

Artigo Técnico

VIABILIDADE PROBIÓTICA DE QUEIJOS MINAS FRESCAL COM TEOR REDUZIDO DE LACTOSE

Probiotic viability of Minas Fresh cheeses with reduced lactose content

Daniele BACK^{1*}

Paula MATTANNA²

Diego Fontana de ANDRADE³

Greice Dotto SIMÕES⁴

Neila S. P. S. RICHARDS⁵

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade dos micro-organismos probióticos *Lactobacillus acidophilus* LA-5 e *Bifidobacterium* sp. BB-12 adicionados a diferentes formulações de queijo Minas Frescal com teor reduzido de lactose. Oito formulações de queijo Minas Frescal foram desenvolvidas, sendo denominadas T1 a T6 as adicionadas de 1% da cultura probiótica, com concentrações de enzima lactase de 0,3g/L 0,6g/L e 0,9g/L e tempos de reação de hidrólise de 12 e 24 horas, e as formulações controles T7 (sem lactase e 1% da cultura probiótica) e T8 (sem lactase e sem probiótico). Os queijos foram submetidos a análises microbiológicas de contagem dos micro-organismos probióticos semanalmente durante o período de armazenamento, bem como a análises físico-químicas de gordura, proteína, umidade, cinzas, gordura no extrato seco, acidez titulável e pH. As reduções dos teores de lactose dos queijos adicionados de lactase variaram de 73,14 a 93,23%. Apesar das contagens de *Lactobacillus acidophilus* ($4,38 \pm 0,01$ a $7,88 \pm 0,07$ log UFC.g-1) não terem atingido o valores mínimos de 106 UFC.g-1 em todos os dias de armazenamento dos queijos, a população de *Bifidobacterium* sp. ($6,05 \pm 0,08$ e $7,90 \pm 0,04$ log UFC.g-1) manteve-se acima de 6,00 log UFC.g-1 para todas as formulações desenvolvidas, conferindo assim característica probiótica aos queijos. Os resultados obtidos demonstram a possibilidade da incorporação de bactérias probióticas em queijos com teor reduzido de lactose, sendo assim uma alternativa inovadora ao mercado de intolerantes a esse carboidrato.

Palavras-chaves: lactase; probióticos; lácteos.

- 1 Química Industrial - Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos - Universidade Federal de Santa Maria – UFSM – Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: danieleback@hotmail.com
 - 2 Farmacêutica - Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Doutoranda no Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM – Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: mattannapaula@hotmail.com
 - 3 Farmacêutico - Mestrando no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: dieguandrade@hotmail.com
 - 4 Graduanda em Tecnologia de Alimentos- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail:reicedotto@bol.com.br
 - 5 Engenharia de Alimentos - Professora Doutora do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos –Universidade Federal de Santa Maria - UFSM - Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: neilarichards@uol.com.br
- * Autor para correspondência: Universidade Federal de Santa Maria – UFSM – Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos. Avenida Roraima, nº 1000 – CEP: 97105-900 - Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: danieleback@hotmail.com

ABSTRACT

The aim was to assess the viability of probiotic microorganisms *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* sp. added to different formulations of Minas fresh cheese with reduced content of lactose. Eight formulations of Minas fresh cheese were developed, named T1 to T6 those added of 1% of the probiotic culture, with concentrations of lactase 0,3 g/L, 0,6 g/L and 0,9 g/L and hydrolysis time of 12 and 24 hours, and the control formulation T7 (without lactase and 1% of the probiotic culture) and T8 (no lactase and without probiotic). The cheeses were subjected to a microbiological count of probiotic microorganisms weekly during the storage period, as well as the physical-chemical analysis of fat, protein, moisture, ash, fat in dry matter, acidity and pH. The reduction of lactose in cheeses with added lactase ranged from 73,14 to 93,23%. Although the counts of *Lactobacillus acidophilus* ($4,38 \pm 0,01$ a $7,88 \pm 0,07$ log cfu.g-1) have not reached the minimum value of 106 cfu g-1 on all days of storage, the population of *Bifidobacterium* sp. ($6,05 \pm 0,08$ e $7,90 \pm 0,04$ log cfu.g-1) remained above 6.00 log cfu.g-1 for all the formulations, thus providing probiotic feature to cheeses. The results demonstrate the possibility of the incorporation of probiotic bacteria in cheeses with low lactose content, so an innovative alternative to the lactose intolerant market.

Keywords: lactase; probiotics; dairy.

1 INTRODUÇÃO

Alimentos contendo bactérias probióticas são classificados como alimentos funcionais, sendo os probióticos definidos como micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001).

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

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

Os micro-organismos probióticos devem apresentar células viáveis em quantidades adequadas no alimento durante toda a estocagem do produto, sendo a dose diária de consumo recomendada de 108-109 Unidades Formadoras de Colônia (UFC), realizada através da ingestão de 100 g de produto contendo 106 – 107 UFC/g ou mL (ANVISA, 2008).

Diversos autores testaram a incorporação de diferentes bactérias probióticas em diversos tipos

de queijos, entre eles e o Cream Cheese (BURITI et al., 2007; BURITI et al., 2008; ALVES et al., 2008), Petit Suisse, (MARUYAMA et al., 2006), Cheddar (GARDINER et al., 1999; ONG; SHAH, 2009), Cottage (PARODIA, 2010) e Minas Frescal (BURITI et al., 2005a; BURITI et al., 2005b; RIBEIRO et al., 2009; SOUZA; SAAD, 2009; FRITZEN-FREIRE et al., 2010a, FRITZEN-FREIRE et al., 2010b).

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

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

Porém, quando se trata do consumo de leite e seus derivados lácteos, estudos evidenciam que uma porcentagem significativa da população mundial sofre com transtornos gastrointestinais, tais como flatulência, desconforto abdominal, diarreia e náusea (ANTUNES; PACHECO, 2009). Este transtorno é chamado de intolerância à lactose, ou seja, é a incapacidade de digerir a lactose, o principal açúcar do leite, devido à deficiência ou ausência da enzima β -galactosidase

no sistema digestivo (ANGELIS, 2006). O tratamento da intolerância à lactose consiste basicamente na retirada ou diminuição desse açúcar da dieta, o que leva ao desaparecimento progressivo dos sintomas. No entanto, esses indivíduos estariam deixando de usufruir dos benefícios do leite à saúde humana (SUAREZ; SAVAIANO, 1997; CUNHA et al., 2007).

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

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

2 MATERIAL E MÉTODOS

Hidrólise da Lactose

Antes do preparo dos queijos, o leite pasteurizado adquirido comercialmente teve sua lactose hidrolisada pela ação da enzima β -galactosidase Lactozym® 3000L HPG (Novozymes), nas seguintes concentrações e tempos de reação: 0,3 g/L de enzima lactase por 12 horas; 0,6 g/L de enzima lactase por 12 horas; 0,9 g/L de enzima lactase por 12 horas; 0,3 g/L de enzima lactase por 24 horas; 0,6 g/L de enzima lactase por 24 horas; 0,9 g/L de enzima lactase por 24 horas. Os leites foram armazenados em frascos de vidro esterilizados e mantidos à temperatura de $5 + 1^{\circ}\text{C}$ durante o período de hidrólise. Depois de transcorridos os tempos de reação, o leite sofreu pasteurização lenta ($63\text{-}65^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos), com o intuito de inativar a enzima.

Elaboração dos Queijos

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

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

Análises Físico-químicas

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

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

Nos tratamentos que não sofreram hidrólise (T7 e T8), a lactose foi determinada por titulação pelo

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

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

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

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

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

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

Análises Microbiológicas

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

Para a enumeração de *L. acidophilus* foi utilizado meio MRS-ágar adicionado de solução de maltose a 20% (IDF, 1999) e para a contagem de *Bifidobacterium sp.* utilizou-se meio MRS-ágar adicionado de solução de glicose a 20%, solução de dicloxacilina a 0,01%, solução de cloreto de lítio a 11,11% e de solução de cloreto de cisteína a 10% (CHR. HANSEN, 1999). As placas foram incubadas invertidas em jarras contendo gerador de anaerobiose Anaerobac (Probac) à 37°C por 72 horas (CHR. HANSEN, 1999). Após esse período de incubação foi realizada a contagem de células viáveis probióticas (em duplicata), expressa em log de unidade formadora de colônia por mL (log UFC/mL).

Análise Estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas entre si pelo Teste de Tukey a nível de 5% de significância ($p < 0,05$), utilizando-se do programa estatístico SPSS 13.0 (NORUSIS, 2005).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Grau de hidrólise da lactose do leite

O grau de hidrólise foi calculado através da fórmula apresentada anteriormente (equação 1),

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

Lactose dos queijos

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

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

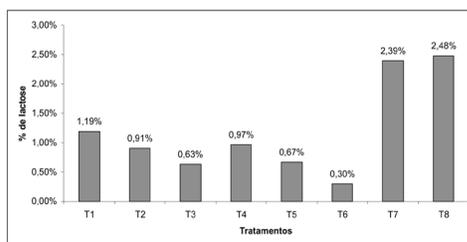


Figura 1 - Teores de lactose dos queijos Minas Frescal elaborados. Legenda: Leites tratados enzimaticamente (T1 a T6); leites não tratados (T7 e T8)

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

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

Segundo Manan et al. (1999) os sintomas de intolerância à lactose podem ser eliminados quando a lactose é reduzida em 70%. Desta forma, os teores de lactose dos tratamentos adicionados de enzima

lactase (T1 a T6) deste estudo podem ser considerados baixos, sendo uma alternativa viável às pessoas com intolerância à lactose. Porém, somente o tratamento T6 encontra-se de acordo com as normas vigentes para alimentos destinados a fins especiais, que preconiza que os alimentos elaborados especialmente para atender às necessidades de portadores de intolerância à ingestão de dissacarídeos devem atender ao máximo de 0,5 g do nutriente em restrito, por 100 g ou 100 mL do produto a ser consumido (ANVISA, 1998).

Características físico-químicas dos queijos

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

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

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

Nas Figuras 2 e 3 são apresentadas as variações

dos valores de pH e acidez titulável dos queijos (T1 a T8) durante os 21 dias de armazenamento. Observou-se um decréscimo significativo ($p < 0,05$) dos valores de pH de todos os tratamentos até o 21º dia de análise. A queda do pH foi mais acentuada do 1º ao 7º dia, permanecendo estável até o 14º dia e decrescendo novamente ao 21º dia de análise. Valores médios de pH ficaram na faixa entre 6,61 a 5,23, valores estes semelhantes aos encontrados por Buriti et al. (2005b) (entre 6,72 a 5,37) em estudo avaliando as propriedades de queijo Minas Frescal adicionado de *Lactobacillus acidophilus*.

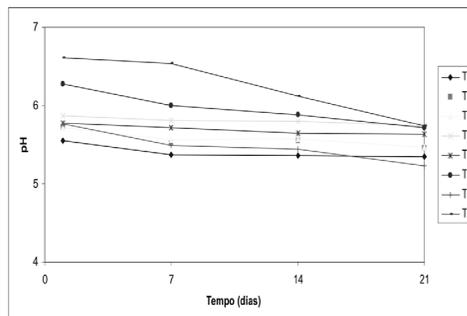


Figura 2 - Valores de pH dos queijos elaborados durante os 21 dias de armazenamento.

Legenda: Leites tratados enzimaticamente (T1 a T6); leites não tratados (T7 e T8)

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

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

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

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

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

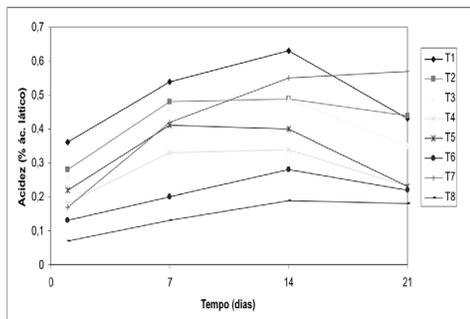


Figura 3 - Valores de acidez (expressos em % de ácido láctico) dos queijos durante os 21 dias de armazenamento. Legenda: Leites tratados enzimaticamente (T1 a T6); leites não tratados (T7 e T8).

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

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

relação aos demais queijos.

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

Contagens dos micro-organismos probióticos

As contagens do micro-organismo *Lactobacillus acidophilus* nos queijos T1 a T7 são apresentadas na Tabela 3. Pode-se observar um aumento significativo da população de *Lactobacillus acidophilus* até o 21º dia de armazenamento para todos os queijos, porém todos os tratamentos apresentaram contagens abaixo de 106 UFC.g-1 em pelo menos um dia de análise. As maiores contagens de *L. acidophilus* foram apresentadas no tratamento T7, as quais variaram de 5,90 a 7,58 log UFC.g-1, aumentando significativamente ($p < 0,05$) em todos os dias de análise.

O tratamento T6, o qual sofreu maior porcentagem de hidrólise da lactose, apresentou menores valores de contagem de *L. acidophilus* nos dias 1, 7 e 14 quando comparados aos demais tratamentos, porém no último dia de estocagem a contagem aumentou significativamente ($p < 0,05$) para 7,88 log UFC.g-1, um aumento de aproximadamente 3 ciclos logarítmicos.

Segundo Zacarchenco; Massaguer-Roig (2004) as contagens de células viáveis de *L. acidophilus* em leites fermentados na presença de *Bifidobacterium* apresentaram uma redução de 8 log₁₀ UFC/mL para 107 UFC/mL. Vinderola et al. (2000) concluiu que *L. acidophilus* é mais sensível que *Bifidobacterium* ao pH de queijos. Estes fatores podem explicar a baixa contagem inicial de *L. acidophilus* nos queijos analisados.

As contagens de *Bifidobacterium sp.* durante os 21 dias de armazenamento são apresentadas na Tabela 4. Observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$), para todos os tratamentos, da população de *Bifidobacterium* entre o 1º e 21º dia. Observa-se que as diferentes adições

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

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

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

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

de enzima lactase aos queijos do presente estudo não afetaram a viabilidade das bifidobactérias.

Durante todo o período de armazenamento dos queijos, as contagens de *Bifidobacterium* mantiveram-se sempre acima de 6 log UFC/g, em todas as formulações. Desse modo, as contagens desse micro-organismo foram suficientes para conferir propriedade probiótica aos queijos desenvolvidos nesse estudo, considerando o consumo diário de 100 g de queijo contendo 106 a 107 UFC/g (ANVISA, 2008).

Buriti et al. (2005b) obtiveram contagens de *Lactobacillus acidophilus* ente de 106-107 UFC.g-1 em queijo Minas Frescal, resultados também comprovados por Souza & Saad (2009) em trabalho com o mesmo tipo de queijo. Porém no presente estudo, a baixa viabilidade de *L. acidophilus* pode ter sofrido influência dos baixos teores de lactose dos queijos. Já as maiores contagens de *Bifidobacterium sp.* pode ter sido em virtude deste micro-organismo ser também capaz de fermentar hidratos de carbono complexos (CROCIANI et al., 1994). Maruyama et al. (2006), encontraram contagens de *L. acidophilus* cerca de 1 ciclo log menores das apresentadas por *Bifidobacterium longum* em queijos *petit-suisse*, sugerindo que se aumentasse a percentagem da cultura de *L. acidophilus* para resultados mais favoráveis.

Em estudo desenvolvido por Becker (2009), os micro-organismos probióticos *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* se mantiveram viáveis até o fim da vida de prateleira em iogurtes adicionados de enzima lactase nas concentrações de 0,2, 0,5 e 0,8%, confirmando a possibilidade do desenvolvimento destes micro-organismos mesmo a baixos teores de lactose, assim como no presente trabalho, uma vez que as concentrações de bifidobactéria mantiveram-se sempre acima de 106 UFC.g-1.

4 CONCLUSÕES

A enzima lactase utilizada em concentrações de 0,3, 0,6 e 0,9 g/L reduziu de maneira eficaz o

conteúdo de lactose nos queijos, uma vez que estas reduções foram superiores a 70%, podendo se inferir que as formulações com teores reduzidos de lactose desenvolvidas neste estudo podem diminuir os sintomas de intolerância.

As contagens de *Bifidobacterium sp.* mantiveram-se sempre acima de 106 UFC.g-1, conferindo potencialidade probiótica às formulações de queijo Minas Frescal desenvolvidas, independente da quantidade de enzima lactase adicionada. Na contagem de *Lactobacillus acidophilus* todos os tratamentos apresentaram contagens abaixo de 106 UFC.g-1 em pelo menos um dia de análise, porém, houve aumento significativo da população até o 21º dia de armazenamento para todos os queijos analisados.

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

AGRADECIMENTOS

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

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, L. L. et al. Avaliação sensorial de cream cheeses potencialmente simbióticos utilizando a metodologia de superfície de resposta. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.19, n.4, p. 409-416, 2008.
- ANGELIS, R. C. **Alergias alimentares**. São Paulo: Atheneu, 2006. 123p.
- ANTUNES, A. E. C.; PACHECO, M. T. B. **Leite para adultos: mitos e fatos frente à ciência**. São Paulo: Varela, 2009. 457p.

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

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

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

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

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Portaria nº 29 de 13 de janeiro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico referente a Alimentos para Fins Especiais, constante do anexo desta Portaria. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 15 jan. 1998. Seção 1-E, p. 8.

_____. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. IX – Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, jul 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/teco_lista_alega.htm>. Acesso em 23 dez. 2010.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 352, de 04 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 08 set. 1997. Seção 1, p. 19684.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 4, de 01 de março de 2004. Inclui o termo Muito na expressão Alta Umidade nos itens 2.2 (Classificação), 4.2.3 (Requisitos Físico-Químicos) e 5.1 (Aditivos), no Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 05 mar. 2004.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 14 dez. 2006. Seção 1, p. 8.

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

BURITI, F.C.A. et al. Textura instrumental e avaliação sensorial de queijo fresco cremoso simbiótico: implicações da adição de *Lactobacillus paracasei* inulina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.44, n.1, p.75-84, 2008.

_____. et al. Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*.

LWT - Food Science and Technology, Oxford, v.38, n.2, p.173-180, 2005a.

_____. et al. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implication for textural and sensory properties during storage. **International Dairy Journal**, Oxford, v.15, n.12, p.1279-1288, 2005b.

CARUSO, E.C.; OLIVEIRA, A.J. Quantificação de lactose em queijo Minas Frescal. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.56, n.1, p. 243-246, 1999.

CHR. HANSEN. Method for counting probiotic bacteria. *Lactobacillus acidophilus*, **Lactobacillus casei** and **Bifidobacteria in milk products made with nutrish cultures**. Horsholm, Dinamarca, 1999. 9p. (Guideline).

CROCIANI, F. et al. Degradation of complex carbohydrates by *Bifidobacterium* ssp. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.24, n. 1-2, p.199-210, 1994.

CUNHA, L. R. et al. Desenvolvimento e avaliação de embalagem ativa com incorporação de lactase. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, suppl. 1, p.23-26, 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO/WHO). **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, 2001. 34p. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probiereport_en.pdf>. Acesso em: 03 fev. 2012.

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

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

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

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

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

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Detection and enumeration of *Lactobacillus acidophilus***. Brussels: FIL/IDF, 1999. n. 306, p. 23-33.

MANAN, D.M.A.; KARIM, A.A.; KIT, W.K. Lactose content of modified enzyme-treated “dadih”. **Food Chemistry**, Oxford, v. 65, n.4, p.439-443, 1999.

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

MATTANNA, P. et al. Perfil lipídico, caracterização físico-química e sensorial de requeijão com baixo teor de lactose e requeijões comerciais. **Revista Indústria de Laticínios**, São Paulo, v.15, n.87, p. 62-67, 2010.

NORUSIS, M. SPSS 13.0: **Guide to Data Analysis**. Upper Saddle River, NJ: Prentice-Hall, 2005.

ONG, L.; SHAH, N.P. Probiotic Cheddar cheese: Influence of ripening temperatures on survival of probiotic microorganisms, cheese composition and organic acid profiles. **LWT- Food Science and Technology**, Oxford, v.42, n.7, p.1260-1268, 2009.

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

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

PEREDA, J.A.O. et al. **Tecnologia de alimentos**. Alimentos de origem animal. São Paulo: Artmed. 2005. v.2, 279p.

RIBEIRO, E.P. et al. Desenvolvimento de queijo minas frescal adicionado de *Lactobacillus acidophilus* produzido a partir de retentados de ultrafiltração.

Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v.29, n.1, p19-23, 2009.

SAARELA, M. et al. Gut bacteria and health foods – the European perspective. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.78, n.1-2, p.99-117, 2002.

SCHMID, K. et al. Development of probiotic food ingredients. In: GOKTEPE, I.; JUNEJA, V. K.; AHMEDNA. **Probiotics in food safety and human health**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. p. 35-66

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

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

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

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

VASILJEVIC, T., SHAH, N.P. Probiotics - From Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, Oxford, v.18, n.7, p.714– 728, 2008.

VINDEROLA, C.G. et al. Survival of probiotic microflora in Argentinean yogurts during refrigerated storage. **Food Research International**, Ontario, v. 33, n.2, p. 97-102, 2000.

ZACARCHENCO, P.B.; MASSAGUER-ROIG, S. Avaliação sensorial, microbiológica e de pós-acidificação durante a vida-de-prateleira de leites fermentados contendo *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus acidophilus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n.4, p. 674-679, 2004.

Onde você vê leite a gente vê tecnologia

Há mais de 45 anos, o Macalé é referência
em tecnologia no setor de laticínios.

Uma tradição de qualidade e parcerias sólidas
que oferecem sempre os melhores ingredientes
e serviços ao mercado laticinista brasileiro.

Por isso, na hora de produzir com qualidade e
inovação, conte com a gente.



Macalé
Produtos para Laticínios

www.macale.com

Distribuidor Autorizado

