi a favor da cepa LA-5 em relação à cepa Bb-12, da primeira à última data de amostragem. Os dados colhidos mostram que nestes queijos (T4), ambos probióticos tiveram desenvolvimento adequado a serem considerados produtos probióticos.

Na avaliação dos dados estatísticos, observa-se que tanto para *L. acidophilus* como para *B. lactis* não houve variação dentro dos tratamentos ($p>0,05$), ou seja, ao longo de armazenamento. Somente houve diferença significativa quando comparados os tratamentos na mesma data de amostragem ($p<0,05$), sendo, de maneira geral, o T4 o de melhor expressão (tabela 2). Tal significância não é visível quando os dados são levados em consideração somente do ponto de vista microbiológico, por serem os valores populacionais muito próximos. Como o teste estatístico leva em consideração

as medianas e os desvios padrão, situações como falsas significâncias podem ser vistas, mas devem ser descartadas. As populações destes microrganismos revelaram-se sempre de acordo com valores populacionais recomendados para um produto probiótico - 10^6 UFC/g. O referido valor é sugerido como mínimo para produção de efeitos benéficos à saúde do hospedeiro (LEE & SALMINEN, 1995; BLANCHETTE et al., 1996 e SHAH & RAVULA, 2000). NAIDU & CLEMENS (2000) sugeriram a necessidade de uma concentração mínima de 10^5 UFC/g do microrganismo probiótico no produto final para que se tenha efeito probiótico.

No presente trabalho, quando considerados os tratamentos com as cepas isoladas, têm-se resultados menos expressivos nas contagens populacionais de ambos microrganismos probióticos, exceto para o 14º dia para *Bifidobacterium lactis*, que apresentou população ligeiramente maior nesta data de amostragem (figura 7). Esse fato, possivelmente ocorreu por ter havido efeito sinérgico entre as culturas probióticas quando em co-cultura, visto que nos queijos T2 (LA-5) houve somente manutenção da população do *Lactobacillus acidophilus*, enquanto que nos queijos T4 houve ligeiro acréscimo populacional. Nos queijos T3 (Bb-12), não houve um desenvolvimento das populações bacterianas, mas somente uma sobrevivência das mesmas nas condições ambientais (figuras 6, 7 e 8).

O potencial de óxido redução do leite é em torno de + 150 mV, enquanto o do queijo esta em torno de – 250 mV. O mecanismo de queda no potencial redox no queijo não é ainda totalmente esclarecido, porém provavelmente se dá pela fermentação do lactato pelas bactérias iniciadoras na sua multiplicação. A conseqüência disto é a formação de um ambiente essencialmente anaeróbio que promove a multiplicação de microrganismos anaeróbios estritos ou facultativos (BERESFORD et al. 2001). Esta característica do produto tende a favorecer a multiplicação de *Bifidobacterium lactis* se estabelecidas estas condições ambientais, o que possivelmente não é a realidade para o queijo em questão, visto a presença de inúmeras olhaduras mecânicas. Tais olhaduras mecânicas podem estar relacionadas ao fato de que neste tipo de queijo, no processo de enformagem, não há prensagem subseqüente. Conseqüentemente, estando a temperatura desta massa

coalhada relativamente baixa, não há uma perfeita fusão dos grânulos da coalhada, permitindo assim uma retenção de ar no produto final. De acordo com SVENSSON (1999), bifidobactérias são anaeróbios estritos, porém existem vários graus de sensibilidade ao oxigênio dissolvido no meio. O uso de embalagens impermeáveis ao oxigênio ou a desaeração do leite anterior à produção dos queijos, pode ajudar na sobrevivência das bifidobactérias e também dos lactobacilos. A incorporação do *S. thermophilus* também pode ser útil neste sentido devido à sua alta capacidade de utilização do oxigênio dissolvido no meio.

Segundo SHAH (2001), *Lactobacillus acidophilus* e bifidobactérias se multiplicam vagarosamente no leite devido à falta de atividade proteolítica. Os autores estudaram os perfis proteolíticos de diversas bactérias e concluíram ser *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* mais proteolíticos que as cepas de *L. acidophilus* e bifidobactéria. As bactérias relatadas como possuidoras de maior atividade proteolítica, têm em comum a produção de grandes quantidades da enzima β-D-galactosidase. Enzimas proteolíticas são requeridas para a degradação das caseínas do leite em oligopeptídeos, que são degradados por peptidases em peptídeos e aminoácidos. Efeitos estimulantes à multiplicação das bifidobactérias na presença de *L. delbrueckii bulgaricus* têm sido observados e atribuídos à atividade proteolítica deste lactobacilo, que aumenta a disponibilidade dos aminoácidos valina, glicina e histidina no produto (SVENSSON, 1999). Segundo SHAH (2001), o leite não contém em suficiente concentração aminoácidos livres e peptídeos para permitir a multiplicação das populações de bactérias láticas, particularmente bactérias como *L. acidophilus* e bifidobactérias.

Segundo OKAZAKI et al. (2001a, b), queijos Minas frescal adicionados de cultura ABT (Chr. Hansen), composta dos microrganismos *Lactobacillus acidophilus* (LA-5), *Streptococcus thermophilus* e *Bifidobacterium lactis* (Bb-12), tiveram contagens populacionais de microrganismos probióticos em alta concentração durante todo o período de armazenamento, tendo permanecido sempre acima de 10^6 UFC/g. A população de *L. acidophilus* diminuiu de 10^8

(durante a produção) para 10^6 (1 dia após a produção), permanecendo constante durante os 7 primeiros dias de armazenamento, elevando-se posteriormente para 10^7-10^8 UFC/g. Para *Bifidobacterium* spp. o perfil populacional permaneceu constante (10^6 – 10^7) durante todo o período de armazenamento. A população de *St. thermophilus* (presente para fins tecnológicos) permaneceu constante a 10^8 UFC/g.

DAVIDSON et al. (2000) testaram "frozen yoguhrt" com *B. longum e L. acidophilus* com a fermentação cessando em pH 5,6 e quando a acidez atingia 0,15% a mais que em relação ao seu valor inicial. O produto foi estocado por 11 semanas a –20°C e os autores observaram que o produto foi um excelente veículo para a incorporação das cepas probióticas, cuja população se manteve entre 6,5 e 7,2 log UFC/g durante todo o período de armazenamento. ALAMPRESE et al. (2002) *adicionaram Lactobacillus johnsonii* La1 em sorvete produzido com diferentes concentrações de açúcar (15 e 22%) e gordura (5 e 10%). Os autores observaram que a população de bactérias probióticas manteve-se alta durante os oito meses de estocagem, atingindo níveis ao redor de 7 log UFC/g e que a adição desta cepa não alterou a característica estrutural do produto ao longo do armazenamento.

O fato de haver presença pequena de oxigênio dissolvido na massa do queijo já enformado e a ausência de bactérias com atividade proteolítica intensa podem, no presente trabalho, ser responsabilizadas pelo não aumento das populações de bactérias probióticas. Essa observação tem como base o fato de que fatores intrínsecos propícios foram observados nos diferentes experimentos realizados (pH, atividade de água, acidez e umidade).

Em geral, bactérias do gênero *Lactobacillus* sobrevivem melhor às condições de baixo pH e teores de oxigênio quando comparadas às bifidobactérias. Algumas cepas de bifidobactérias podem produzir mais de 0,4g de ácido acético por litro, o que pode influenciar adversamente no sabor do produto. É relatado que esta produção de ácido acético pelas bifidobactérias pode estimular o crescimento populacional do *L. acidophilus* (SVENSSON, 1999).

Resultados semelhantes aos do presente trabalho têm sido descritos na literatura quanto à sobrevivência de bactérias probióticas incorporadas a produtos lácteos. Assim, VINDEROLA et al. (2000) relataram que cepas de *L. acidophilus, Bifidobacterium spp., B. bifidum, B. longum* e *L. casei* tiveram boa manutenção em queijo fresco argentino, produzido com leite ultrafiltrado e com a adição de bactérias láticas iniciadoras durante o seu processamento. Por outro lado, BLANCHETTE et al. (1995) obtiveram baixa recuperação de *B. infantis* após 10 dias de fabricação no queijo Cottage.

GOMES et al. (1998) testaram o emprego de *Bifidobacterium lactis* e *L. acidophilus* em queijo tipo Gouda e observaram que as cepas probióticas sobreviveram bem durante o período de armazenamento de 9 semanas, inclusive quando a concentração de sal aumentou. GOMES & MALCATA (1998) verificaram a possibilidade da produção de queijo caprino contendo *B. lactis* e *L. acidophilus* e concluíram sobre a viabilidade deste produto como veículo para as cepas probióticas, visto que as populações permaneceram acima do recomendado de 6 log UFC/g ao longo dos 70 dias de armazenamento.

Em estudo conduzido por Mc BREARTY et al. (2001), a cepa de *B. lactis* Bb-12 e uma cepa de *B. longum* foram testadas quanto à viabilidade em queijos Cheddar. Os autores relataram que quando inoculados no leite para a acidificação deste no procedimento de fabricação do queijo, a combinação de Bb-12 + *L. lactis* subsp*. cremoris* foi a que produziu acidificação mais rápida do produto, resultando, entretanto em um produto de baixa qualidade. Somente *B. lactis* resistiu às condições ambientais por seis meses de maturação, apresentando contagens populacionais acima de 8 log UFC/g ao final das amostragens.

SHAH e RAVULA (2000) produziram iogurtes com *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* spp. em diferentes concentrações de sacarose (0,4, 8, 12 e 16%) e não observaram diferença na contagem inicial dos microrganismos probióticos. Foi verificado decréscimo populacional das cepas probióticas ao longo do armazenamento somente nos tratamentos com 12 e 16% de açúcar.

Em estudo conduzido em iogurte adicionado de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* spp. por SHAH & LANKAPUTHRA (1997), foi determinada a atividade da enzima β-galactosidase antes e depois da destruição das células de *L. delbrueckii bulgaricus e* determinado o comportamento das bactérias probióticas inoculadas. Observou-se que no iogurte com bactérias iniciadoras destruídas (sonicadas), houve melhor desenvolvimento de bactérias probióticas (1 a 2 log), Os pesquisadores creditaram esse melhor desempenho à maior atividade proteolítica no produto com as células de *L. delbrueckii* destruídas, devido à liberação de β-galactosidade destas e/ou à menor quantidade de peróxido de hidrogênio produzido durante a fermentação.

DAVE & SHAH (1998) também estudaram a viabilidade de *L. acidophilus* e bifidobactéria em iogurte, porém este adicionado de cisteína, soro em pó, concentrado de proteína de soro, hidrolisado ácido de caseína ou triptona. Os autores observaram que a presença da cisteína aumentou a viabilidade de *L. acidophilus* e, quando o pH atingiu 4,5 na formulação com soro em pó, houve decréscimo de mais de 3 ciclos logarítmicos na população de bifidobactéria. Dentre os aditivos testados, o que mais aumentou a viabilidade das bifidobactérias foi o concentrado de protéico de soro. Contudo, o hidrolisado ácido de caseína e a triptona também foram úteis nesse sentido.

Na figura 9, estão expostos os perfis das populações de bactérias láticas totais em todos os queijos. Há um grande acréscimo populacional do leite ao queijo em processamento nos queijos T2, T3 e T4, possivelmente devido à adição das culturas probióticas e um aumento em menor escala para os queijos T1 (controle). Os referidos aumentos são atribuíveis ao binômio tempo x temperatura do processo fabril do queijo, fatores que possibilitam o aumento das populações destas bactérias neste alimento rico em nutrientes. Estatisticamente, todos os tratamentos se mostraram iguais ($p>0,05$) quando fixados os dias de amostragem (tabela 2). Após o processamento, observaram-se pequenas variações nas populações, com oscilações para os diferentes períodos de armazenamento e amostragem porém, em todos os tratamentos, as populações após 21 dias revelaram-se de aproximadamente 10^7 UFC/g. As variações observadas dentro dos tratamentos, somente foram significativas

para os queijos T1 ($p<0,01$) entre a produção e o dia 1 e para os queijos T4 ($p<0,05$) entre o leite e a produção.

4.4.2. Evolução das populações de microrganismos indicadores

A figura 10 evidencia os perfis de populações microbianas de *Staphylococcus* spp. em todos os queijos estudados, onde se observam valores populacionais muito próximas até o queijo em processamento, seguido de mínimo decréscimo na semana seguinte para os queijos adicionados das duas espécies probióticas (T4) e retomada de aumento populacional ao 14º dia. Houve perfil de estabilidade para os queijos adicionados de LA-5 (T2) e controles (T1) até o 14º dia, sendo que ao 21º dia a população em T2 permanecia constante e para T1 houve grande aumento. Para os queijos T3 (Bb-12), a população foi estável somente até o 7º dia, sendo que nas datas seguintes apresentou um perfil de aumento das populações. Na avaliação dos testes estatísticos, fixando-se os dias de amostragem, não foram detectadas diferenças entre os tratamentos ($p>0,05$). Para a análise estatística ao longo do armazenamento, somente houve diferença estatística ($p<0,005$) para os queijos T3, entre a produção e o dia 1 e deste dia para os demais dias de amostragem (tabela 2).

Segundo SHAH (2001), cepas de *L. acidophilus* e *L. casei* produzem como produto final do seu metabolismo fermentativo, principalmente ácido lático, enquanto as bifidobactérias produzem ácido acético e ácido lático na proporção molar de 3:1. Assim, seria de se esperar que, no presente trabalho, a adição de bifidobactérias nos tratamentos 3 e 4 criaria um fator inibitório para as bactérias indesejáveis, aparentemente maior que o observado para as formulações adicionadas somente de *L. acidophilus* (T2) ou controle não inoculado (T1), devido ao poder de dissociação deste ácido produzido. Porém nos queijos adicionados somente de Bb-12 (T3), a população de *Staphylococcus* spp. aumentou significativamente no início do período de amostragem, enquanto que nos queijos adicionados de *L. acidophilus* (T2 e T4), praticamente não foi observado aumento desta população (figura 10),

possivelmente devido ao fato de a acidez não ter demonstrado variação significativa no T3, enquanto que houve aumento nos valores de acidez para os queijos T2 e T4. Segundo HASSAN & FRANK (2001) diversas bactérias do gênero *Lactobacillus* são produtoras de bacteriocinas, e cepas de *L. acidophilus* foram descritas como tal. Porém essa informação não foi confirmada para a cepa utilizada neste trabalho.

BRASHEARS & DURRE (1999) testaram a ação antagonista de *Lactobacillus lactis* contra *Salmonella* spp. e *E. coli* O157:H7 durante estocagem refrigerada em meio de cultura, observando que este microrganismo probiótico não foi efetivo no controle dos microrganismos patogênicos empregados. AGUIAR et al. (2001) produziram queijo de coalho maturado a partir de leite bovino e caprino e obtiveram para estes valores dentro dos padrões microbiológicos estabelecidos pela legislação brasileira para *Staphylococcus aureus* e coliformes fecais.

Na figura 11, onde estão expostos os gráficos do comportamento de coliformes totais, é observado perfil de aumento da população de coliformes totais para os queijos controle (T1), chegando estes queijos às populações mais elevadas de todos os tratamentos (em torno de 10^5 UFC/g ao 21º dia de armazenamento). Os queijos T1, únicos em que foi não feita a adição de nenhum tipo de cultura, foram os únicos queijos que mostraram diferença significativa ($p<0,05$) ao longo do armazenamento (tabela 2). Isto pode explicar parcialmente o baixo valor de pH encontrado para esses queijos (figura 4) quando em comparação com os demais, uma vez que os coliformes são heterofermentativos e têm como produto de seu metabolismo ácido lático e acético entre outros (FOX et al. 2000). Observa-se ainda leve aumento da população de coliformes totais nos 7 primeiros dias para os queijos T3 e T4 e estabilidade nas populações para o tratamento 2. Nos dias seguintes foi observada estabilização para as contagens populacionais nos queijos T3 e T4 e aumento mais acentuado da mesma para os queijos T2, perfil este mostrado até o 21º dia.

Em nenhum dos queijos estudados, foi detectada a presença de *E. coli* acima dos limites de detecção do método de análise empregado. A legislação

vigente no Brasil para queijos de muito alta unidade, como é o caso do queijo Minas frescal, tem como limites máximos a presença de 5 x 10^2 UFC/g de coliformes a 45ºC, 5 x 10^2 UFC/g de *Staphylococcus* coagulase positiva, ausência em 25 g de *Salmonella e Listeria monocytogenes* (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2001b).

4.4.3. Análise conjunta das evoluções das populações de microrganismos probióticos, bactérias láticas e bactérias indicadoras nos diferentes queijos estudados

A figura 12 evidencia os perfis de populações microbianas de coliformes totais, bactérias láticas totais e *Staphylococcus* spp. para os queijos T1 (controle), onde as bactérias indicadoras, particularmente os coliformes, alcançaram o maior desenvolvimento médio dentre os queijos estudados. Tais resultados se deram pela ausência de um sistema de bioproteção adequado como ocorre nos queijos adicionados de bactérias láticas. A contagem populacional das bactérias láticas totais nesse tratamento chegou ao topo de aproximadamente 10^7 UFC/g no dia 1 após a produção e estabilidade nas populações nos dias seguintes. Lembra-se que nestes queijos não foram adicionados de nenhum tipo de bactéria. Logo o aumento observado entre o leite e o dia 1 após a produção para bactérias láticas, se deve exclusivamente à multiplicação das bactérias láticas presentes no leite na temperatura e tempo do processo.

Em relação aos perfis microbianos do queijo adicionado de cultura probiótica de *L. acidophilus* – T2 (figura 13), observa-se um aumento inicial na contagem populacional das bactérias láticas totais acelerado até o dia 1, chegando ao topo de $\pm$ 10^7 UFC/g, estabilizando na semana seguinte e voltando a aumentar lentamente nas datas seguintes vindo a encerrar o 21º dia em $\pm 10^8$ UFC/g. Para a população do microrganismo probiótico, exceto entre o queijo em produção e o dia 1, não houve mudança visível durante todo o período de armazenamento, não indicando portanto aumento nem decréscimo na população inicialmente introduzida. Referente aos microrganismos

indicadores (coliformes totais e *Staphylococcus* spp.), observou-se populações relativamente baixas e estáveis ao longo do tempo, sendo que *Staphylococcus* spp. partiu de 2 log UFC/g para 3 log UFC/g no 21º dia. Estas contagens populacionais mais baixas devem-se inicialmente à baixa carga inicial de células viáveis e à maior competição encontrada por estas quando da adição da cultura probiótica, ou ainda, à produção de compostos antimicrobianos.

Na figura 14, encontra-se confrontados os perfis de multiplicação das bactérias láticas totais, de coliformes totais, de *Staphylococcus* spp. e da cultura probiótica *Bifidobacterium* spp. nos queijos T3. Houve aumento da população de bactérias láticas totais até o 14º dia e depois deste um período de estabilidade até a data final de 21 dias. A curva da espécie probiótica usada no experimento se mostrou estável com poucas inclinações ao longo do tempo. Para *Staphylococcus* spp., a variação média obtida foi estatisticamente significativa ($p<0,005$) tendo mostrado perfil de aumento durante as datas de amostragem. A população de coliformes totais também se mostrou com leve perfil de aumento, porém não estatisticamente significativo ($p>0,05$).

Na análise da figura 15, têm-se as populações microbianas para o queijo adicionado das duas espécies probióticas - *L. acidophilus* e *B. lactis* - (T4). Os perfis de multiplicação de ambas bactérias probióticas se assemelharam neste tratamento, beirando sempre a casa de 10^6 UFC/g. Porém com valores ligeiramente superiores nas contagens populacionais de *L. acidophilus* e *B. lactis* que nos queijos T2 e T3, respectivamente, possivelmente devido a um efeito sinérgico entre as culturas probióticas empregadas. As bactérias láticas totais alcançaram valores médios de 7 log UFC/g durante todas as datas de análise. A contagem populacional média de *Staphylococcus* spp. partiu de 2 log UFC/g para aproximadamente 4 log UFC/g no 14º dia, enquanto que a população de coliformes totais partiu de <10 log UFC/g para aproximadamente 3 log UFC/g.

4.5. Evolução dos perfis de textura instrumental

A figura 16 mostra a curva típica de análise do perfil de textura obtida para o queijo Minas frescal, empregando-se o analisador de textura TA-XT2 (Stable Micro Systems) e os parâmetros usados para o cálculo posterior dos atributos de textura Dureza (H), Coesividade (A_2/A_1), Adesividade (A_3), Elasticidade (T_2/T_1), Mastigabilidade (H x (A_2/A_1) x (T_2/T_1)) e Gomosidade (H x (A_2/A_1) x 100).

A dureza é um atributo da textura que representa a força requerida para comprimir o queijo entre os dentes molares ou entre a língua e o palato (ponto de deformação ou penetração) (FOX et al., 2000) (H) (figura 16). Este atributo é altamente influenciado pela proteólise durante o armazenamento do queijo, uma vez que o processo de proteólise quebra a microestrutura do queijo quando faz a hidrólise da rede protéica presente (TUNICK et al. 1997). Segundo FOX (1989), a proteólise da α-s_1-caseína – proteína responsável pela estrutura da matriz de queijos - é resultado da ação do coagulante residual, que resiste a condições de temperatura mais elevadas, porém não extremas.

Assim sendo, o esperado quando se tem proteólise, é a diminuição nos valores de dureza, assim resultando em um perfil de queda nos valores absolutos, queda esta não observada nos tratamentos propostos, exceto na última data de análise dos queijos T1 (figura 17). Apesar disto, este valor não foi estatisticamente menor ($p>0,05$) em comparação com as datas anteriores (tabela 3). A possível justificativa para este aumento de dureza pode estar na diminuição da umidade dos queijos durante o período de armazenamento refrigerado (figura 3) associado à pequena ou ausente proteólise (análise não realizada). Na análise dos dados estatísticos para o referido parâmetro de textura (tabela 3), tem-se diferença entre os tratamentos analisados somente no 7º dia de amostragem ($p<0,05$), onde o T1 foi diferente de T2 e de T4 e T3 igual a todos, enquanto que os queijos T2 foram iguais a T3 e T4 ($p>0,05$). Para a análise estatística dos tratamentos ao longo do armazenamento, observa-se para todos os queijos estudados um aumento significativo ($p<0,05$) entre o dia 1 e o dia 7 de amostragem e ainda outro aumento significativo para os queijos T3 entre o dia 7 e dia 14 de amostragem. Sendo assim, os queijos

adicionados de *B. lactis* isoladamente (T3) revelaram um comportamento mais heterogêneo com relação ao aumento da dureza durante o armazenamento, quando comparado aos demais.

A coesividade é definida como a extensão que o queijo pode ser deformado até que haja ruptura (FOX et al., 2000). Este dado é calculado pela razão entre a área da segunda compressão e a área da primeira compressão (A_2/A_1) (figura 16). Esse parâmetro indica o quanto da microestrutura da rede protéica do queijo foi quebrado durante o procedimento de análise. Os valores obtidos (figura 18) mostram um aumento considerável nos valores durante a primeira semana com posterior estabilização do perfil, exceto para a última data de amostragem do queijo T2, o qual teve redução neste parâmetro, porém somente em uma das produções, o que pode ter sido resultado de falhas de amostragem ou procedimento de análise, sendo que, se a média for feita sem este último valor (repetição 3), este valor seria 0,79, dando ao T2 o mesmo perfil dos outros queijos estudados. O referido aumento indica que o período da primeira semana proporcionou alterações estruturais no queijo de importância maior que as semanas subseqüentes. Este aumento na primeira semana de amostragem é confirmado na análise estatística, onde os queijos T3 e T4 mostram um aumento dos valores estatisticamente significativo ($p<0,05$). Tal fato pode ter sido dado pela possibilidade de ter havido retenção do coalho na massa do queijo e posterior proteólise primária terem sido os responsáveis por tal alteração. Nos queijos T1 e T2, não foram observadas alterações significativas ao longo do armazenamento ($p>0,05$), assim como não foi observada diferença significativa entre os dias 1, 7, 14 e 21 de amostragem entre os diferentes tratamentos (tabela 3).

A elasticidade é o grau de recuperação da deformação causada pela compressão após o cessar da força aplicada (FOX et al., 2000). Este valor é resultado da razão entre os tempos 2 e 1 (T_2/T_1) (figura 16). Com o passar dos dias de armazenamento, há rearranjo da rede de paracaseina no queijo, proteólise e diminuição da umidade por dessoragem (FOX et al. 2000). Assim a queda na elasticidade é fato esperado. Os perfis de elasticidade observados na figura 19 indicam que a média dos valores dos queijos T2 não estiveram em uniformidade com os demais tratamentos, visto que o perfil observado para os

queijos T1, T3 e T4 foi de queda durante o armazenamento, e para o T2, houve aumento inicial e queda somente na última data de análise. Apesar do referido perfil observado na visualização da figura 19, nenhuma diferença significativa ($p>0,05$) foi detectada para as diversas datas de amostragem ou durante o armazenamento de nenhum dos tratamentos avaliados (tabela 3), uma vez os valores de elasticidade medidos eram todos muito próximos, tendo variado de 0,89 a 0,91 (tabela 3).

O pH tem grande influência nas reações de formação da coalhada, visto que o cálcio e o fosfato se dissociam das micelas de caseína quando há um abaixamento do pH, o que determina o estado destas substâncias e outros minerais na massa do queijo formado. Quanto menor a desmineralização – maior pH – maior a elasticidade da massa do queijo formado (LOMHOLT & QVIST, 1999). Na verificação dos dados referentes a afirmações acima, as figuras 3, 4 e 19 mostram um maior pH para o T2 até o 14º dia, onde se viu concomitantemente uma maior elasticidade e a 2º maior valor de umidade. Porém, embora não tenha sido observada uniformidade em todos os tratamentos e em todas as datas de análise, estes perfis não são diferentes estatisticamente dos demais ($p>0,05$).

A mastigabilidade é o tempo, ou número de mastigações necessárias para o queijo estar pronto para ser deglutido, sendo o produto da dureza, coesividade e elasticidade ($H \times (A_2/A_1) \times (T_2/T_1)$) (figura 16). A gomosidade é a energia requerida para desintegrar um pedaço de queijo, tornando-o apto para ser deglutido, sendo produto de um baixo grau de dureza e alto de coesividade (FOX et al., 2000) ($H \times (A_2/A_1) \times 100$) (figura 16). Ambos parâmetros são derivados da dureza e a variação destes foi proporcional para todos os queijos analisados (figuras 20 e 21). Assim como no parâmetro dureza, na mastigabilidade e na gomosidade se revela diferença estatística entre os tratamentos ($p<0,05$) somente no 7º dia de amostragem, enquanto nos demais dias não se observa diferença ($p>0,05$). Levando-se em conta a análise estatística para a avaliação de cada tratamento, é visto que para os queijos T1, T2 e T3 há diferença estatística ($p<0,05$) entre o dia 1 e 7 de amostragem, tanto para mastigabilidade como para gomosidade (tabela 3), enquanto que para os queijos T4 não é observada nenhuma variação estatística para o nível

de significância de 5%. Assim como ocorreu com a dureza, os queijos T3 mostraram um maior aumento nos valores de gomosidade (significativo também entre os dias 7 e 14 para $p<0,05$) conforme pode ser constatado na figura 21.

A adesividade é a força de oposição ao retorno do prato de compressão quando terminado a primeira sessão e há o retorno do prato para a posição original (FOX et al., 2000). Este atributo mede a adesão do produto entre as superfícies paralelas da base do texturômetro e o prato de compressão e é representado graficamente pela área negativa (A_3) (figura 16). Os perfis obtidos para a adesividade estão expostos na tabela 3, onde observa-se certa relação com os valores obtidos para a elasticidade (figura 19). Na avaliação da análise estatística para este parâmetro, não é observada nenhuma diferença entre as datas de amostragem dentro dos tratamentos ($p>0,05$), e somente no 7º dia há diferença entre os tratamentos ($p<0,05$), sendo que os queijos T4 são diferentes dos queijos T1 e T2 (tabela 3).

Mc Brearty et al. (2001) usaram as cepas de Bifidobacterium lactis e de B. longum na fabricação do queijo Cheddar e verificaram que para todos os queijos a textura se demonstrou fraca (baixa dureza) e em particular para a cepa Bb-12 (B. lactis) devido a rápida taxa de acidificação dada por esta, o que ainda ocasionou aumento da umidade e perda das qualidades sensoriais do produto.

LEE e KLOSTEMEYER (2001) reportaram haver modificações nas propriedades reológicas de queijos cremosos conjuntamente às mudanças no pH, sendo que os queijos ficam mais quebradiços ao pH 5.0, semi-solidos ao pH 5.4 e mecanicamente semelhantes a uma solução diluída a pH 6.0. Os autores também atribuem estas mudanças nas propriedades reológicas aos efeitos das interações entre cargas, com um possível aumento na repulsão entre as proteínas do sistema quando do aumento do pH dos queijos.

4.6. Análise sensorial

O desenvolvimento de aroma e sabor nos queijos é resultado da quebra de componentes do leite por enzimas, sejam estas de microrganismos ou

provenientes do coalho, que resultam na produção de compostos voláteis e não voláteis. Além do mais, as enzimas provenientes de bactérias láticas usadas no processo de fabricação dos queijos, são responsáveis pela formação de muitos dos compostos essenciais ao aroma e sabor dos queijos (EL SODA et al. 2000).

A proteólise é um dos maiores eventos bioquímicos responsáveis pelo desenvolvimento de aroma e sabor durante a maturação de queijos. Outros processos enzimáticos também estão envolvidos como a lipólise e as fermentações láticas e propiônicas (FOX et al., 2000). A extensão do desenvolvimento de características de textura e organolépticas conferidas pelas bactérias láticas dependem do potencial enzimático das bactérias usadas na fabricação do queijo. Existem grandes diferenças na expressão de proteinases, peptidases e esterases entre diferentes gêneros, espécies e cepas de bactérias láticas diferentes (AMÁRITA et al., 2001).

Conforme descrito em material e métodos, a análise sensorial dos queijos no presente trabalho foi realizada no 7º dia e foi conduzida segundo o delineamento de ordenação em blocos casualizados com 40 provadores não treinados, empregando-se aceitação/preferência. Os provadores utilizaram questionário fornecido (anexo II), onde solicitou-se para ordenar em primeiro lugar a amostra de melhor sabor (valor 1) e em último a de pior sabor (valor 4), não podendo haver repetição dos valores (SHIROSE & MORI, 1994; LAWLEES & HEYMANN, 1999).

Os provadores foram selecionados com base no interesse em participar da análise sensorial e em hábitos de consumo de queijo Minas frescal.

Com relação à avaliação sensorial realizada, na aplicação do teste não paramétrico de Friedman, quando o valor da estatística χ supera o valor do qui-quadrado tabelado, isto é, $\chi_0 > \chi^2$, conclui-se que pelo menos dois queijos diferem entre si quanto ao sabor (SHIROSE & MORI, 1994).

A amostra referente ao queijo controle (T1) recebeu 13 notas 1 e 10 notas 4, o queijo T2 recebeu 10 notas 1 e 10 notas 4, o queijo T3 9 notas 1 e 10 notas 4 enquanto que o queijo T4 recebeu 8 notas 1 e também 10 notas 4 pelo painel de provadores. Na somatória de notas, os resultados obtidos foram 97 para a amostra

controle, 98 para a amostra de queijo T2, 102 para o queijo T3 e 103 para o queijo T4.

Na verificação estatística dos dados, obteve-se um χ_0 de Friedman = 0,39, sendo que foram 3 graus de liberdade e um χ^2 tabelado = 7,815. Logo, $\chi_0 < \chi^2$ = não significativo. Assim, os quatro tratamentos de queijo estudados não apresentaram diferenças significativas no sabor.

BREARTY et al., (2001) relataram que para o queijo Cheddar, o uso de *Bifidobacterium lactis* Bb-12 associado à cultura iniciadora *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* mostrou características sensoriais melhores quando comparados ao queijo controle, além de ter atingido as características de queijo Cheddar maturado mais precocemente. Influencia como esta não foi detectada neste trabalho, até porque o queijo Minas frescal não sofre o processo de maturação, não dependendo, portanto, de processos como proteólise e lipólise para adquirir características típicas do produto.

MARTÍNEZ-CUESTA et al. (2001) avaliaram o uso da cepa IFPL731 de *Lactobacillus casei* como coadjuvante na fabricação de queijos semi-duros e concluíram que o metabolismo deste microrganismo exerceu uma influência importante sobre o desenvolvimento de bom aroma e sabor, devido à produção de ácidos graxos de cadeia curta por ação de esterases. MENÉNDEZ et al. (2000) testaram o uso de diferentes cepas de lactobacilos frente ao queijo espanhol Arzúa-Ulloa controle fabricado com cepas de *Lactococcus* sp. Os autores relataram que na análise sensorial dos produtos, os queijos com lactobacilos revelaram sabor ácido mais pronunciado, assim como o aroma de manteiga e de iogurte. Entretanto, segundo os autores, os queijos controle apresentaram maior adstringência e sabor amargo.

5. CONCLUSÕES

- Os queijos produzidos com a adição das culturas probióticas de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* revelaram contagens que variaram, respectivamente, de 6 a 6,48 log UFC/g e de 5,84 a 6,41 log UFC/g ao longo dos 21 dias de armazenamento do produto a 5°C. Os perfis das curvas de crescimento dos microrganismos probióticos mostraram-se ligeiramente mais favoráveis nos queijos produzidos com os probióticos em co-cultura.

- Mesmo com altos valores de umidade, atividade de água e pH, os queijos probióticos estudados apresentaram maior proteção contra a multiplicação de bactérias indicadoras quando comparados aos queijos controle. Foi observado o controle de coliformes nos queijos com *Bifidobacterium lactis* e/ou *Lactobacillus acidophilus* e o controle de *Staphylococcus* spp., nos queijos com *L. acidophilus*.

- Quanto aos parâmetros de textura, a dureza, que é o atributo de maior importância, mostrou comportamento linear com tendência a aumento nos valores ao longo do armazenamento dos queijos. Os queijos processados com *Bifidobacterium lactis* revelaram um aumento significativo ($p<0,05$) da dureza ao longo do armazenamento, enquanto que os queijos com *L. acidophilus* e o queijo controle somente mostraram aumento significativo dos valores da dureza no 7º dia de amostragem. A coesividade, a elasticidade e a adesividade mostraram-se estatisticamente iguais ($p>0,05$) em todas as datas de amostragem em todos os queijos.

- Na análise sensorial, os queijos probióticos estudados não revelaram diferenças entre si e em relação ao queijo controle.

- Os queijos adicionados de *Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium lactis* (T4) foram os queijos de maior estabilidade ao longo do

armazenamento quando consideradas todas as variações significativas ocorridas neste prazo, tendo apresentado apenas 4 variações significativas ao longo dos 21 dias de estocagem a 5℃ conforme quadro descritivo resumido abaixo. O queijo Minas frescal mostrou-se bom veículo para as cepas probióticas de *Lactobacillus acidophilus* e de *Bifidobacterium lactis,* particularmente quando em co-cultura.

Queijos	T1				T2				T3				T4			
Parâmetro \ Semanas	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Umidade	x				x				x				x			
Atividade de água				x				x								
pH				x				x								
Acidez			x	x	x			x								
Dureza	x				x				x	x			x			
Coesividade									x				x			
Elasticidade																
Mastigabilidade	x				x				x							
Gomosidade	x				x				x	x						
Adesividade																
B. laticas totais	x												x			
Staphylococcus spp.									x	x						
Coliformes totais	x			x												
Total	11				8				9				**4**			

T1 = queijo controle,

T2 = queijo com *Lactobacillus acidophilus*

T3 = queijo com *Bifidobacterium lactis*

T4 = queijo com *Lactobacillus acidophilus* + *Bifidobacterium lactis*

6. Tabelas

Tabela 1. Mediana (M) e semi-amplitude total (SA) do rendimento, umidade, atividade de água, pH e acidez segundo tratamento* e dia de amostragem**, ao longo do armazenamento dos queijos sob refrigeração.

		Rendimento	Umidade	Atividade de água	pH	Acidez
Queijos	Dias	M (SA)	M (SA)	M (SA)	M (SA)	M (SA)
	P	0,229 (0,013) a				
	1		0,681 (0,018) aB	0,990 (0,004) aB	6,235 (0,295) aAB	0,009 (0,003) aA
T1	7		0,666 (0,009) aA	0,986 (0,007) aB	6,285 (0,245) aB	0,010 (0,004) aA
	14		0,640 (0,014) aA	0,988 (0,006) aB	6,205 (0,165) aAB	0,017 (0,016) aB
	21		0,635 (0,007) aA	0,982 (0,006) aA	5,790 (0,330) aA	0,024 (0,015) aC
	P	0,224 (0,007) a				
	1		0,681 (0,026) aC	0,989 (0,004) aB	6,790 (0,410) aB	0,009 (0,002) aA
T2	7		0,669 (0,023) aB	0,986 (0,006) aB	6,695 (0,370) aB	0,013 (0,003) aB
	14		0,647 (0,013) aB	0,984 (0,003) aB	6,545 (0,320) aB	0,016 (0,002) aB
	21		0,621 (0,013) aA	0,980 (0,002) aA	6,315 (0,815) aA	0,020 (0,020) aC
	P	0,232 (0,010) a				
	1		0,693 (0,015) aC	0,984 (0,004) aA	6,490 (0,455) aA	0,015 (0,018) aA
T3	7		0,660 (0,020) aB	0,978 (0,009) aA	6,395 (0,360) aA	0,017 (0,004) aA
	14		0,648 (0,022) aA	0,978 (0,009) aA	6,185 (0,425) aA	0,016 (0,004) aA
	21		0,634 (0,018) aA	0,979 (0,007) aA	6,390 (0,600) aA	0,015 (0,005) aA
	P	0,222 (0,008) a				
	1		0,677 (0,010) aC	0,988 (0,005) aA	6,400 (0,265) aA	0,010 (0,004) aA
T4	7		0,654 (0,026) aB	0,986 (0,007) aA	6,535 (0,360) aA	0,013 (0,003) aA
	14		0,646 (0,014) aA	0,983 (0,008) aA	6,510 (0,445) aA	0,015 (0,008) aA
	21		0,632 (0,004) aA	0,986 (0,008) aA	6,315 (0,360) aA	0,020 (0,008) aA

Tabela 2. Mediana (M) e semi-amplitude total (SA) da população de *Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium lactis,* Bactérias láticas totais, *Staphylococcus* spp. e coliformes totais segundo tratamento* e dia de amostragem**, ao longo do armazenamento dos queijos sob refrigeração.

		L. acidophilus	*B. lactis*	B. laticas totais	*Staphylococcus* spp.	Coliformes totais
Queijos	Dias	M (SA)	M (SA)	M (SA)	M (SA)	M (SA)
T1	L			3,755 (0,281) aA	1,855 (0,130) aA	0,800 (0,141) aA
	P			5,600 (0,447) aA	1,150 (0,363) aA	0,800 (0,231) aA
	1			6,850 (0,235) aB	2,840 (0,111) aA	0,650 (0,212) aA
	7			6,890 (0,264) aB	3,320 (0,066) aA	3,135 (0,832) aB
	14			6,975 (0,182) aB	4,320 (0,072) aA	2,010 (0,661) aB
	21			7,480 (0,111) aB	5,655 (0,471) aA	5,700 (0,403) aC
T2	L			4,455 (0,780) aA	2,440 (0,145) aA	0,000 (0,000) aA
	P	6,280 (0,340) aA		6,625 (0,885) aA	2,540 (0,260) aA	0,000 (0,800) aA
	1	6,170 (0,375) aA		6,360 (0,795) aA	2,480 (0,300) aA	0,000 (1,150) aA
	7	5,990 (0,370) aA		6,290 (1,240) aA	2,795 (0,575) aA	0,500 (0,500) aA
	14	6,165 (0,440) aA		7,105 (1,080) aA	3,545 (0,086) aA	0,850 (1,130) aA
	21	5,980 (0,435) aA		7,145 (1,445) aA	3,500 (1,390) aA	2,490 (1,725) aA
T3	L			4,510 (1,500) aA	1,960 (1,240) aA	0,000 (0,650) aA
	P		5,815 (0,370) aA	7,230 (0,500) aA	0,390 (1,425) aA	0,000 (0,000) aA
	1		5,810 (0,125) aA	7,190 (0,090) aA	2,775 (0,475) aB	0,890 (1,295) aA
	7		5,815 (0,290) aA	7,200 (1,020) aA	3,070 (0,650) aC	1,295 (1,975) aA
	14		6,445 (0,445) bA	7,435 (2,215) aA	4,100 (0,184) aC	0,500 (2,975) aA
	21		5,965 (0,730) aA	7,455 (0,820) aA	4,120 (1,765) aC	1,115 (3,445) aA
T4	L			3,895 (1,100) aA	2,550 (1,745) aA	0,000 (0,300) aA
	P	6,300 (0,215) bA	5,905 (0,400) bA	6,855 (1,215) aB	2,300 (1,300) aA	0,500 (0,890) aA
	1	6,205 (0,180) bA	5,870 (0,160) bA	6,850 (0,885) aB	3,100 (0,450) aA	1,150 (0,390) aA
	7	6,170 (0,285) bA	5,975 (0,075) bA	6,770 (1,250) aB	2,725 (1,815) aA	2,570 (2,115) aA
	14	6,320 (0,650) bA	6,120 (0,375) aA	7,555 (0,885) aB	3,230 (1,400) aA	2,370 (2,670) aA
	21	6,560 (0,295) bA	6,365 (0,680) bA	7,300 (0,995) aB	3,140 (1,700) aA	2,915 (3,045) aA

Tabela 3. Mediana (M) e semi-amplitude total da (SA) dureza, coesividade, elasticidade, mastigabilidade, gomosidade e adesividade segundo tratamento* e dia de amostragem**, ao longo do armazenamento dos queijos sob refrigeração.

		Dureza (N)	Coesividade	Elasticidade	Mastigabilidade (N)	Gomosidade (N)	Adesividade (N)
Queijos	Dias	M (SA)	M (SA)	M (SA)	M (SA)	M (SA)	M (SA)
T1	1	2,200 (1,270) aA	0,720 (0,025) aA	0,900 (0,003) aA	1,415 (0,052) aA	157,095 (6,105) aA	-0,085 (0,020) aA
	7	2,815 (1,495) aB	0,765 (0,010) aA	0,900 (0,001) aA	1,955 (0,031) aB	216,870 (15,66) aB	-0,115 (0,035) bA
	14	3,200 (2,205) aB	0,780 (0,010) aA	0,890 (0,003) aA	2,235 (0,103) aB	250,745 (12,44) aB	-0,145 (0,009) aA
	21	3,300 (1,745) aB	0,775 (0,020) aA	0,895 (0,002) aA	2,290 (0,043) aB	254,915 (5,078) aB	-0,100 (0,019) aA
T2	1	2,480 (0,285) aA	0,740 (0,010) aA	0,900 (0,025) aA	1,636 (0,165) aA	182,610 (21,620) aA	-0,095 (0,030) aA
	7	3,105 (0,220) bB	0,775 (0,020) aA	0,905 (0,015) aA	2,230 (0,145) abB	244,240 (17,085) bB	-0,100 (0,020) bA
	14	3,380 (0,340) aB	0,785 (0,020) aA	0,910 (0,010) aA	2,400 (0,200) aB	264,160 (21,835) aB	-0,090 (0,030) aA
	21	3,845 (0,915) aB	0,785 (0,050) aA	0,890 (0,010) aA	2,710 (0,745) aB	304,575 (85,340) aB	-0,145 (0,097) aA
T3	1	2,845 (0,435) aA	0,755 (0,005) aA	0,905 (0,005) aA	1,960 (0,310) aA	216,065 (34,645) aA	-0,110 (0,005) aA
	7	3,250 (0,570) abB	0,770 (0,020) aB	0,905 (0,005) aA	2,240 (0,460) abB	247,905 (49,445) bB	-0,130 (0,020) abA
	14	3,865 (0,615) aC	0,790 (0,030) aB	0,895 (0,010) aA	2,760 (0,430) aB	306,765 (49,960) aC	-0,130 (0,030) aA
	21	4,415 (0,790) aC	0,795 (0,016) aB	0,890 (0,015) aA	3,160 (0,550) aB	351,190 (65,350) aC	-0,150 (0,016) aA
T4	1	2,390 (0,580) aA	0,735 (0,020) aA	0,905 (0,010) aA	1,580 (0,395) aA	174,730 (46,165) aA	-0,100 (0,040) aA
	7	3,515 (0,590) bB	0,770 (0,000) aB	0,895 (0,015) aA	2,380 (0,400) bA	269,550 (46,185) bA	-0,155 (0,040) aA
	14	3,605 (0,770) aB	0,780 (0,010) aB	0,895 (0,010) aA	2,535 (0,500) aA	283,005 (57,990) aA	-0,145 (0,035) aA
	21	3,965 (0,710) aB	0,780 (0,020) aB	0,890 (0,000) aA	2,770 (0,550) aA	311,075 (60,970) aA	-0,160 (0,001) aA

7. FIGURAS

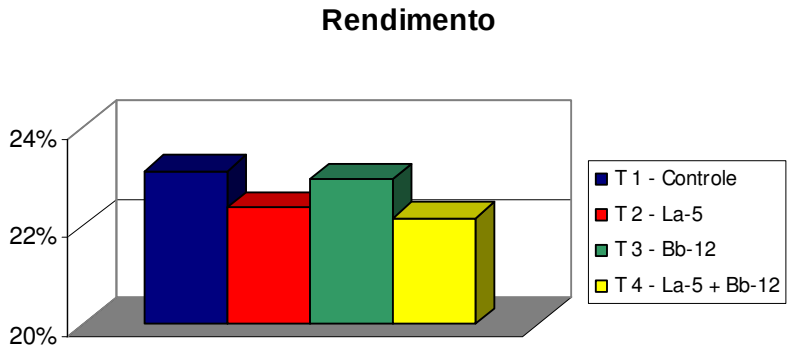
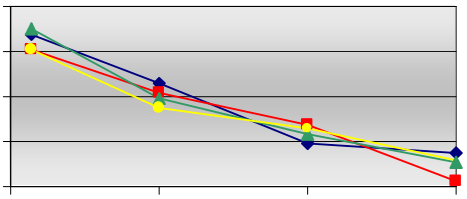


FIGURA 2 - Valores médios dos rendimentos (n=4) obtidos para os diferentes queijos estudados.



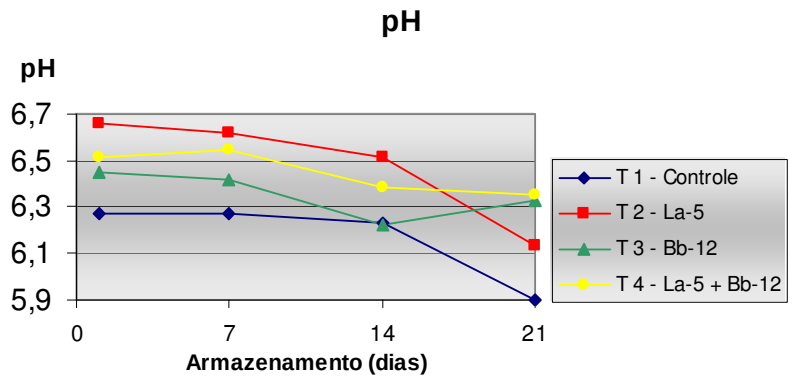


FIGURA 4 - Valores médios de pH (n=4) obtidos para os diferentes queijos estudados, durante o armazenamento a 5°C.

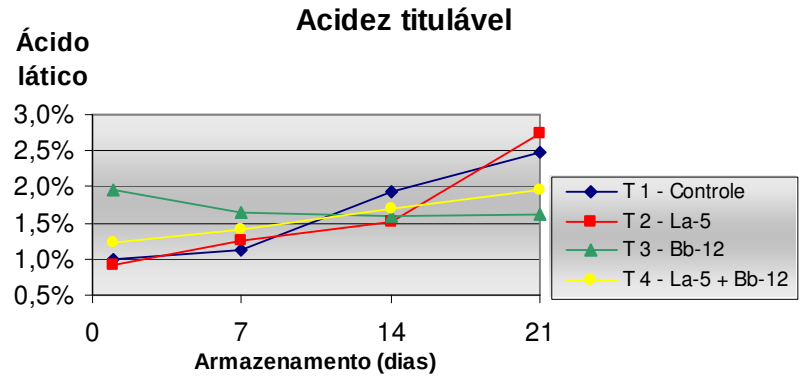


FIGURA 5 - Valores médios de acidez titulável (n=4) obtidos para os diferentes queijos estudados, durante o armazenamento a 5°C. Os valores estão expressos em ácido lático produzido.

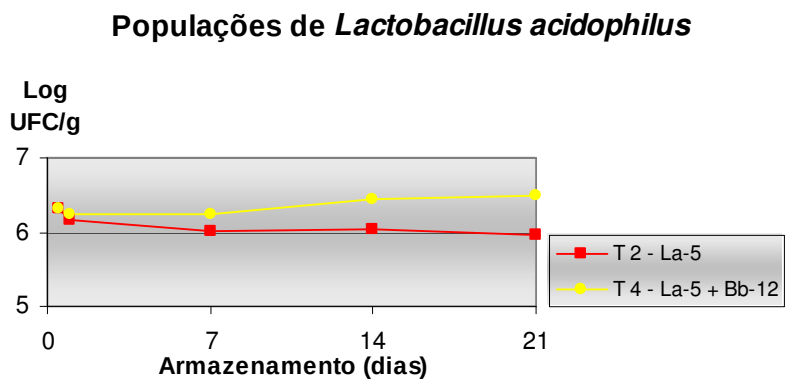


FIGURA 6 - Valores médios das populações de *Lactobacillus acidophilus* (n=4) obtidos para os queijos adicionados de *L. acidophilus* (T2) e *L. acidophilus* + *B. lactis* (T4) durante o processamento e armazenamento a 5°C.

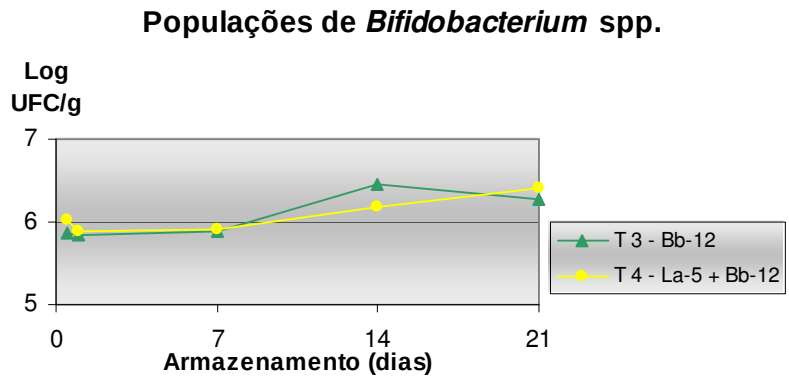


FIGURA 7 - Valores médios das populações de *Bifidobacterium* spp. (n=4) obtidos para os queijos adicionados de *B. lactis* (T3) e *L. acidophilus* + *B. lactis* (T4) durante o processamento e armazenamento a 5°C.

Dia 0 = leite Dia 0,5 = queijo em processamento.

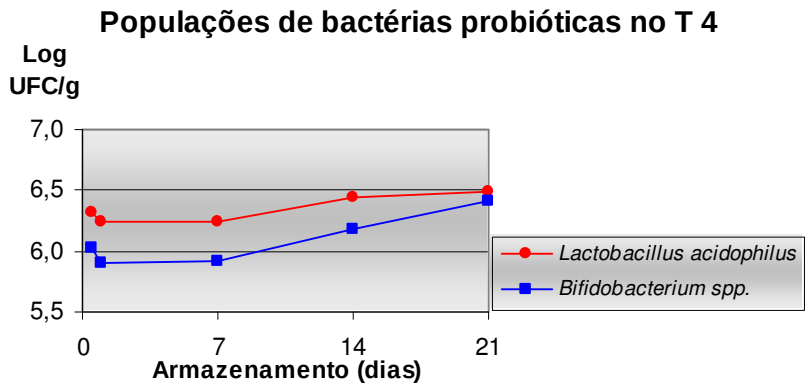


FIGURA 8 - Valores médios das populações de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* spp. (n=4) obtidos para os queijos adicionados de *L. acidophilus* + *B. lactis* (T4) durante o processamento e armazenamento sob refrigeração a 5°C.

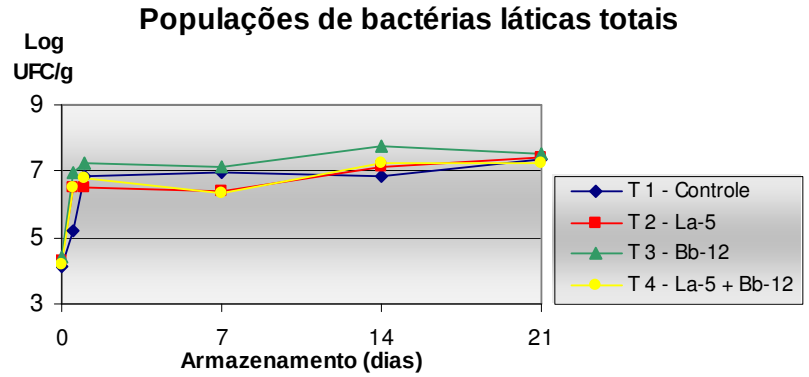


FIGURA 9 - Valores médios das populações de bactérias láticas totais (n=4) obtidos para os diferentes queijos estudados, durante o processamento e armazenamento a 5°C.

Dia 0 = leite Dia 0,5 = queijo em processamento.

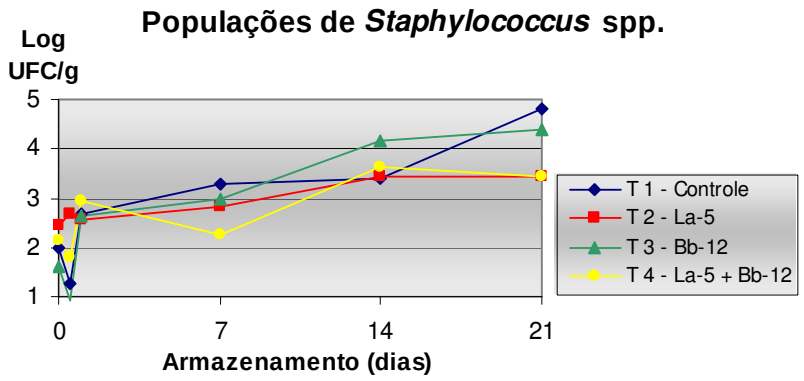


FIGURA 10 - Valores médios das populações de *Staphylococcus* spp. (n=4) obtidos para os diferentes queijos estudados, durante o processamento e armazenamento a 5°C.

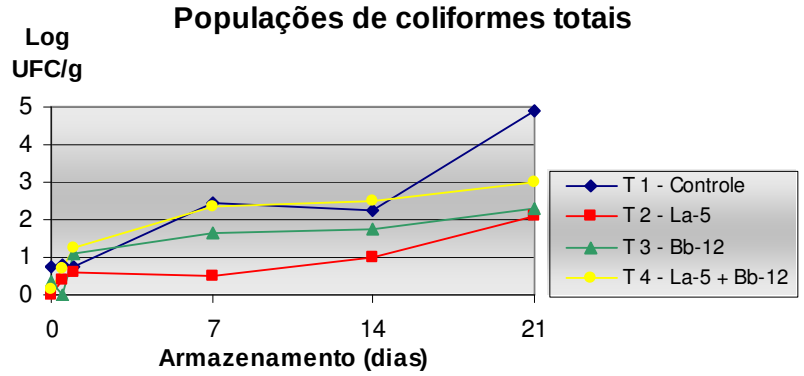


FIGURA 11 - Valores médios das populações de coliformes totais (n=4) obtidos para os diferentes queijos estudados durante o processamento e armazenamento a 5°C.

Dia 0 = leite Dia 0,5 = queijo em processamento.

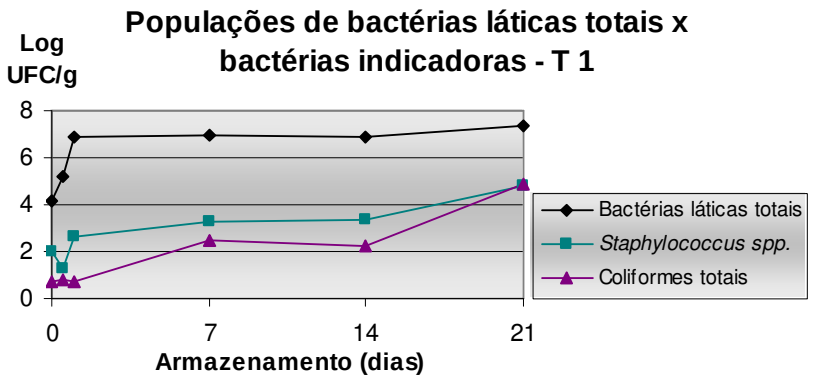


FIGURA 12 - Valores médios das populações de bactérias láticas totais x bactérias indicadoras (n=4) obtidos para os queijos controle (T1), durante o processamento e armazenamento a 5°C.

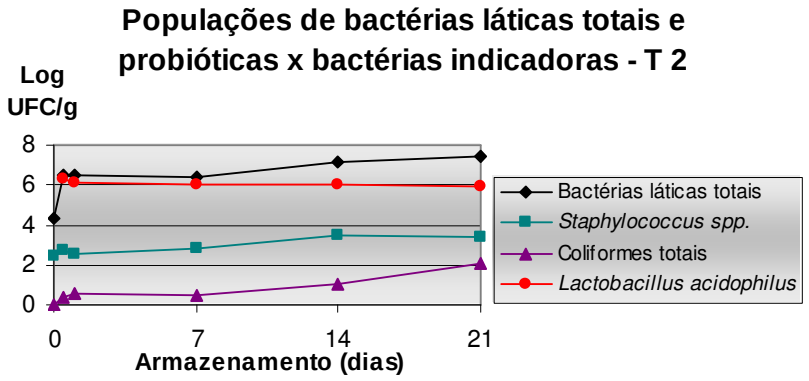


FIGURA 13 - Valores médios das populações de bactérias láticas totais x bactérias indicadoras x bactérias probióticas (n=4) obtidos para os queijos adicionados de *L. acidophilus* (T2), durante o processamento e armazenamento a 5°C.

Dia 0 = leite Dia 0,5 = queijo em processamento.

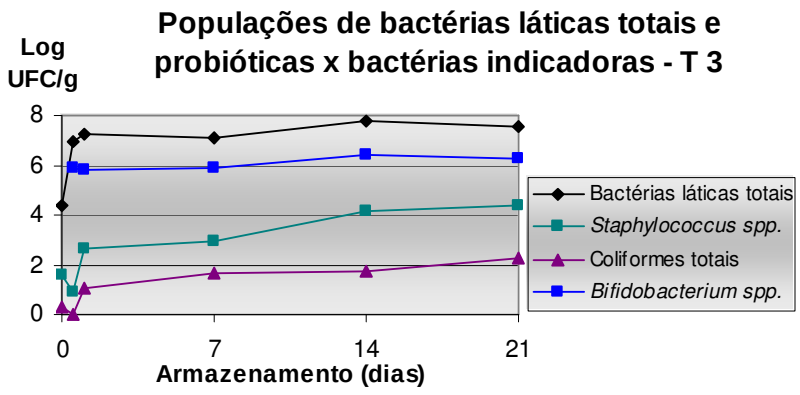


FIGURA 14 - Valores médios das populações de bactérias láticas totais x bactérias indicadoras x microrganismos probióticos (n=4) obtidos para os queijos adicionados de *B. lactis* (T3), durante o processamento e armazenamento a 5°C.

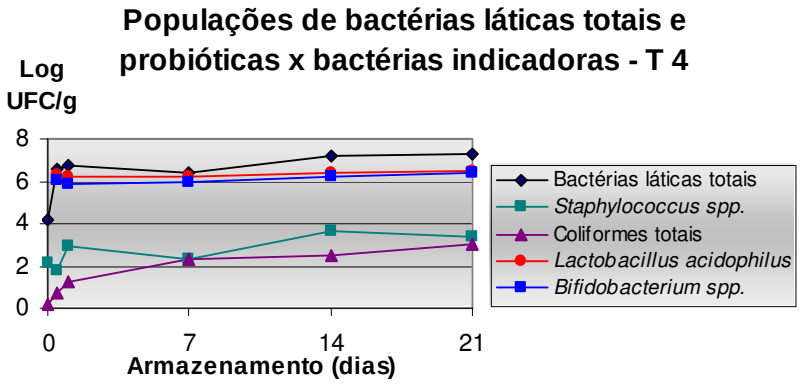


FIGURA 15 - Valores médios das populações de bactérias láticas totais x bactérias indicadoras x microrganismos probióticos (n=4) obtidos para os queijos adicionados de *L. acidophilus* + *B. lactis* (T4), durante o processamento e armazenamento a 5°C.

Dia 0 = leite Dia 0,5 = queijo em processamento.

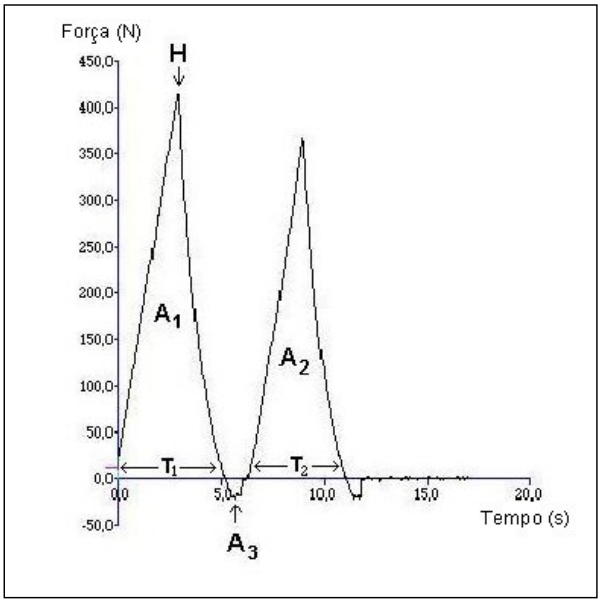


FIGURA 16 - Curva típica de análise do perfil de textura obtida para o queijo Minas frescal empregando-se analisador de textura TA-XT2 (Stable Micro Systems). **Dureza** = H; **Coesividade** = A_2/A_1; **Adesividade** = A_3; **Elasticidade** = T_2/T_1; **Mastigabilidade** = H x (A_2/A_1) x (T_2/T_1) e **Gomosidade** = H x (A_2/A_1) x 100.

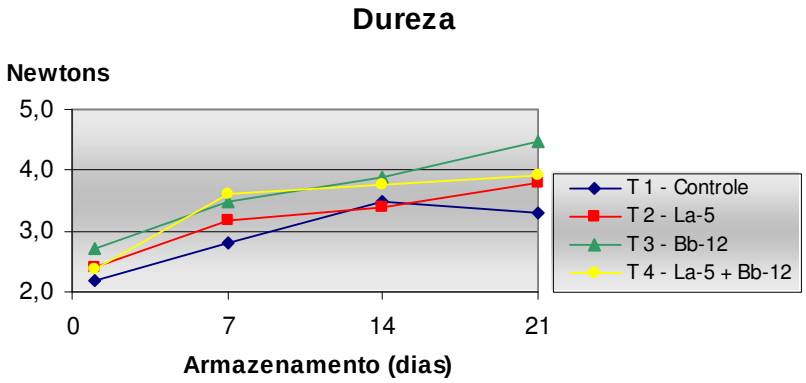


FIGURA 17 - Valores médios de dureza obtidos para os diferentes queijos estudados, durante o armazenamento a 5ºC (n=4).

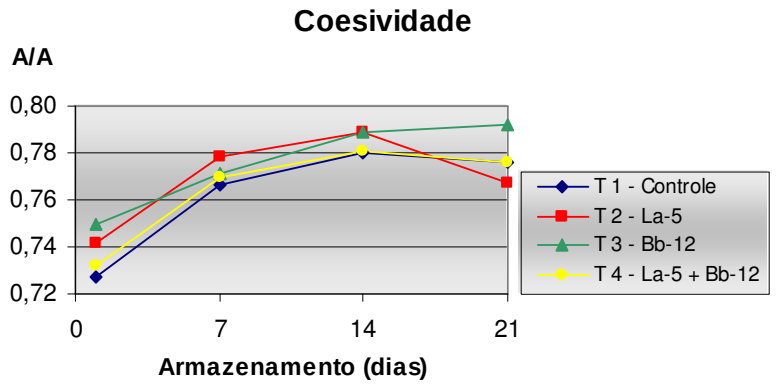


FIGURA 18 - Valores médios de coesividade obtidos para os diferentes queijos estudados, durante o armazenamento a 5ºC (n=4).

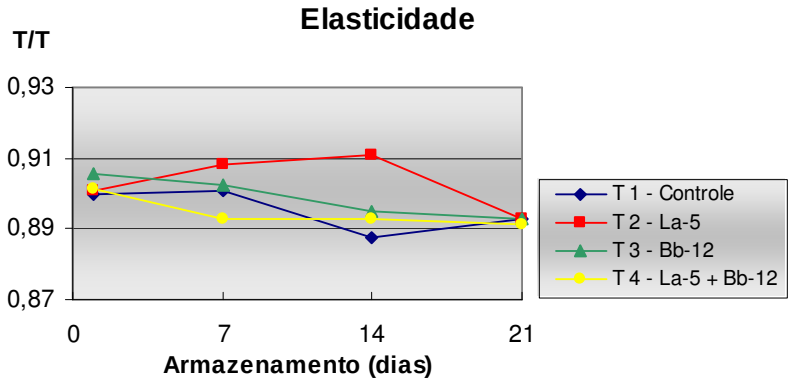


FIGURA 19 - Valores médios de elasticidade obtidos para os diferentes queijos estudados, durante o armazenamento a 5ºC (n=4).

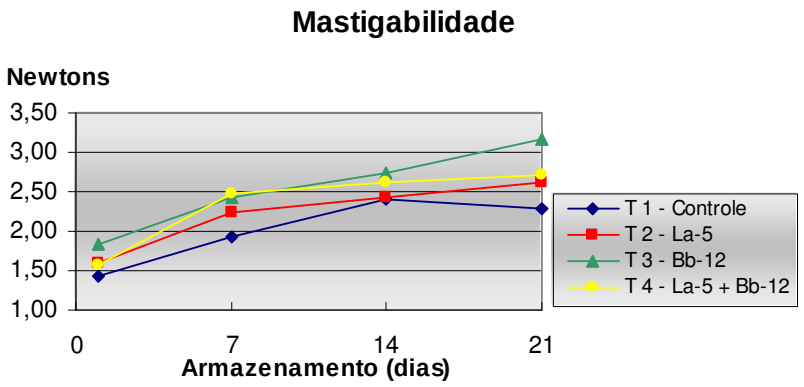


FIGURA 20 - Valores médios de mastigabilidade obtidos para os diferentes queijos estudados, durante o armazenamento a 5ºC (n=4).

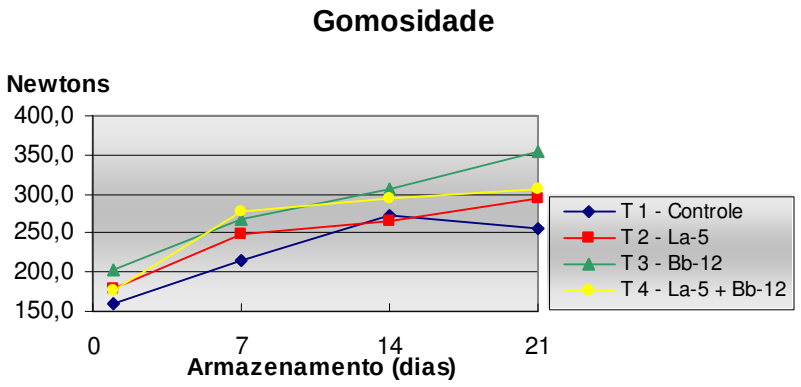


FIGURA 21 - Valores médios de gomosidade obtidos para os diferentes queijos estudados, durante o armazenamento a 5ºC (n=4).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos. Recomendações da Comissão Tecnocientífica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno.htm. Acesso em: 20 dez. 2001a.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos. Legislação. Resolução RDC n°.12 de 02 de janeiro de 2001. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno.htm. Acesso em: 15 dez. 2001b.

AGUIAR, C.V.; TELLES, S.F.J.; BENEVIDES, D.S. Queijos de coalho maturados produzidos com leite bovino e caprino: características físico-químicas, bioquímicas e microbiológicas. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 4, Santiago, 2001. **Anais**., 2001. p. 287.

ALAKOMI, H.L.; SKYTTÄ, E.; SAARELA, M.; MATILLA-SANDHOLM, T.; LATVA-KALA, K.; HELANDER, I.M. Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. **J. Bacteriol.**, Washington, v.66, p.2001-2005, 2000.

ALAMPRESE, C.; FOSCHINO, R.; ROSSI, M.; POMPEI, C.; SAVANI, L. Survival of Lactobacillus johnsonii La-1 and influence of its addition in retail-manufactured ice cream produced with different sugar and fat concentrations. **Int. Dairy J.** Amsterdam, v.12, p.201-208, 2002.

AMARAL, L.A., NADER FILHO, A., IARIA, S.T. Variação das características físico-químicas e microbiológicas das salmouras durante sua utilização na salga de queijos tipo Minas “frescal”. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v.22, n.2, p.136-140, 1991.

AMÁRITA, F.; REQUENA, T.; TABORDA, G.; AMIGO, L.; PÉLAEZ, C. Lactobacillus casei and Lactobacillus plantarum initiate catabolism of methionine by transamination. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.90, n.6, p.971-978, 2001.

ARAÚJO, V.S.; SANTOS, E.C.S.; QUEIROZ, M.L.P.; FREITAS, A.C. Análise bacteriológica do queijo Minas frescal comercializado na cidade do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 19, Rio de Janeiro, 1997. **Resumos**. Rio de Janeiro: SBM, 1997. p.283. res. n.AL-084.

BACHMANN, H.P.; BÜTIKOFER, U.; MEYER, J. Prediction of flavour and texture development in Swiss-type Cheeses. **J. Food Sci. Tech.**, London, v.32, n.4, p.248-249, 1999.

BARBOSA, C.G.; ROBBS, P.G.; FAVARIN, V. Behaviour of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* and injury formation during production and storage phases of parmesan cheese. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v.24, n.2, p.111-117, 1993a.

De acordo com a NBR6023/2000 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS

BARBOSA, C.G.; ROBBS, P.G.; RAIMUNDO, S.M.C. Behaviour of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* and injury formation during production and storage phases of “prato” cheese. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v.24, n.2, p.118-124, 1993b.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos.** Campinas: UNICAMP, 1995. 299p.

BEIGUELMAN, B. **Curso prático de bioestatística.** Riberão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1996. 242p.

BERESFORD, T.P.; FITZSIMONS, N.A.; BRENNAN, N.L.; COGAN, T.M. Recent advances in cheese microbiology. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.11, p.259-274, 2001.

BLANCHETTE, L.; ROY, D.; BELANGER, G.; GAUTHIER, S.F. Production of cottage cheese using dressing fermented by bifidobacteria. **J. Dairy Sci.**, Lancaster, v.79, p.8-15, 1996.

BONASSI, I.A.; GOLDONI, J.S. Influência das bactérias mesófilas: *Streptococcus cremoris, Streptococcus lactis, Streptococcus diacetilactis e Leuconostoc citrovorum*, nas características do queijo tipo Minas: composição centesimal. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.3, n.1, p.14-23, 1983.

BONASSI, I.A.; KROLL, L.B.; GOLDONI, J.S. Influência das bactérias mesófilas: *Streptococcus cremoris, Streptococcus lactis, Streptococcus diacetilactis e Leuconostoc citrovorum*, na composição em ácidos graxos livres voláteis do queijo tipo Minas, mudanças durante a cura. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.4, n.1, p.42-55, 1984.

BORGES, M.F.; BRANDÃO, S.C.C.; PINHEIRO, A.J.R. Sobrevivência de *Salmonella* spp em queijo Minas padronizado durante a maturação. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v.21, n.3, p.276-281, 1990.

BRASHEARS, M.M.; DURRE, W.A. Antagonistic action of *Lactobacillus lactis* toward *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 during growth and refrigerated storage. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.62, n.11, p.1336-1340. 1999.

BRASIL. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. O Ministério de Estado da Agricultura e Abastecimento e da Reforma Agrária institui o regulamento técnico de identidade e qualidade de queijos. In: SANTOS, J.A., ed. **Nova legislação**

de produtos lácteos e de alimentos para fins especiais, *diet*, *light* e enriquecidos. São Paulo: Fonte, 1998. p.58-66.

BRASIL. Portaria nº 352, de 4 de setembro de 1997. O Ministério de Estado da Agricultura e do Abastecimento institui o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do queijo minas frescal. In: SANTOS, J.A., ed. **Nova legislação de produtos lácteos e de alimentos para fins especiais, *diet*, *light* e enriquecidos.** São Paulo: Fonte, 1998. p.76-78.

BRASIL. Portaria nº 15, de 30 de abril de 1999. O Ministério da Saúde institui junto à Câmara Técnica de Alimentos a Comissão de Assessoramento de Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. **Diário Oficial**, Brasília, 14 maio 1999. Seção 2

BRASIL. Resolução nº 16, de 30 de abril de 1999. O Ministério da Saúde através do regulamento técnico estabelece procedimentos para registro de alimentos e ou novos ingredientes. **Diário Oficial**, Brasília, 3 dez. 1999.

BRASIL. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999. O Ministério da Saúde através do regulamento técnico estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. **Diário Oficial**, Brasília, 3 dez. 1999.

BRASIL. Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999. O Ministério da Saúde através do regulamento técnico estabelece procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. **Diário Oficial**, Brasília, 10 dez. 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal.** São Paulo: Inspetoria do SIPAMA, 1980. 340p.

CERQUEIRA, M.M.O.P.; SOUZA, M.R.; FONSECA, L.M.; RODRIGUES, R.; RUBINICH, J. Surto epidêmico de toxinfecção alimentar envolvendo queijo tipo Minas frescal em Pará de Minas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, São Paulo, v.46, n.6, p.723-728, 1994.

COGAN, T.M. Cheese Microbiology. In: FOX, P.F.; GUINEE, T.P.; COGAN, T.M.; McSWEENEY, P.L.H. eds. **Fundamentals of cheese science.** Gaithersburg: Aspen, 2000. 587p.

COSTA NETO, P.L.O. **Estatística.** São Paulo: Edgard Blücher, 1998. 264p.

DAIGLE, A.; ROY, D.; BÉLANGER, G.; VUILLEMARD, J.C. Production of probiotic cheese (Cheddar-like cheese) using enriched cream fermented by *Bifidobacterium infantis*. **J. Dairy Sci.**, Lancaster, v.82, n.6, p.1081-1091, 1999.

DALGLEISH, D.G. The enzymatic coagulation of milk. In: FOX, P.F., ed. **Cheese**: chemistry, physics and microbiology. London: Chapman & Hall, 1993. v.1, p.69-100.

DALY, C.; FITZGERALD, G.F.; O'CONNOR, L.; DAVIS, R. Technological and health benefits of dairy starter cultures. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.8, p.195-205, 1998.

DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. **J. Dairy Sci.**, Lancaster, v.81, p.2804-2816, 1998.

DAVIDSON, P.M.; HOOVER, D.G. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: SALMINEN, S., VON WRIGHT, A., eds. **Lactic acid bacteria.** New York: Marcel Dekker, 1993. p.127-159.

DAVIDSON, R.H.; DUNCAN, S.E.; HACKNEY, C.R.; EIGEL, W.N.; BOLING, J.W. Probiotic culture survival and implications in fermented frozen yogurt characteristics. **J. Dairy Sci.**, Lancaster, v.83, n.4, p.666-673, 2000.

DESTRO, M.T.; SERRANO, A.M.; KABUKI, D.Y. Isolation of *Listeria* species from some Brazilian meat and dairy products. **Food Control**, Amsterdam, v.2, p.110-112, 1991.

DIAS, J.C., ed. **Anuário Milkbizz de profissionais para profissionais.** São Paulo: Milkbizz, 1999. 210p. [Apenso a revista Laticínios]

DILLON, V.M.; COOK, P.E. Biocontrol of undesirable microorganisms in food. In: DILLON, V.M.; BOARD, R.G., eds. **Natural antimicrobial systems and food preservation.** Wallingford: CAB International, 1994. p.255-296.

DINAKAR, P.; MISTRY, V.V. Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in Cheddar cheese. **J. Dairy Sci.**, Lancaster, v.77, p.2854-2864, 1994.

EL SODA, M.; MADKOR, S.A.; TONG, P.S. Adjunct cultures: Recent developments and potential significance to the cheese industry. **J. Dairy Sci.**, Lancaster, v.83, n.4, p.609-619, 2000.

EMMONS, D.B.; LISTER, E.E.; BECKETT, D.C.; JENKINS, K.J. Quality of protein in milk replacers for young calves. V. Effect of method of dispersing fat on curd formation and whey syneresis. **J. Dairy Sci.**, Lancaster, v.63, p.417-425, 1980

apud: LAW, B.A., ed. **Technology of cheesemaking.** Boca Raton: CRC Press, 1999. 322p.

FOX, P.F. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. **J. Dairy Sci.**, Lancaster, v.72, p.1379-1400, 1989.

FOX, P.F.; LUCEY, J.A.; COGAN, T.M., Glycolisis and related reactions during cheese manufacture and ripening. **CRC Crit. Food Sci. Nutr.**, Fort Lauderdale, v.29, n.4, p.237-253, 1990.

FOX, P.F.; GUINEE, T.P.; COGAN, T.M.; McSWEENEY, P.L.H. **Fundamentals of cheese science.** Gaithersburg: Aspen, 2000. 587p.

FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. Proteolysis in cheese during ripening. **Food Rev. Int.**., Monticello, v.12, p.457-509, 1996.

FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. **Dairy chemistry and biochemistry.** London: Blackie Academic & Professional, 1998. 478p.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos.** São Paulo: Atheneu, 1996. 182p.

FRANK, J.F. Milk and dairy products. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. **Food microbiology**: fundamentals and frontiers. Washington: ASM, 1997. p.101-116.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.66, p.365-378, 1989.

FURTADO, M.M.; WOLSCHOON-POMBO, A.F.; MUNCK, A.V.; SOUZA, H.S. Estudo conclusivo à respeito da fabricação do queijo Minas frescal por diferentes processos. **Rev. Inst. Laticinios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.35, n.208, p.13-16, 1980a.

FURTADO, M.M.; SOUZA, H.S.; MUNCK, A.V. A fabricação do queijo Minas frescal sem o emprego de culturas láticas. **Rev. Inst. laticinios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.35, n.207, p.15-21, 1980b.

FURTADO, M.M. **Principais problemas dos queijos:** causas e prevenção. São Paulo: Fonte, 1999. 176p.

GARDINER, G.; ROSS, R.P.; COLLINS, J.K.; FITZGERALD, G.; STANTON, C. Development of a probiotic Cheddar cheese containing human-derived *Lactobacillus paracasei* strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.64, p.2192-2199, 1998.

GARDINER, G.; STANTON, C.; LYNCH, P.B.; COLLINS, J.K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R.P. Evaluation of Cheddar cheese as a food carrier for delivery of a probiotic strain to the gastrointestinal tract. **J. Dairy Sci.**, Lancaster, v.82, n.7, p.1379-1387, 1999.

GILLILAND, S.E. Beneficial interrelationships between certain microorganisms and humans: candidate microorganisms for use as dietary adjuncts. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.42, n.2, p.164-167, 1979.

GILLILAND, S.E. Acidophilus milk products: a review of potential benefits to consumers. **J. Dairy Sci.**, Lancaster, v.72, n.10, p.2483-2494, 1989.

GILLILAND, S.E.; SPECK, M.L. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and foodborne pathogens in associative cultures. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.40, n.12, p.820-823, 1977.

GOBBETTI, M.; CORSETTI, A.; SMACCHI, E.; ZOCCHETTI, A.; De ANGELIS, M. Production of Crescenza cheese by incorporation of Bifidobacteria. **J. Dairy Sci.**, Lancaster, v.81, p.37-47, 1997.

GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental.** 12.ed. São Paulo: Nobel, 1987. 467p.

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

GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends Food Sci. Technol.**, Amsterdam, v.10, p.139-157, 1999.

GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X.; KLAVER, F.A.M.; GRANDE, H.G. Incorporation and survival of *Bifidobacterium* sp. strain Bo and *Lactobacillus acidophilus* strain Ki in a cheese product. **Netherlands Milk Dairy Sci.**, Amsterdam, v.49, p.71-95 *apud*: STANTON, C.; GARDINER, G.; LYNCH, P.B.; COLLINS, J.K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R.P. Probiotic cheese. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.8, p.491-496, 1998.

GOMES, H.A.; GALLO, C.R. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* e produção de enterotoxinas por linhagens isoladas a partir de leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo “Minas frescal” comercializados em Piracicaba - SP. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.15, n.2, p.158-161, 1995.

GONZÁLEZ, V.; GIOIELLI, L.A.; OLIVEIRA, M.N. Influência do tamanho da amostra e da lubrificação na determinação da textura instrumental de queijo tipo Minas frescal. **Rev. Farm. Bioquím. Univ. São Paulo**, v.34, n.2, p.109-113, 1998.

GRITTENDEN, G.R. Prebiotics. In: TANNOCK, G.W., ed. **Probiotics**: a critical review. Wymondham: Horizon Scientific, 1999. p.141-156.

HAMMES, W.P.; HERTEL, C. Research approches for pre- and probiotics: challenges and outlook. **Food Res. Int.**, Amsterdam, v.35, p.165-170, 2002.

HARBOE, M.; BUDTZ, P. The production, action and application of rennet and coagulants. In: LAW, B.A., ed. **Technology of cheesemaking.** Boca Raton: CRC, 1999. p.33-65.

HASSAN, A.N.; FRANK, J.F. Starter cultures and their use. In: MARTH, E.H.; STEELE, J.L., eds. **Appl. dairy microbial.** New York: Marcel Dekker, 2001. p.151-206.

HAVENAAR, R.; BRINK, T.; HUIS IN'T VELDT, J.H.J. In: FULLER, R., ed. **Probiotics**: the scientific basis. London: Chapmann and Hall, 1992. P. 209-224.

HOIER, E.; JANZEN, T.; HENRIKSEN, C.M.; RATTRAY, F.; BROCKMANN, E.; JOHANSEN, E. The production, application and action of lactic cheese starter cultures. In: LAW, B.A., ed. **Technology of cheesemaking.** Boca Raton: CRC, 1999. p.99-131.

HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; SNEL, J.; SCHILLINGER, U.; HUIS IN'T VELDT, J.H.J. Overview of gut flora and probiotics. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.41, p.85-101, 1998.

INGHAM, S.C. Use of modified Lactobacillus selective medium and Bifidobacterium iodoacetate medium for differential enumeration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in powdered nutritional products. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.62, n.1, p.77-80, 1999.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz:** métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3.ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985. 533p.

ISEPON, J.S.; OLIVEIRA, A.J. Influência do emprego de culturas láticas nas características do queijo tipo minas frescal. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.15, n.1, p.1-5, 1995.

JAY, J.M. **Modern food microbiology**. Gaithersburg: Aspen Publication, 2000. 679p.

JOHNSON, M.; LAW, B.A. The origins, development and basic operations of cheesemaking technology. In: LAW, B.A., ed. **Technology of cheesemaking.** Boca Raton: CRC, 1999. p.1-32.

JURKIEWICZ, C.H. **Avaliação das características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais de queijo minas frescal elaborado com culturas probióticas de *Lactobacillus acidophilus.*** São Paulo, 1999. 134p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

KIM, H.S.; GILLILAND, S.E. *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct for milk to aid lactose digestion in humans. **J. Dairy Sci.**, Lancaster, v.66, n.5, p.959-966, 1983.

KINDSTEDT, P.S.; ROWNEY, M.; ROUPAS, P. Technology, biochemistry and functionality of pasta filata/pizza cheese. In: LAW, B.A., ed. **Technology of cheesemaking.** Boca Raton: CRC, 1999. p.193-221.

LAW, B.A., ed. **Technology of cheesemaking.** Boca Raton: CRC, 1999. 322p.

LAWLESS, H.T.; HEYMANN, H. **Sensory evaluation of foods:** principles and practices. Gaithersburg: Aspen Publication, 1999. 827p.

LAWRENCE, R.C.; GILLES, J.; CREAMER, L.K., N.Z.J. **Dairy Sci. Technol.**, v.18, p.175, 1983.

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

LEE, Y.K.; SALMINEN, S. The coming age of probiotics. **Trends Food Sci. Technol.**, Amsterdam, v.6, p.241-245, 1995.

LEITES fermentados com probióticos contribuem para uma vida mais saudável. **Food Ingredients**, São Paulo, maio/jun., n.6, 2000.

LOMHOLT, S.B.; QVIST, K.B. The formation of cheese curd. In: LAW, B.A., ed. **Technology of cheesemaking.** Boca Raton: CRC, 1999. p.66-98.

LOPEZ, C.; DUFOUR, E. The composition of the milk fat globule surface alters the structural characteristics of the coagulum. **J. Colloid Interf. Sci.**, London, v.233, p.241-249, 2001.

MATTILA-SANDHOLM, T. The PROBDEMO project: demonstration of the nutritional functionality of probiotic foods. **Trends Food Sci. Technol.**, Amsterdam, v.10, p.385-386, 1999.

MARSHALL, R.T., ed. **Standard methods for the examination of dairy products.** 16.ed. Washington: American Public Health Association, 1992. 546p.

MARTÍNEZ-CUESTA, M.C.; PALENCIA, P.F.; REQUENA, T.; PELÁEZ, C. Enzymatic ability of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* IPFPL731 for flavour development in cheese. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.11, p.577-585, 2001.

Mc BREARTY, S.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; COLLINS, J.K.; WALLACE, J.M.; STANTON, C. Influence of two commercially available bifidobacteria cultures on Cheddar cheese quality. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.11, p.599-610, 2001.

MENÉNDEZ, S.; CENTENO, J.A.; GODÍNEZ, R.; RODRÍGUES-OTERO, J.L. Effects of Lactobacillus strains on the ripening and organoleptic characteristics of Arzúa-Ulloa chesse. **Int. J. Food Microbiol**., Amsterdam, v.59, p.37-46, 2000.

MONTVILLE, T.J.; WINKOWSKI, K. Biologically based preservation systems and probiotic bacteria. In: DOYLE, M.P., BEUCHAT, L.R., MONTVILLE, T.J. **Food microbiology**: fundamentals and frontiers. Washington: ASM, 1997. p.557-577.

NAIDU, A.S.; CLEMENS, R.A. Probiotics. In: NAIDU, A.S. **Natural food antimicrobial systems.** Boca Raton: CRC, 2000. p.431-462.

NADER FILHO, A.; AMARAL, A.; ROSSI JR., O.D.; SCHOECKEN-ITURRINO, R.P. Características microbiológicas do leite pasteurizado dos tipos “B” e “C” processado por algumas usinas de beneficiamento do estado de São Paulo. **Hig. Alim.**, São Paulo, v.10, n.43, p.30-32, 1996.

NORMAN, G.R.; STREINER, D.L. **Biostatistics**: the bare essentials. St. Louis: Mosby-Year Book, 1994. 260p.

OKAZAKI, T.Y.; ALEGRO, J.H.A.; ROCHA, J.S.; SAAD, S.M.I. Microbiological profile of probiotic Minas cheese. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21, Foz do Iguaçu, 2001. **Resumos**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2001a. p.389, res. AL-091.

OKAZAKI, T.Y.; ALEGRO, J.H.A.; ROCHA, J.S.; SAAD, S.M.I. Perfil microbiológico de queijo Minas frescal probiótico. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo, v.37, supl.1, p.41, 2001. res. ALN42. (Semana de Ciência e Tecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 6, São Paulo, 2001b).

OLIVEIRA, C.A.F.; MORENO, J.F.G.; MESTIERI, L.; GERMANO, P.M.L. Características físico-químicas e microbiológicas de queijos Minas frescal e mussarela, produzidos em algumas fábricas de laticínios do Estado de São Paulo. **Hig. Alim.**, São Paulo, v.12, n.55, p.31-35, 1998.

OLIVEIRA, M.N.; LACERRA, A.A.; GIOIELLI, L.A.; BARUFFALDI, R. Effetto della temperatura e del tempo di coagulazione del latte sulla consistenza del formaggio "Minas frescal". In: PORRETA, S., ed. **Ricerche e innovazioni nell'industria alimentare.** Pinerolo: Chiriotti, 1995. v.2, p.575-584.

PEREIRA, M.L.; GASTELOIS, M.C.A.; BASTOS, E.M.A.F.; CAIAFFA, W.T.; FALEIRO, E.S.C.; HOFER, E. Queijo "tipo Minas".II - Contaminação por coliformes fecais e *Salmonella* sp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 19, Rio de Janeiro, 1997. **Resumos**. Rio de Janeiro, 1997. p.278, res. n.AL-062.

PEREIRA, M.L.; LARA, M.A.; DIAS, R.S.; CARMO, L.S. Intoxicação por *Staphylococcus aureus* provocada por queijo "tipo Minas". **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v.22, n.4, p.349-350, 1991.

PRENTICE, J.H.; LANGLEY, K.H.; MARSHALL, R.J. Cheese rheology. In: FOX, P.F., ed. **Cheese:** chemistry, physics and microbiology. London: Chapman & Hall, 1993. v.1, p.303-340.

REITSMA, C.J.; HENNING, D.R. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and curing of Cheddar cheese. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.59, n.5, p.460-464, 1996.

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

ROBERFROID, M.B. Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.71, n.6 (suppl.), p.1660-1664, 2000.

SABIONI, J.G.; MAIA, A.R.P. Correlação entre a população de *Staphylococcus aureus* e a atividade de termonuclease, em queijos Minas-frescal. **Hig. Alim.**, São Paulo, v.12, n.54, p.48-50, 1998.

SANDERS, M.E. Probiotics. **Food Technol**., Chicago, v.53, n.11, p.67-77, 1999.

SANDINE, W.E.; MURALIDHARA, K.S.; ELLIKER, P.R.; ENGLAND, D.C. Lactic acid bacteria in food and health: a review with special reference to enteropathogenic *Escherichia coli* as well as certain enteric diseases and their

treatment with antibiotics and lactobacilli. **J. Milk Food Technol.**, Orange, v.35, n.12, p.691-702, 1972.

SHAH, N.P.; LANKAPUTHRA, W.E.V. Improving viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in Yogurt. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.7, p.349-356, 1997.

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

SHAH, N.P.; RAVULA, R.R. Influence of water activity on fermentation, organic acid production and viability of yogurt and probiotic bacteria. **Austr. J. Dairy Technol.**, Melbourne, v.55, n.3, p.127-131, 2000.

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

SHIROSE, I.; MORI, E.E.M. **Estatística aplicada à análise sensorial:** módulo 1. Campinas: ITAL, 1994. 73p. (Manual Técnico, n.13).

SILVA, M.C.D.; HOFER, E.; TIBANA, A. Incidence of *Listeria monocytogenes*in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.61, n.3, p.354-356, 1998.

SOUZA, M.J.; ARDÖ, Y.; McSWEENEY, P.L.H. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.11, p.327-345, 2001.

SREEKUMAR, O.; HOSONO, A. Immediate effect of *Lactobacillus acidophilus* on the intestinal flora and fecal enzymes of rats and the *in vitro* inhibition of *Escherichia coli* in coculture. **J. Dairy Sci.**, Lancaster, v.83, n.5, 2000.

STANLEY, G. Microbiology of fermented milk products. In: EARLY, R., ed. **The technology of dairy products.** 2.ed. London: Blackie Academic & Professional, 1998. p.50-80.

STANTON, C.; GARDINER, G.; LYNCH, P.B.; COLLINS, J.K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R.P. Probiotic cheese. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.8, p.491-496, 1998.

STANTON, C.; GARDINER, G.; MUHAN, H.; COLLINS, J.K.; FITZGERALD, G.; LYNCH, P.B.; ROSS, R.P. Market potential for probiotics. **Am. J. Clinical Nutr.**, Bethesda, v.73, n.6 (suppl.), p.476-1835, 2001.

SVENSSON, U. Industrial perspectives. In: TANNOCK, G.W. **Probiotics**: a critical review. Wymondham: Horizon Scientific Press, 1999. p.57-64.

TEJADA-SIMON, M.V.; USTUNOL, Z.; PESTKA, J.J. Ex vivo effects of lactobacilli, streptococci, and bifidobacteria ingestion on cytokine and nitric oxide production in a murine model. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.62, n.2, p.162-169, 1999.

TUNICK, M.H.; COOKE, P.H.; MALIN, E.L.; SMITH, P.W.; HOLSINGER, V.H. Reorganization of casein submicelles in Mozzarella cheese during storage. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.7, p.149-155, 1997.

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.K., eds. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** 3.ed. Washington: American Public Health Association, 1992. 1219p.

VARNAM, A.H.; EVANS, M.G. *Escherichia coli*. In: VARNAM, A.H.; EVANS, M.G.; eds. **Foodborne pathogens.** St. Louis: Mosby Year Book, London: Wolfe, 1991. p.101-128.

VIEIRA, A.B.; VIEIRA, J.M.S.; RAIMUNDO, S.M.C.; ROBBS, P.G. Comportamento de *Listeria monocytogenes* em queijo Minas frescal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 17, Santos, 1993. **Programa e Resumos**. Santos: SBM, 1993. p.4, res. n.B1.014.

VINDEROLA, C.G.; PROSELLO, W.; GHIBERTO, D.; REINHEIMER, J.A. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian fresco cheese. **J. Dairy Sci.**, Lancaster, v.83, n.9, p.1905-1911, 2000.

WOLFSCHOON-POMBO, A.F.; CASAGRANDE, H.R.; LOURENÇO, J.P.M.N.; MUNCK, A.V. Alterações no queijo Minas frescal durante o período de armazenamento. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.39, n.233, p.3-9, 1984.

WOLFSON, L.M.; SUMNER, S.S. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system: a review. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.56, p.887-892, 1993.

ZIEMER, C.J.; GIBSON, G.R. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.8, p.473-479, 1998.

ZUBILLAGA, M.; WEILL, R.; POSTAIRE, E.; GOLDMAN, C.; CARO, R.; BOCCIO, J. Effect of probiotics and funcional foods and their use in different diseases. **Nutr. Res.**, New York, v.21, p. 569-579, 2001.

9. ANEXO I – Formulação dos meios de cultura para bactérias probióticas

Preparação do ágar MRS-IM – ***Lactobacillus acidophilus*** (de acordo com Christian Hansen)

Triptona ……..…….....…....	10,0 g
Extrato de levedura …….…….....	5,0 g
Tween 80 …….…….....…....	1,0 g
Dipotássio hidrogenofosfato …….….....	2,6 g
Sódio acetato tri-hidrato ……....…..	5,0 g
Di-amônio hidrogeno citrato ……....……..	2,0 g
Magnésio sulfato hepta-hidrato ……..……	0,2 g
Manganês (II) sulfato mono-hidrato ……..……	0,05 g
Ágar Bacteriológico …….....……..	13,0 g

Suspender os ingredientes em 1000 mL de água destilada. Ferver o meio até dissolução total. Distribuir em frascos e esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos. Esfriar a 47°C$\pm$1°C e adicionar 100 mL de solução de maltose a 20% estéril.

Preparação do ágar MRS-IM – ***Bifidobacterium lactis*** (de acordo com Christian Hansen)

Triptona ……..…….....……..	10,0 g
Extrato de levedura …….……....……	5,0 g
Tween 80 …….…….....…..	1,0 g
Di-potássio hidrogenofosfato ……..…….…..	2,6 g
Sódio acetato tri-hidrato …….....……..	5,0 g
Di-amônio hidrogeno citrato …….....…..	2,0 g
Magnésio sulfato hepta-hidrato ……..……	0,2 g
Manganês (II) sulfato mono-hidrato ……..……	0,05 g
Ágar Bacteriológico …….....……..	13,0 g

Suspender os ingredientes em 1000 mL de água destilada. Ferver o meio até dissolução total. Distribuir em frascos e esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos. Esfriar a 47°C ± 1°C e adicionar 100 mL de solução de glicose a 20% estéril.

Adicionar soluções A (5mL/1000mL meio), B (10ml/1000ml meio), C (5mL/1000mL meio) previamente filtradas em filtro Sterifil®-D HA 0.45µm (Milipore, São Paulo, Sp, Brasil), anteriormente ao plaqueamento à temperatura de ± 48 °C.

Solução A – Dichloxallin 10 mg – (Sigma D-9016) diluído em água destilada q.s.p. 100mL.

Solução B – Cloreto de lítio 2 g – (Merck No. 5679) diluído em 18 g de água destilada.

Solução C – Hidroclorido de cisteína 10 g – (Merck No. 2839) diluído em água destilada q.s.p. 100mL.

10. ANEXO II – MODELO DO QUESTIONÁRIO DE ANÁLISE SENSORIAL

ANÁLISE SENSORIAL DE QUEIJO MINAS FRESCAL

Nome:_____

Data: ___/___/____

Instruções:

Experimente as amostras e expresse a sua preferência global da seguinte maneira:

(1) para a **melhor** amostra;

(2) para a amostra **intermediária boa**;

(3) para a amostra **intermediária ruim**;

(4) para a **pior** amostra.

Código da amostra 238 401 685 729

_____

Valor atribuído _____ _____ _____ _____

_____

Modelo

Observações:_____

_____

_____

_____