

EMILIANE ANDRADE ARAÚJO

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE QUEIJO TIPO
COTTAGE ADICIONADO DE *Lactobacillus delbrueckii*
UFV H2b20 E DE INULINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

A663d
2007

Araújo, Emiliane Andrade, 1981-

Desenvolvimento e caracterização de queijo tipo Cottage adicionado de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 e de inulina / Emiliane Andrade Araújo. – Viçosa, MG, 2007. xi, 54f. : il. ; 29cm.

Orientador: Antônio Fernandes de Carvalho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Alimentos - Biotecnologia. 2. Alimentos funcionais.
3. Queijo - Microbiologia. 4. Queijo fresco. 5. Probióticos.
6. Lactobacilo. 7. Inulina. 8. Sistema gastrointestinal -
Microbiologia. I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

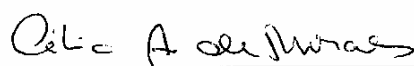
CDD 22.ed. 664

EMILIANE ANDRADE ARAÚJO

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE QUEIJO TIPO
COTTAGE ADICIONADO DE *Lactobacillus delbrueckii*
UFV H2b20 E DE INULINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

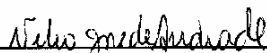
APROVADA: 13 de fevereiro de 2007.



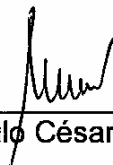
Prof. Célia Alencar de Moraes
(Co-orientadora)



Prof. Mauro Mansur Furtado
(Co-orientador)



Prof. Nélio José de Andrade



Prof. Paulo César Stringheta



Prof. Antônio Fernandes de Carvalho
(Orientador)

Ao André Gustavo Rodrigues Lages
(*in memoriam*)

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante em minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização do curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Antônio Fernandes de Carvalho, pela orientação, pela confiança e pelo apoio.

Aos professores Célia Alencar de Moraes e Mauro Mansur Furtado, pela participação e pelas sugestões.

Ao professor Fabyano, pela ajuda estatística.

Aos meus pais, Adimar e Mires, pela dedicação, pelo carinho e estímulo em mais essa etapa.

À Viviane e Liliane, pela alegria de tê-las como irmãs.

À minha avó Lili e às minhas tias, especialmente à Silvânia, e aos primos, por acreditarem em mim.

Ao Tadeu, Mirtes e Luís Henrique, pelo apoio e pela amizade verdadeira.

Em especial, ao André Gustavo, pelo amor e companheirismo em todos os momentos, mas infelizmente não pôde concluir comigo esta etapa.

À Eliana, e à Ana Paula, pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho e pela amizade.

Aos meus estagiários Atílio e Everton, pela ajuda durante a execução deste trabalho.

À Ana Clarissa, pelas sugestões, pelos risos e pela companhia.

Aos meus amigos de Pós-Graduação, pela convivência agradável.

Aos funcionários do DTA, pelo auxílio na concretização deste trabalho.

A todos, que de alguma forma, contribuíram para o sucesso deste trabalho.

BIOGRAFIA

EMILIANE ANDRADE ARAUJO, filha de Adimar Fonseca de Araújo e Mires Geralda Andrade Araújo, nasceu em Ipatinga, Minas Gerais, em 17 de setembro de 1981.

Em fevereiro de 2001, iniciou o curso de Ciência e Tecnologia de Laticínios na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em janeiro de 2005.

Em fevereiro do mesmo ano, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, em nível de Mestrado, tendo defendido a dissertação em 13 de fevereiro de 2007.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	3
CAPÍTULO 1	4
DESENVOLVIMENTO E ESTUDO DE PARÂMETROS QUALI- TATIVOS DE QUEIJO TIPO COTTAGE SIMBIÓTICO	4
1. INTRODUÇÃO.....	4
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
2.1. Produção de cultura estoque de <i>L. delbrueckii</i> UFV 2b20	13
2.2. Produção do concentrado de células viáveis de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20	14
2.3. Produção do queijo tipo Cottage simbiótico.....	14
2.4. Viabilidade de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 ao longo da vida- de-prateleira do queijo Cottage simbiótico.....	17
2.5. Quantificação da substância prebiótica inulina no queijo tipo Cottage simbiótico	17
2.6. Análises físico-químicas e microbiológicas do queijo.....	18
2.7. Avaliação sensorial do queijo tipo Cottage simbiótico.....	19
2.8. Análises estatísticas.....	19

	Página
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
3.1. Viabilidade de <i>L.delbrueckii</i> UFV H2b20 na estocagem do queijo tipo Cottage simbiótico.....	20
3.2. Quantificação da substância prebiótica inulina presente no queijo tipo Cottage simbiótico	22
3.3. Análise físico-química e microbiológica do queijo tipo Cottage simbiótico e queijo controle	23
3.4. Avaliação sensorial do queijo tipo Cottage simbiótico e queijo controle.....	24
4. RESUMO E CONCLUSÕES	27
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
CAPÍTULO 2.....	33
ESTUDO DE SOBREVIVÊNCIA DE <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV H2B20 EM CONDIÇÕES DE SIMULAÇÃO DO TRATO GASTRO DIGESTÓRIO	33
1. INTRODUÇÃO.....	33
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
2.1. Microrganismo.....	39
2.2. Produção do concentrado de células viáveis de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20	40
2.3. Produção do queijo tipo Cottage simbiótico	40
2.4. Simulação das condições do trato gastro digestório.....	41
2.5. Análises estatísticas.....	41
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
3.1. Sobrevivência de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 sob condições ácidas.....	42
3.2. Sobrevivência de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 exposto a diferentes concentrações de sais biliares.....	45
4. RESUMO E CONCLUSÃO	50
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
3. CONCLUSÃO GERAL	54

RESUMO

ARAUJO, Emiliane Andrade, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2007. **Desenvolvimento e caracterização de queijo tipo Cottage adicionado de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 e de inulina.** Orientador: Antônio Fernandes de Carvalho. Co-orientadores: Mauro Mansur Furtado e Célia Alencar de Moraes.

Probióticos são microrganismos que quando ingeridos no alimento em quantidades adequadas promovem efeitos benéficos à saúde do hospedeiro. Prebióticos são ingredientes não digeríveis que atuam estimulando seletivamente o crescimento ou atividade metabólica de bactérias benéficas no cólon. Simbiótico é um produto alimentício que contém células probióticas e substâncias prebióticas. Este trabalho teve como objetivos: I) desenvolver um queijo tipo Cottage simbiótico adicionado de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 e de inulina (BENEO Raftiline GR); II) acompanhar a viabilidade do microrganismo probiótico *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 cultivado no soro ao longo da vida de prateleira do queijo tipo Cottage, estocado a 5°C; III) avaliar a sobrevivência da estirpe *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 presente no queijo tipo Cottage exposta a condições típicas encontradas no trato gastro digestório; IV) comparar as características físico-químicas e microbiológicas do queijo tipo Cottage simbiótico com o queijo tipo Cottage controle; V) avaliar as implicações decorrentes da adição da

cultura probiótica e da substância prebiótica nas características sensoriais do queijo tipo Cottage. Após análise dos resultados, observou-se que durante toda a vida de prateleira do queijo estocado a 5 °C, o número de células viáveis manteve-se contagem sempre acima do nível recomendado para o produto ser considerado probiótico: 10^8 UFC.g⁻¹. O teor de inulina determinada no queijo foi de 4,9% (p/p), quantidade também suficiente para exercer efeitos benéficos no indivíduo. Observou-se que o microrganismo apresentou boa resistência a baixos valores de pH e a concentrações elevadas de sais biliares. A estirpe *L. delbrueckii* UFVH2b20 sobreviveria às condições normais do trato gastro digestório quando adicionada em queijo tipo Cottage simbiótico. A adição de células probióticas de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 não produziu alterações sensoriais nem alterações físico-químicas no queijo tipo Cottage simbiótico após 15 dias de estocagem a 5 °C. A adição complementar de inulina também não produziu mudança significativa ($p \geq 0,05$) na análise sensorial quando comparado ao queijo controle durante o armazenamento.

ABSTRACT

ARAÚJO, Emiliane Andrade, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2007. **Development and characterization of Cottage-like Cheese additioned of *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 and inulin.** Adviser: Antônio Fernandes de Carvalho. Co-advisers: Mauro Mansur Furtado and Célia Alencar de Moraes.

Probiotics are microorganisms which promote beneficial effects on the health of their host when ingested with food in adequate quantities. Prebiotics, on the other hand, are indigestible ingredients which selectively stimulate the growth or the metabolic activity of beneficial bacteria in the colon. A product is called symbiotic when it contains probiotic cells and prebiotic substances. The objectives of this work were: I) to develop cottage-like symbiotic cheese with the addition of *Lactobacillus delbrueckii* UFVH2b20 and inulin (BENEO Raftiline GR); II) to follow the viability of the probiotic microorganism *Lactobacillus delbrueckii* UFVH2b20 cultivated in whey for the duration of the shelf life of cottage-like cheese, stored at 5°C; III) to evaluate the survival of *Lactobacillus delbrueckii* UFVH2b20 strain present in cottage-like cheese when exposed to typical digestive gastric tract conditions; IV) to compare the physical-chemical and the microbiological characteristics of the cottage-like symbiotic cheese and the control cottage-like cheese.; V) to evaluate the sensory effects resulting from the addition of the probiotic culture and prebiotic substance to cottage-like cheese.

Throughout the shelf life period, the cheese, which was stored at 5°C, maintained a microorganisms count above the level recommended for food considered to be probiotic: 10^8 CUF.g⁻¹. The inulin content of the cheese amounted to 4.9%, a quantity also considered as sufficient for beneficial effects on an individual. High resistance of the microorganism to low pH and high concentrations of bile salts were observed, suggesting that the *Lactobacillus delbrueckii* UFVH2b20 strain would survive under normal digestive gastric tract conditions when added to cottage-like symbiotic cheese. The addition of probiotic cells of *Lactobacillus delbrueckii* UFVH2b20 caused neither sensory nor physical-chemical alterations to the cottage-like symbiotic cheese after 15 days of storage at 5°C. The complementary addition of inulin also had no significant effect on sensory analysis when compared to the control sample throughout storage time.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O papel de uma alimentação saudável na manutenção da saúde tem despertado interesse aos consumidores e à comunidade científica que tem produzido inúmeros estudos com o intuito de comprovar a atuação de componentes bioativos na redução de riscos de certas doenças. Em virtude dos efeitos benéficos produzidos por estes compostos, tem havido um considerável interesse por parte das indústrias em desenvolver produtos alimentícios que contenham estes ingredientes.

Probióticos são microrganismos vivos, que quando ingeridos em determinado número são capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (SALMINEN *et al.*, 1999).

A estirpe probiótica *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 foi isolada no Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, de fezes de recém-nascido alimentado exclusivamente com leite materno e apresenta características adequadas para aplicação como probiótico. A partir de seu isolamento vários trabalhos foram conduzidos com o intuito de demonstrar suas características promissoras, que podem qualificá-lo como probiótico.

As células probióticas depois de ingeridas devem ser capazes de sobreviverem às condições de estresse presentes no trato gastro digestório, como suco gástrico, presença de sais biliares e enzimas digestivas para

exercerem os efeitos benéficos aos hospedeiros. Quanto aos desafios tecnológicos para a produção industrial de células, estas devem manter-se estáveis e viáveis em níveis satisfatórios durante todo o prazo de validade do produto.

Prebióticos são definidos como oligossacarídeos que não são digeríveis no intestino delgado e atingem o intestino grosso onde atua estimulando seletivamente o crescimento de bactérias bífidas residentes no trato gastro digestório, alterando a microbiota em favor de uma composição mais saudável (MANNING *et al.*, 2004). Os oligossacarídeos, como os frutooligossacarídeos (FOS) e inulina atendem as condições dos prebióticos.

Simbióticos referem-se à combinação de bactérias probióticas e de substâncias prebióticas que afeta beneficemente o hospedeiro por melhorar a sobrevivência e implantação de microrganismos vivos no trato gastro digestório e por selecionar seletivamente o crescimento ou atividade metabólica de bactérias promotoras de saúde no cólon.

Os usos mais comuns de microrganismos probióticos têm sido em produtos lácteos: leites fermentados, sorvetes e queijos. O queijo tipo Cottage, por permitir ao microrganismo conservação na sua forma viável, apresenta características desejáveis para incorporação de uma estirpe probiótica. As células probióticas podem ser adicionadas ao *dressing*, líquido cremoso que envolve os grânulos do queijo. Além disso, ao *dressing* também pode ser adicionado a substância prebiótica, tornando o produto um alimento simbiótico.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivos: I) desenvolver um queijo tipo Cottage simbiótico adicionado de *L. delbrueckii* UFV H2b20 e de inulina (BENEO Raftiline GR); II) acompanhar a viabilidade do microrganismo probiótico *L. delbrueckii* UFV H2b20 cultivado no soro ao longo da vida de prateleira do queijo tipo Cottage, estocado a 5°C; III) avaliar a sobrevivência da estirpe *L. delbrueckii* UFV H2b20 presente no queijo tipo Cottage exposta a condições típicas encontradas no trato gastro digestório; IV) comparar as características físico-químicas e microbiológicas do com o queijo tipo cottage controle; V) avaliar as implicações decorrentes da adição da cultura probiótica e da substância prebiótica nas características sensoriais do queijo tipo Cottage.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.; BENNO, Y.; LEE, Y.K. Probiotics: how should they be defined? **Trends in Food Science & Technology**. v. 10. p. 107-110, 1999.

MANNING, T. S.; GIBSON, G. R. Microbial-gut interactions in health and disease. Prebiotics. **Best Practice Research Clinical Gastroenterology**, v. 18, n. 2, p. 287-298, 2004.

CAPÍTULO 1

DESENVOLVIMENTO E ESTUDO DE PARÂMETROS QUALITATIVOS DE QUEIJO TIPO COTTAGE SIMBIÓTICO

1. INTRODUÇÃO

O papel da alimentação equilibrada na manutenção da saúde tem despertado interesse pela comunidade científica que tem produzido inúmeros estudos com o intuito de comprovar a atuação de alguns alimentos na redução de riscos de certas doenças. Consumidores preocupados com a saúde estão cada vez mais buscando alimentos funcionais num esforço para controlar sua própria saúde e o bem-estar.

Alimentos funcionais são aqueles alimentos ou ingredientes que, além das funções nutricionais básicas, quando consumidos como parte da dieta usual, produzem efeitos metabólicos e, ou, fisiológicos e, ou, efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica (BRASIL, 1999).

O termo alimentos funcionais foi primeiramente introduzido no Japão em meados dos anos 80. Até esta data, o Japão era o único país que tinha formulado um processo de regulação específico para os alimentos funcionais, conhecidos como Alimentos para Uso Específico de Saúde (FOSHU) (ROBERFROID, 2000a).

O alimento ou ingrediente que alegar propriedades funcionais irá desencadear efeitos benéficos à saúde e deverá ser seguro para o consumo

sem supervisão médica. É importante salientar que antes do produto ser liberado para o consumo deve obter registro no Ministério da Saúde e, para isso, precisa demonstrar sua eficácia e sua segurança de uso. O fabricante deve apresentar provas científicas comprovando se a alegação das propriedades funcionais referidas no rótulo é verdadeira e se o consumo do produto em questão não implica em risco e sim, em benefício à saúde da população. Deve ser lembrado ainda que as alegações podem fazer referências à manutenção geral da saúde, à redução de risco, mas não à cura de doenças (BRASIL, 1999).

Tem ocorrido um grande avanço no desenvolvimento dos chamados produtos probióticos, prebióticos e simbióticos (LOURENS-HATTING, 2001). O interesse pelos efeitos benéficos à saúde humana proporcionado pelas bactérias lácticas tem provocado um aumento mundial na comercialização de produtos que contenham estas bactérias viáveis.

As bactérias do ácido láctico são as principais representantes dos probióticos em alimentos e produtos farmacêuticos (HOLZAPFEL *et al.*, 2001). As bactérias lácticas são Gram-positivas, quase sempre catalase negativas, não formadoras de esporos e acumulam ácido láctico no ambiente em que crescem como produto do metabolismo primário. Todos os componentes do grupo láctico são fastidiosos e estão presentes em ambientes nutricionalmente ricos como vegetais, leite, carne e trato intestinal. São anaeróbios, anaeróbios facultativos ou microaerofílicos (FERREIRA, 2003).

Probióticos são preparações de células microbianas ou componentes das mesmas que apresentam efeito benéfico sobre a saúde e bem-estar do hospedeiro (SALMINEN *et al.*, 1999).

Muitos estudos clínicos têm investigado o uso de probióticos como suplementos na alimentação em casos de infecções do trato gastro digestório e condições inflamatórias. Evidências abundantes demonstram que estirpes específicas selecionadas da microbiota intestinal saudável exibem poderosas capacidades antipatogênicas e antiinflamatórias e são conseqüentemente envolvidas na modulação da microbiota intestinal (ISOLAURI *et al.*, 2004).

Outros efeitos benéficos atribuídos aos probióticos relacionam-se à prevenção da diarreia associada ao uso de antibióticos, à redução da intolerância à lactose e aos efeitos anticarcinogênicos. Estudos epidemiológicos sugerem, também, que o consumo regular de produtos fermentados lácteos estão relacionados com o menor risco para certos tipos de câncer (OUWEHAND *et al.*, 2002).

O efeito dos probióticos no sistema imune tem também sido objeto de numerosos estudos há mais de 20 anos. Existem evidências de que certas linhagens de Bactérias do Ácido Lático são capazes de estimular bem como regular vários aspectos das respostas imune natural e adquirida. Estas incluem, por exemplo, aumento da atividade fagocítica de leucócitos, estimulação de resposta não específica (IgA) e específica (anticorpos) e aumento da produção de citocinas *in vivo* (GILL, 2003).

O modo de ação dos probióticos não foi ainda completamente esclarecido. Vários processos podem atuar independentemente ou associados. Um deles é a exclusão competitiva, em que o probiótico compete com os patógenos por sítios de fixação e nutrientes, impedindo sua ação transitoriamente (OUWEHAND *et al.*, 1999). Os probióticos podem também afetar patógenos através da síntese de bacteriocinas, ácidos orgânicos voláteis e peróxido de hidrogênio (RASTALL *et al.*, 2005). Quanto aos seus efeitos anticarcinogênicos, estes podem ser atribuídos à inibição de enzimas pró-carcinogênicas ou à estimulação do sistema imune do hospedeiro (OUWEHAND *et al.*, 2002).

Alguns estudos científicos propõem uma dose de 10^8 - 10^9 UFC para exercer os efeitos benéficos, que correspondem a uma ingestão diária de 100 g de um alimento probiótico contendo 10^6 a 10^7 UFC.g⁻¹ (BLANCHETTE *et al.*, 1996).

Bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são mais freqüentemente empregadas como suplementos probióticos para alimentos (CHARTERIS *et al.*, 1998).

A estirpe probiótica *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 foi isolada no Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, a partir de fezes de crianças recém-nascidas alimentadas exclusivamente com leite materno (SANTOS, 1984). Estudos realizados com

o *L. delbrueckii* UFV H2b20 demonstram o potencial probiótico dessa bactéria.

Agostinho (1988) realizou estudos *in vitro*, em condições semelhantes às do trato gastro digestório, e mostrou que *L. delbrueckii* UFV H2b20, é resistente à lisozima, sobrevive em soluções de ácido clorídrico, tolera concentrações elevadas de sais biliares, apresenta resistência a vários antibióticos e possui largo espectro antimicrobiano.

L. delbrueckii UFV H2b20 apresenta ação antagônica em relação a patógenos susceptíveis em alimentos e não inibição quando cultivado com outros lactobacilos o que possibilita seu uso concomitante com outras culturas (BATISTA, 1997).

L. delbrueckii UFV H2b20 produz além dos ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, outro fator inibidor que, em quantidades suficientes, tem ação antagonista a microrganismos patogênicos e toxigênicos, incluindo *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* enteropatogênica e outras bactérias (RIBEIRO, 1995).

Neumann et al (1998) estudaram a capacidade do *L. delbrueckii* UFV H2b20 de estimular a atividade fagocítica mononuclear de ratos *germfree* Swiss. Os resultados encontrados sugeriram que a estirpe usada estimulou a resposta imune não específica e apresentou ser uma forte candidata para uso como probiótico.

Recentemente, um concentrado contendo células viáveis ou inativadas de *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi utilizado para fabricação de produtos probióticos, como leite fermentado, sorvete, leite em pó, leite pasteurizado e leite UHT (LEITE, 2005).

Uma alternativa dietética para o aumento de bactérias benéficas no intestino é o emprego de prebióticos definidos como substâncias alimentares não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro pela estimulação seletiva do crescimento ou da atividade de bactérias benéficas residentes no cólon (GIBSON e ROBERFROID, 1995).

O prebiótico como ingrediente alimentar deve cumprir características como: não ser hidrolisado nem absorvido na parte superior do trato gastro digestório, e possuir fermentação seletiva por bactérias potencialmente benéficas no cólon, alterando a microbiota colônica em favor de uma

composição mais saudável e induzindo efeitos benéficos para a saúde do hospedeiro (TESHIMA, 2003). Os prebióticos estão associados à redução do risco de diabetes, obesidade, osteoporose, doenças cardiovasculares e câncer (OLIVEIRA, 2002).

Em relação à osteoporose, numerosos estudos empregando modelos animais têm mostrado que a inulina e oligofrutose estimulam a absorção de minerais, como cálcio e magnésio. Alguns estudos em humanos mostram um efeito positivo também na absorção de cálcio. Os prováveis mecanismos para os efeitos observados envolvem a produção de ácidos graxos de cadeia curta, redução do pH intestinal, solubilização de cálcio, magnésio e ferro complexados e aumento de proteínas relacionadas com a absorção (YBARRA *et al.*, 2003).

Inulina e oligossacarídeos destacam-se entre os prebióticos que têm recebido maiores atenções nos estudos científicos. A inulina e a oligofrutose pertencem a uma classe de carboidratos denominados frutanos e são considerados ingredientes funcionais, uma vez que exercem influência sobre processos fisiológicos e bioquímicos no organismo, resultando em melhoria da saúde e em redução no risco de aparecimento de diversas doenças (SAAD, 2006). São fibras solúveis e fermentáveis, as quais não são digeríveis pela α -amilase e por enzimas hidrolíticas, como a sacarase, a maltase e a isomaltase, na parte superior do trato gastro digestório (CARABIN e FLAMM, 1999).

Inulina e oligofrutoses têm sido amplamente utilizadas nas indústrias de alimentos para substituírem gorduras e açúcares, reduzindo assim o teor calórico. Estes ingredientes possuem baixo valor calórico em função de ligações β (1-2) entre as moléculas de frutose. As ligações tornam estas substâncias não digeríveis por enzimas intestinais humanas. Assim, estes prebióticos passam pelo trato gastro digestório sem serem metabolizados. Estudos indicam que a inulina e oligofrutoses são completamente fermentados no cólon e produzem ácidos graxos de cadeias curtas e lactatos que são metabolizados e contribuem com o valor calórico de 1,5 kcal/g (NINESS, 1999).

Constituída de cadeias longas, a inulina é menos solúvel que a oligofrutose e, quando dispersa na água ou no leite, forma microcristais que

interagem para dar origem a uma textura cremosa. Conseqüentemente, é empregada como substituto de gordura em produtos lácteos, patês, molhos, recheios, coberturas, sobremesas congeladas e produtos de panificação (NINESS, 1999).

As propriedades funcionais da inulina dependem da estrutura molecular dos vários tipos de frutanas tipo inulina, especialmente seu grau de polimerização, que é responsável pela capacidade de solubilidade em água, viscosidade, retenção de água e textura. (ROBERFROID, 2000 b).

Para garantirem o estímulo da multiplicação de bifidobactérias no cólon, doses diárias de 4 a 5 g de inulina e/ou oligofrutose são eficientes (NINESS, 1999; ROBERFROID, 1999).

Inulina e oligofrutoses são ingredientes naturais comumente encontrados em certos alimentos: trigo, cebola, banana, alho e chicória como carboidratos de reserva (NINESS, 1999). As principais fontes de inulina e oligofrutose empregadas na indústria de alimentos são a chicória (*Cichorium intybus*) e a alcachofra de Jerusalém (*Helianthus tuberosus*) (CARABIN e FLAMM, 1999). A inulina é extraída de raízes de hortaliças por meio de um processo com água quente (BELVAL, 1927, citado, por NINESS, 1999). O produto final tem um grau de polimerização de 10-12 unidades e uma distribuição de moléculas com comprimento de cadeia de 2-60 unidades.

Alimento simbiótico refere-se a um produto que contém tanto ingredientes prebióticos como microrganismos probióticos (HOLZAPFEL e SCHILLINGER, 2002). Esta mistura de probióticos e prebióticos beneficia o hospedeiro, melhorando a sobrevivência e implantação do suplemento dietético de células microbianas vivas no trato gastro digestório, estimulando seletivamente o crescimento e, ou, ativando o metabolismo de bactérias benéficas e, portanto, tornando melhor o estado de saúde do indivíduo (GIBSON e ROBERFROID, 1995).

Em virtude dos efeitos benéficos produzidos pelos probióticos e prebióticos, tem havido um considerável interesse por parte das indústrias em desenvolver produtos alimentícios que contenham estes microrganismos e ingredientes funcionais (STANTON *et al.*, 1998).

Microrganismos probióticos são freqüentemente usados em alimentos fermentados e a fermentação age para reter e otimizar a viabilidade

microbiana e produtividade, enquanto, simultaneamente, preserva as propriedades probióticas. Durante a fermentação, vários produtos metabólicos aparecem no alimento, incluindo ácido láctico, ácido acético, bacteriocinas, e o pH do produto diminui. Estas mudanças podem afetar a estabilidade de bactérias probióticas, alterando suas propriedades funcionais (TUOMOLA *et al.*, 2001). Na aplicação em produtos fermentados devem também contribuir na melhoria da qualidade sensorial do produto (OUWEHAND *et al.*, 2002).

Stanton *et al.* (1998) relataram que o queijo Cheddar contendo as células probióticas de *Lactobacillus* sp. exibiu flavor, textura e composição comparável ao queijo controle, indicando que adição da bactéria não apresentou efeito adverso nas características sensoriais nem alteração na composição. Já Blanchette *et al.* (1996) observaram que os consumidores preferiram o queijo Cottage controle e o queijo produzido com *dressing* fermentado a pH 5,5 ao queijo fermentado com adição de *dressing* fermentado a pH 4,5. Os resultados indicaram que células de *Bifidobacterium infantis* adicionadas ao queijo exibiram vigorosa atividade metabólica durante 28 dias de estocagem.

Células dos probióticos devem ser veiculadas em produtos selecionados que sejam de fácil aceitação pelo consumidor e nos quais o microrganismo seja conservado na forma viável. Leite e derivados, por ocuparem grande fatia do mercado brasileiro, oferecem muitas possibilidades para serem utilizados como adjunto dietético (LEITE, 2005). Os queijos possuem certas características que os tornam um produto alternativo para incorporar bactérias probióticas. A matriz do queijo, a capacidade tamponante, o teor de gordura podem oferecer proteção às células durante a passagem pelo trato gastro digestório (STANTON *et al.*, 1998).

Além da manutenção da viabilidade no trato gastro digestório, certas propriedades tecnológicas, como: viabilidade durante o processo, estabilidade no produto durante a estocagem e boas propriedades sensoriais são pré-requisitos para uso potencial de certas estirpes como culturas probióticas em queijos. A adição de células probióticas foi testada em alguns queijos e a maioria destes trabalhos foi bem sucedida quanto à manutenção

da viabilidade dos microrganismos bem como às propriedades tecnológicas adequadas do produto final (BURITI *et al.*, 2005). Queijos de várias origens têm sido comumente estudados como veículos para cepas probióticas: Cheddar, Gouda, Festivo, Queijos Frescos e Cottage-cheese (GOMES e MALCATA, 1998; STANTON, 1998; BLANCHETTE *et al.*, 1996; BURITI, 2005).

Buriti (2005) estudou a viabilidade da obtenção de queijo fresco cremoso simbiótico processado com a adição de uma cultura probiótica de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (LBC 82) e do ingrediente prebiótico inulina. A viabilidade de *L. paracasei* foi suficiente para caracterizar o queijo como probiótico, apresentando populações sempre acima de 7 log UFC.g⁻¹. A adição da inulina ao queijo resultou em um produto com características adequadas e com propriedades funcionais agregadas.

O queijo Cottage é de origem britânica, sendo produzido em diversos países, porém é mais popular nos Estados Unidos. Cottage é um queijo de massa fresca, fermentada, de sabor levemente ácido e salgado. Apresenta consistência granulosa e grãos imersos em *dressing* composto de creme padronizado. Contém cerca de 80% de umidade e um teor de gordura na faixa de 4% (VIANA *et al.*, 2002). O Brasil tem apresentado um acentuado crescimento na produção de queijo Cottage. Apesar da produção ser ainda pequena diante de outros queijos mais tradicionais, como os queijos Minas Frescal, Prato e Mussarela, o consumo crescente passou a exigir queijos com melhor qualidade, além de novas opções para esse segmento de mercado (DUTRA *et al.*, 2003).

O queijo tipo Cottage, por permitir a conservação do microrganismo na sua forma viável, apresenta características desejáveis para incorporação de uma estirpe probiótica. As células probióticas poderiam ser adicionadas ao *dressing*, líquido cremoso que envolve os grânulos do queijo. Além disso, ao *dressing* também poderia ser adicionada a substância prebiótica, tornando o produto um alimento simbiótico. A produção do queijo tipo Cottage simbiótico ofereceria grandes oportunidades de mercado, em virtude do apelo de alimento funcional e do baixo teor de gordura, sendo assim um queijo mais saudável.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um queijo tipo Cottage com adição de *L. delbrueckii* UFV H2b20 e de inulina (BENEO Raftiline GR), acompanhar a viabilidade do microrganismo probiótico ao longo da vida de prateleira do produto a 5°C, bem como comparar as características físico-químicas e microbiológicas do queijo simbiótico com o queijo controle, avaliando as implicações decorrentes da adição da cultura probiótica e da substância prebiótica nas características sensoriais do queijo tipo Cottage.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido em duas etapas: o processo de produção do queijo tipo Cottage simbiótico foi realizado no Laticínios-Escola FUNARBE/UFV e a padronização das células e todas as análises microbiológicas foram efetuadas no Laboratório de Microbiologia Industrial do Departamento de Microbiologia, localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO, ambos situados na Universidade Federal de Viçosa.

2.1. Produção de cultura estoque de *L. delbrueckii* UFV H2b20

A bactéria utilizada neste estudo foi *L. delbrueckii* UFV H2b20. Estoques da cultura foram preparados a partir da cultura congelada a -80 °C. Esta foi cultivada em leite desnatado reconstituído (LDR 10%) por um período de 24 h, a 37 °C. Em seguida foi transferida, respectivamente, para ágar MRS (VETEC®) LDR a 10 % e caldo MRS (VETEC®). Em cada etapa, as células foram incubadas a 37 °C durante 12 horas. Após ativação, uma alíquota da cultura foi adicionada em 30 mL de caldo MRS (VETEC®) distribuídos em tubos de centrífuga com capacidade de 50 mL.

Os tubos com as células *L. delbrueckii* UFV H2b20 foram centrifugados a 5.000 g durante 10 min a 4 °C em centrífuga Sorvall Instruments, modelo RC5C. O sedimento formado foi ressuspenso em

5 mL de caldo MRS estéril. Após a ressuspensão, 800 µL da cultura foram distribuídos em tubos de *ependorf* contendo 200 µL de glicerol. Em seguida, as células foram congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80 °C.

Em todas as etapas foi verificada a pureza da cultura por meio da técnica da coloração de Gram (PELCZAR *et al.*, 1980).

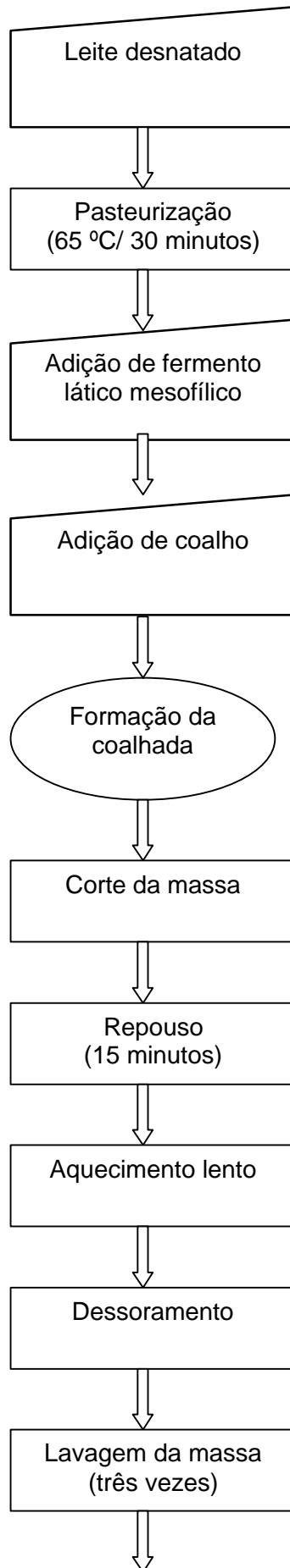
2.2. Produção do concentrado de células viáveis de *L. delbrueckii* UFV H2b20

Uma alíquota do estoque da cultura contendo *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi previamente ativada em leite em pó desnatado reconstituído a 10% (LDR10 %) e incubada a 37 °C. Após a coagulação, entre 18 e 24 horas de incubação, a cultura foi transferida para soro de queijo Minas Frescal estabilizado e novamente incubada a 37 °C por 12 horas. Foram realizadas três transferências para volumes graduais de soro, até que se alcançasse o volume final necessário para a condução dos experimentos. Após 12 horas de incubação, alíquotas foram distribuídas em tubos GSA de 250 mL para concentração das células em centrífuga Sorvall Instruments, modelo RC5C, a 5.000 g, durante 10 minutos a 4 °C. O sedimento foi ressuspendido em soro estéril.

Após a incubação das células, foram retiradas alíquotas para determinação do número de unidades formadoras de colônias do *L. delbrueckii* UFV H2b20. A técnica de microgotas foi adotada para avaliar o número de células viáveis (HERIGSTAD *et al.*, 2001).

2.3. Produção do queijo tipo Cottage simbiótico

O queijo Cottage foi fabricado no Laticínios-Escola FUNARBE/UFV. A Figura 1 apresenta o fluxograma do processo de fabricação do queijo tipo Cottage simbiótico. O leite foi previamente desnatado e submetido à pasteurização lenta (65 °C/30 minutos). Após a pasteurização do leite, seguiu-se a fermentação, com adição do fermento láctico mesofílico composto de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e *Streptococcus thermophilus* (RHODIA RA 073) e de coalho



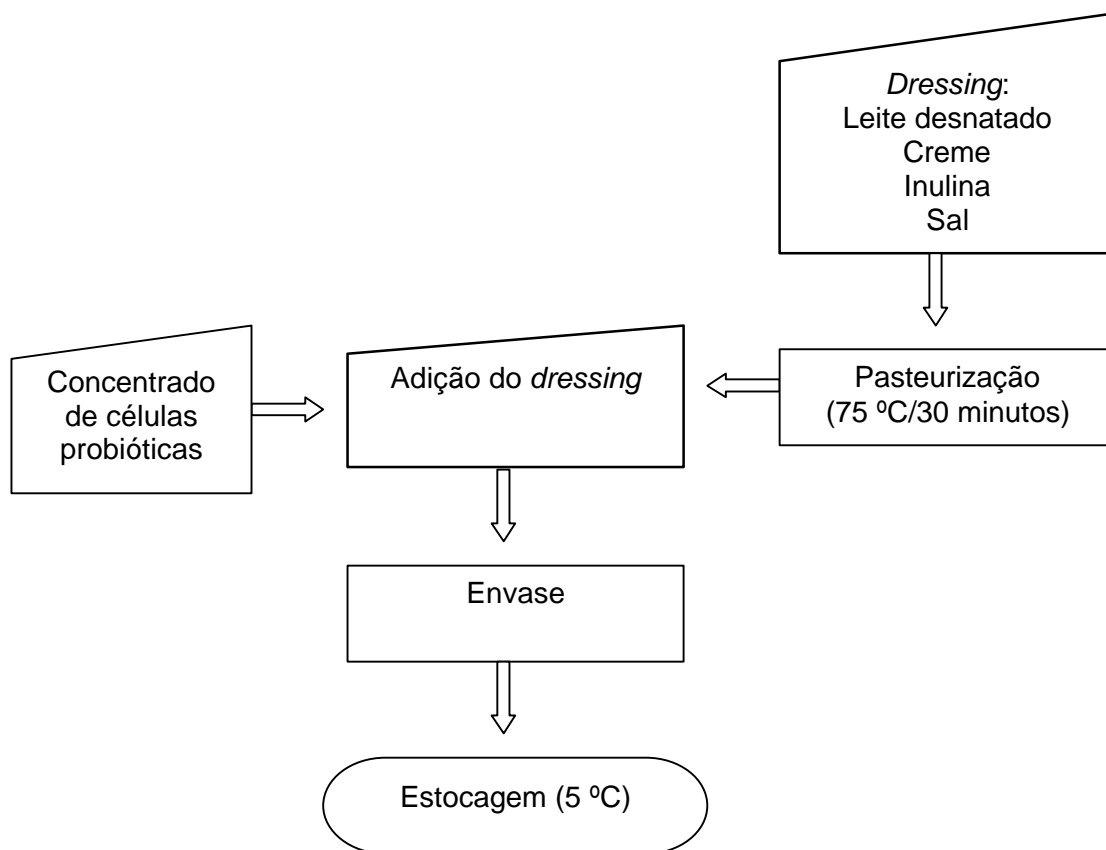


Figura 1 – Fluxograma de produção do queijo tipo Cottage simbiótico.

(CHR. HANSEN), utilizando 1/50 da dose normal. Após a formação da coalhada, procedeu-se o corte da massa. A acidez no momento do corte estava entre 58 °D – 65 °D com pH 4,6-4,8. A massa apresentava-se de forma gelatinosa, homogênea e com ligeira separação de soro na superfície. Após 15 minutos de repouso no tanque, iniciou-se o aquecimento da massa por meio da injeção de vapor direta no interior da camisa do tanque. A lentidão do aquecimento foi crucial para expulsar o soro do interior do grão e evitar a formação de película que poderia gerar retenção de soro no interior do grão e pós acidificar o produto além da perda de textura. Deste modo, o aquecimento realizado foi de 1 °C a cada 5 minutos, sendo a temperatura final de 50 °C. Após obtenção de grãos firmes e de textura compacta, procedeu-se o dessoramento. Em seguida, o nível do tanque foi recomposto por três vezes consecutivas para as lavagens da massa utilizando-se água à temperatura ambiente na primeira lavagem e à temperatura de 3 °C nas demais. O *dressing* adicionado foi preparado no dia anterior e era composto

de 18% de gordura, 4% de sal e de leite desnatado. A mistura foi pasteurizada a 75 °C por 30 minutos e resfriada a 5 °C. Normalmente, adiciona-se 7% de *dressing* em relação ao volume inicial de leite. Na produção do queijo tipo Cottage simbiótico, o *dressing* foi submetido a uma redução parcial de gordura (1/3) por adição da substância prebiótica inulina (BENEO *Raftiline* GR). Foi adicionado ao *dressing* 8% da substância prebiótica conforme recomendações do fabricante para obter o benefício funcional. Após este processo, no queijo tipo Cottage simbiótico o concentrado de células probióticas de *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi adicionada à mistura. Depois de misturar todo o *dressing* à massa do queijo, seguiu-se o envase e estocagem à temperatura de 5 °C.

2.4. Viabilidade de *L. delbrueckii* UFV H2b20 ao longo da vida-de-prateleira do queijo Cottage simbiótico

Das amostras de queijos tipo Cottage simbiótico, foram pesadas assepticamente alíquotas representativas, totalizando $25 \pm 0,2$ g. Esta alíquota foi homogeneizada em 225 mL de citrato a 2% em *stomacher* (Marconi® MA440), por 60 segundos. Desta forma, foi obtida a diluição 10^{-1} da amostra. Diluições sucessivas foram preparadas até a diluição 10^{-7} . As diluições 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} foram plaqueadas pela técnica de spread plate, em placas contendo ágar MRS acrescentadas de 30 µg/mL de ácido nalidíxico (Sigma) (AGOSTINHO, 1988). As placas foram incubadas sob anaerobiose, a 37 °C por 48 h. Após este período, foi determinado o número de unidades formadoras de colônias por grama de queijo e os resultados forma expressos em \log_{10} .

As análises foram realizadas em intervalos de 5 dias durante o período de estocagem do produto.

2.5. Quantificação da substância prebiótica inulina no queijo tipo Cottage simbiótico

Amostras de cada repetição do queijo tipo Cottage simbiótico foram enviadas à empresa Clariant que posteriormente as encaminhou ao

laboratório de referência da ORAFI localizado na Bélgica para determinação do teor de inulina presente nas amostras.

2.6. Análises físico-químicas e microbiológicas do queijo

Os queijos tipo Cottage simbiótico e controle foram analisados nos tempos 0, 5, 10, 15 e 20 dias de armazenamento quanto à contagem de *Staphylococcus* sp., fungos filamentosos e leveduras, coliformes a 30 °C e *Escherichia coli*.

Para as análises microbiológicas, a amostra foi preparada conforme o estabelecido na Instrução Normativa nº 62 de 26/08/2003, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Porções de 25 g de queijo tipo Cottage foi coletada assepticamente e adicionada a 225 mL de água peptonada 0,1 %. A mistura foi homogeneizada por 1 minuto em Stomacher (Marconi® MA440). Procederam-se diluições seriadas a alíquotas de 0,1 mL foram semeadas na superfície de ágar Baird Parker (Difco®) e Batata Dextrose Agar - BDA (Difco®), para enumeração de *Staphylococcus* sp. e fungos filamentosos e leveduras, respectivamente. As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 – 48 h para *Staphylococcus* sp. e a 23 °C ± 2 °C por 3 a 5 dias para fungos filamentosos e leveduras. Para a contagem de coliformes 30 °C e *Escherichia coli*, utilizou-se o Petrifilm Coliformes/*E.coli* (AOAC 991.14 – Contagem de Coliformes e *E. coli* em Alimentos, Película Reidratável Seca), de acordo com os procedimentos determinados pelo distribuidor. Foram selecionadas para contagem as placas contendo de 25 a 250 colônias. Os resultados foram expressos em UFC.g⁻¹.

Quanto aos parâmetros físico-químicos, a determinação do pH do queijo foi feita utilizando medidor de pH modelo Tecnal, pH Meter Tec-2, introduzindo-se eletrodo específico para queijos na parte interna. A determinação da A_w foi feita utilizando-se medidor digital Aqualab modelo CX2T – Decagon Devices, Inc., utilizando-se porções do todo o queijo.

Para a determinação da acidez titulável, gordura, umidade, cloretos e nitrogênio total utilizou-se os métodos oficiais para as referidas análises, descritos na Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006.

2.7. Avaliação sensorial do queijo tipo Cottage simbiótico

Foi realizada análise sensorial, segundo o teste de aceitação, utilizando a escala hedônica para comparar o queijo tipo Cottage simbiótico com o queijo tipo Cottage controle.

A análise foi realizada após 3 e 15 dias de estocagem do queijo por 40 provadores não treinados selecionados com base nos hábitos de consumo do queijo tipo Cottage. Os provadores julgaram o sabor, textura e impressão global atribuindo notas de 1 (“desgostei extremamente”) a 9 (“gostei extremamente”) aos atributos avaliados.

As análises ocorreram no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Tecnologia de Alimentos.

2.8. Análises estatísticas

O experimento foi conduzido com três repetições, em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial, sendo tipos de queijos e tempo os fatores estudados. Os resultados foram submetidos à análise de variância, com auxílio do programa *Statistical Analysis System (SAS)*, versão 8.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Viabilidade de *L.delbrueckii* UFV H2b20 na estocagem do queijo tipo Cottage simbiótico

A Tabela 1 mostra o resumo da análise de variância para contagem de células viáveis do *L.delbrueckii* UFV H2b20 durante o período de estocagem do queijo tipo Cottage simbiótico. Como pode ser observado, não houve diferença ($p \geq 0,05$) em relação ao tempo de estocagem do queijo. A média final da viabilidade do microrganismo, em $\log \text{UFC.g}^{-1}$, foi de 8,20 (Tabela 2). No presente estudo, a contagem de células probióticas condiz com os relatos de vários artigos científicos que recomendam 10^6 UFC.g^{-1} no produto no momento de consumo. Para obter o efeito benéfico, a ingestão diária proposta é de 10^8 - 10^9 UFC.g^{-1} .

Leite (2005) estudou a sobrevivência das células de *L.delbrueckii* UFV H2b20 em leite fermentado, leite em pó e sorvete. O autor concluiu que o microrganismo assegura número de células viáveis suficientes para atender à legislação para produtos probióticos por no mínimo 90 dias no sorvete e no leite em pó estocados a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$, pelo menos 45 dias no leite fermentado a $5 \text{ }^\circ\text{C}$ e 60 dias no leite em pó estocado à temperatura ambiente.

Resultado semelhante foi obtido por Phillips *et al.* (2006) que demonstraram ser o queijo Cheddar um bom veículo carreador de culturas probióticas comerciais. Em seu estudo, as culturas avaliadas mantiveram

Tabela 1 – Resumo da análise de variância para contagem de células viáveis de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 durante o período de estocagem do queijo tipo Cottage simbiótico

Fontes de Variação	GL	QM
Tempo	4	0,0116 ^{ns}

^{ns} não-significativo a 5% de probabilidade; QM = Quadrado médio.

Tabela 2 – Viabilidade de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 em queijo tipo Cottage simbiótico durante o período de estocagem a 5 °C

Estocagem (dias)	Contagem de <i>L.delbrueckii</i> UFV H2b20 (log UFC.g ⁻¹)
0	8,24
5	8,28
10	8,19
15	8,12
20	8,19

níveis de células viáveis acima do recomendado, 10^6 - 10^7 UFC.g⁻¹ após 32 semanas de maturação do queijo. *Bifidobacterium* sp., *L. casei*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus* obtiveram bons resultados enquanto o *L. acidophilus* teve níveis de células probióticas bem inferiores aos sugeridos.

Blanchette *et al.* (1996) também desenvolveram um queijo Cottage probiótico, mas usando um *dressing* fermentado por bifidobactéria. O creme pasteurizado foi fermentado com 3% (p/p) de inóculo de *B. infantis* a 37 °C. Durante os primeiros 10 dias de estocagem, as células sobreviveram bem, não havendo diferença significativa na viabilidade. Após 29 dias de estocagem, nenhum crescimento foi detectado.

Gomes *et al.* (1995) adaptaram a tecnologia do queijo Gouda para produzir um queijo probiótico contendo estirpe de *Bifidobacterium* ssp. e *L. acidophilus*. Durante nove semanas de estocagem, a média do número de *L. acidophilus* reduziu dois ciclos log₁₀, enquanto o número de bifidobactérias diminuiu menos que um ciclo log₁₀. A contagem de células viáveis foi maior que 10^7 UFC.g⁻¹ em ambos os casos. Os autores explicam que o baixo crescimento de *L. acidophilus* foi conseqüência da competição com *B. lactis* por fontes de energia e nutrientes.

Buriti *et al.* (2005) elaboraram queijo Minas Frescal probiótico e mostraram em seus estudos que apesar das diferenças atribuídas aos tipos de acidificação empregada na produção, ambos queijos probióticos obtiveram bons resultados em relação a viabilidade do *Lactobacillus paracasei*. As contagens iniciais também estavam sempre acima dos níveis recomendados para alimentos probióticos estocados sob refrigeração, tendendo a aumento de dois ciclos durante o processo de estocagem. Os autores concluíram que a adição de *Lactobacillus paracasei* no queijo Minas Frescal resultou em um produto com grande potencial para alimento funcional.

3.2. Quantificação da substância prebiótica inulina presente no queijo tipo Cottage simbiótico

A média da porcentagem de inulina presente no queijo tipo Cottage simbiótico após 20 dias de estocagem a 5 °C foi de 4,9% (p/p). Observou-se que o teor médio encontrado nas amostras atende as recomendações do fabricante para se ter o benefício funcional. Segundo ORAFTI *Active Food Ingredients*, dois gramas de inulina por porção do produto são necessários para o apelo prebiótico. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003) considera para queijo tipo Cottage: 50 gramas a porção. Deste modo, a porção do queijo tipo Cottage simbiótico tem uma quantidade de 2,5 gramas de inulina.

Neste estudo foi demonstrado que o queijo tipo Cottage simbiótico é um bom carreador para as células probióticas do *L. delbrueckii* UFV H2b20. A contagem do microrganismo probiótico e da inulina no queijo foram suficientes para resultar em um produto com potencial simbiótico. O produto simbiótico torna melhor o estado de saúde do indivíduo, o suplemento alimentício de células vivas melhora o equilíbrio microbiano intestinal e a substância prebiótica estimula seletivamente o crescimento de bactérias benéficas no cólon.

3.3. Análise físico-química e microbiológica do queijo tipo Cottage simbiótico e queijo controle

Médias de umidade, gordura, proteína, pH, acidez titulável, atividade de água e cloretos do queijo tipo Cottage simbiótico e controle durante a estocagem a 5 °C são mostradas na Tabela 3.

Tabela 3 – Composição físico-química do queijo tipo Cottage simbiótico e Controle

Parâmetros Analisados	Queijo Simbiótico	Queijo Controle
Umidade (%)	81,01 ^a	79,22 ^b
Gordura (%)	1,00 ^a	3,95 ^b
Proteína (%)	9,34 ^a	11,13 ^b
pH	4,75 ^a	4,82 ^a
Acidez (%)	0,25 ^a	0,25 ^a
aW	0,97 ^a	0,97 ^a
Cloretos (%)	0,91 ^a	0,93 ^a
Inulina (%)	4,90	

Os valores apresentados são as médias dos parâmetros avaliados. Na mesma linha, letras minúsculas sobrescritas indicam as diferenças ($p < 0,05$) entre os queijos.

Para os dois queijos estudados, houve diferença ($p < 0,05$) apenas para os parâmetros de umidade, gordura e proteína analisados. O queijo tipo Cottage controle apresentou maiores médias para estas características. Isto pode ser explicado pela adição da substância prebiótica inulina (BENEO Raftiline GR) ao *dressing* do queijo. A inulina além da função prebiótica, também foi utilizada como substituto parcial de gordura (redução de 1/3). Assim, o teor de gordura obtido no queijo simbiótico foi dentro do teor esperado. Além disso, no *dressing* do queijo simbiótico houve maior acréscimo de leite desnatado para efetuar a diluição do ingrediente prebiótico. Isto explica a razão do queijo tipo Cottage simbiótico ter apresentado maior teor de umidade em relação ao queijo controle e menor teor de nitrogênio. A baixa acidez obtida para ambos os queijos foi em virtude do processo de fabricação do queijo tipo Cottage. Durante a produção, a massa foi aquecida até 50 °C, o que ocasionou a inativação da

cultura mesofílica *starter* adicionada. Além disso, no final do processo, a massa passou por três lavagens consecutivas, contribuindo também para redução da acidez.

Os resultados obtidos neste trabalho foram semelhantes aos encontrados por Viana (2002), que observou teores médios de 80,60% para umidade, 3,90% para gordura, 1,25% para cloretos, acidez entre 0,23 e 0,26, pH entre 4,85 e 4,71 e proteína total de 11,00%. Segundo o autor, acidez abaixo de 0,3% ao longo da estocagem é considerada boa característica por conferir ao produto um sabor mais suave e maior durabilidade.

Os limites máximos exigidos pela legislação para queijos de muita alta umidade, com presença de bactérias lácticas viáveis e abundantes, como é o caso do queijo tipo Cottage, são de 10^3 UFC.g⁻¹ de coliformes a 30 °C, 10^2 UFC.g⁻¹ de coliformes a 45 °C, 10^2 UFC.g⁻¹ de estafilococos coagulase positivo, 5×10^3 UFC.g⁻¹ de fungos filamentosos e leveduras e ausência em 25 g de *Salmonella* e *Listeria minocytogenes* (BRASIL, 1996).

As contagens médias de *Staphylococcus* sp. para o queijo simbiótico e controle ao longo do armazenamento foi de 1,34 e 1,20 log UFC.g⁻¹. Já a presença de fungos filamentosos e leveduras encontrados foi de 2,31 e 2,26 log UFC.g⁻¹ para o queijo simbiótico e controle, respectivamente. O número de coliformes a 30 °C obtido foi em média de 1,26 log UFC.g⁻¹ para queijo controle e 1,12 log UFC.g⁻¹ para queijo Simbiótico. *Escherichia coli* não foi detectada em nenhuma amostra de queijo analisado ao longo do armazenamento. Os resultados encontrados estão de acordo com as exigências da legislação e refletem as boas práticas de higiene utilizadas durante a fabricação.

3.4. Avaliação sensorial do queijo tipo Cottage simbiótico e queijo controle

As análises sensoriais foram analisadas em dois tempos diferentes, após três e 15 dias de estocagem visando observar diferença entre os dois queijos avaliados em relação às características: sabor, aroma e impressão global. A distribuição das notas em função da aceitação dos provadores está apresentada nas Tabelas 4 e 5. Não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$)

Tabela 4 - Distribuição das notas de acordo coma a aceitação dos provadores na análise sensorial dos queijos controle e simbiótico após três dias de armazenamento.

Atributos Sensoriais	Queijo Simbiótico	Queijo Controle
Sabor	6,76 ^a	7,25 ^a
Aroma	6,60 ^a	6,85 ^a
Impressão Global	6,91 ^a	6,90 ^a

Na mesma linha, letras minúsculas sobrescritas indicam as diferenças ($p < 0,05$) entre os queijos.

Tabela 5 – Distribuição das notas de acordo coma a aceitação dos provadores na análise sensorial dos queijos controle e simbiótico após 15 dias de armazenamento.

Atributos Sensoriais	Queijo simbiótico	Queijo controle
Sabor	6,89 ^a	7,15 ^a
Aroma	6,85 ^a	6,66 ^a
Impressão Global	6,92 ^a	7,04 ^a

Na mesma linha, letras minúsculas sobrescritas indicam as diferenças ($p < 0,05$) entre os queijos.

entre o queijo tipo Cottage simbiótico e queijo controle em relação aos atributos avaliados em cada tempo. O queijo simbiótico apresentou boa aceitação por parte dos consumidores em todos os quesitos e nos dois tempos analisados. Pela escala hedônica, a nota média obtida, situou-se entre 6,0 e 7,0, compreendendo os termos “gostei ligeiramente” e “gostei moderadamente”. O emprego de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 não produziu alterações sensoriais no queijo tipo Cottage simbiótico após 15 dias de estocagem a 5 °C. A adição complementar de inulina também não produziu mudança significativa quando comparado ao queijo controle durante o armazenamento.

Buriti *et al.* (2005) não observaram diferença significativa ($p \geq 0,05$) entre os queijos probióticos produzidos com diferentes meios de acidificação e os controles em relação a atributos de textura e avaliação sensorial. A adição do *Lactobacillus paracasei* ao queijo Minas Frescal resultou em um produto com grande potencial como alimento funcional. Melhores resultados foram obtidos para o queijo produzido por acidificação direta com ácido láctico.

Stanton *et al.* (1998) relataram que o queijo Cheddar probiótico contendo *Lactobacillus* exibiu *flavor*, textura e composição comparável ao queijo controle, indicando que a adição do microrganismo não produziu efeitos adversos nas características sensoriais e na composição do queijo.

4. RESUMO E CONCLUSÃO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um queijo tipo Cottage simbiótico com adição no *dressing* da cultura probiótica *L. delbrueckii* UFV H2b20 e do ingrediente prebiótico inulina (BNEO Raftiline GR), comparar as características físico-químicas e microbiológicas do queijo simbiótico com o queijo controle e avaliar as implicações decorrentes da adição da cultura probiótica e da substância prebiótica nas características sensoriais do queijo tipo Cottage. Durante toda a vida de prateleira do queijo estocado a 5 °C, observou-se uma contagem de *L. delbrueckii* UFV H2b20 sempre acima do nível recomendado para o produto ser considerado probiótico: 10^8 UFC.g⁻¹. O teor de inulina determinado no queijo foi de 5%, quantidade suficiente para exercer efeitos benéficos no indivíduo. Os resultados obtidos também indicam que a adição de células probióticas de *L. delbrueckii* UFV H2b20 não produziu alterações sensoriais nem alterações físico-químicas no queijo tipo Cottage simbiótico após 15 dias de estocagem a 5 °C. A adição complementar de inulina também não produziu mudança significativa na análise sensorial quando comparado ao queijo controle durante o armazenamento. A viabilidade das células probióticas durante todo o período de estocagem do queijo associado com adição do prebiótico inulina resultou em um produto potencial com boas perspectivas para comercialização.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINHO, S.M.M. **Comportamento do *L. acidophilus* UFV H2b20 sob condições do trato digestivo *in vitro* e efeito de métodos de preservação em sua atividade.** 1988. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1988.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução - RDC nº. 359, de 23 de dezembro de 2003. **Regulamento Técnico de Porções de Alimentos Embalados para Fins de Rotulagem Nutricional.** Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: 6 nov. 2006.

BRASIL Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Serviço de Inspeção de Leite e Derivados. **Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003.** Brasília, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Serviço de Inspeção de Leite e Derivados. **Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006.** Brasília, 2006.

BRASIL. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. **O Ministério de Estado da Agricultura e Abastecimento e Reforma Agrária institui o regulamento técnico de identidade e qualidade de queijos.** Diário Oficial da União, Brasília, 11 mar. 1996. Seção 1.

BATISTA, M. T. ***Lactobacillus* em culturas mistas para formulação de probiótico.** 1997. 43 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa- MG, 1997.

BELVAL, H. **Industrie de l' inuline et du levulose**. In: Dix Ans d' Efforts Scientifiques et Coloniaux 1914-1924, p. 1068-1069. Chimie et industrie Paris, France, 1927.

BLANCHETTE, L.; ROY, D.; BELANGER, G.; GAUTHIER, S. F. Production of Cottage cheese using dressing fermented by Bifidobacteria. **Journal Dairy Science**, v. 79. p. 8-15, 1996.

BRASIL. Portaria nº 398, de 30 de abril de 1999. **O Ministério da Saúde aprova o regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos**. Diário Oficial da União, Brasília, 3 maio 1999.

BURITI, F. C. A.; ROCHA, J. S.; ASSIS, E. G.; SAAD, S. M. I. Probiotic potential of Minas Fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. **Lebensm.- Wiss. u.-Technol.**, v. 38. p.173-180, 2005.

BURITI, F. C. A. **Desenvolvimento de queijo fresco cremoso simbiótico**. 2005. 75 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico - Farmacêutica) – Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2005.

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

CHARTERIS, W. P.; KELLY, P. M.; MORELLI, L.; COLLINS, J. K. Development and application of in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 759-768, 1998.

DUTRA, E. R.; FURTADO, M. A. M.; ABREU, L. R. Princípios da fabricação do queijo cottage: uma revisão. **Anais do XX Congresso Nacional de Laticínios**, n. 333, v. 58, p.26-32, 2003.

FERREIRA, C. L. L. F. Grupo de bactérias lácticas: Caracterização e aplicação tecnológica de bactérias probióticas. In: FERREIRA, C. L. L. F. (Ed.) **Prebióticos e probióticos: Atualização e prospecção**. Visconde do Rio Branco-MG: Suprema Gráfica e Editora, 2003. p. 7-33.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v. 125. p. 1401-1412, 1995.

GILL, H. S. Probiotics to enhance anti-infective defenses in the gastrointestinal tract. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 17, n. 5, p. 755-773, 2003.

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

HERIGSTAD, B.; HAMILTON, M.; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, p. 121-129, 2001.

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

HOLZAPFEL, W. H. *et al.* Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda. v. 73. n. 2. p. 365S-373S, 2001.

ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A. C. Probiotics. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 18, n. 2, p. 299-313, 2004.

LEITE, M. O. **Processos para o desenvolvimento de produtos lácteos probióticos com *Lactobacillus delbrueckii* UFVH2b20**. 2005. 87 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2005.

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

MANNING, T. S.; GIBSON, G. R. Microbial-gut interactions in health and disease. Prebiotics. **Best Practice Research Clinical Gastroenterology**, v. 18, n. 2, p. 287-298, 2004.

NEUMANN, E.; OLIVEIRA, M. A.; CABRAL, C. M.; MOURA, L. N.; NICOLI, J. R.; VIEIRA, E. C.; CARA, D. C.; PODOPRIGORA, G. I.; VIEIRA, L. Q.; Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germfree mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31. p. 1565-1573, 1998.

NINESS, K. R. **Inulin and oligofructose**: What are they? American Society for Nutritional Sciences, 1999.

OLIVEIRA, S. P. Alimentos funcionais: Aspectos relacionados ao consumo. **Food Ingredients**, v. 20, p. 24-28, 2002.

OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Probiotics: an overview of beneficial effects. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 82, p. 279-289, 2002.

OUWEHAND, A. C.; KIRJAVAINEN, P. V.; SHORTT, C.; SALMINEN, S.. Probiotics: mechanisms and established effects. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 9, n. 1, p. 43-52, 1999.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiology**, v. 1, p. 566, 1980.

PHILLIPS, M.; KAILASAPATHY, K.; TRAN, L. Viability of comercial probiotic cultures (*L. acidophilus*, *Bifidobacterium* sp., *L. casei*, *L. paracasei* and *L. rhamnosus*) in cheddar cheese. **Internacional Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 276-280, 2006.

RASTALL, R. A.; GIBSON, G. R.; GILL, H. S.; GUARNER, F.; KLAENHAMMER, T. R.; POT, B.; REID, G.; ROWLAND, I. R.; SANDERS, M. E.. Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human heath: an overview of enabling science and potential applications. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 52, p. 145-152, 2005.

RIBEIRO, M. A. **Aspectos da Produção de Produção de Peróxido de Hidrogênio e Inibição de Bactérias por *Lactobacillus acidophilus* UFV H2B20**. 1995. 60 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 1995.

ROBERFROID, M. B. Defining functional foods. In: GIBSON, G.R., WILLIAMS, C.M. (Ed.) **Functional foods: Concept to product**. England: Woodhead Publishing Limited, 2000a. p. 11-12.

ROBERFROID M. B. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? American **Journal of Clinical Nutrition**, v. 71 (suppl.), p. 1682S-1687S, 2000b.

ROBERFROID, M. B. Concepts in functional foods: the case of inulin and oligofructose. **Journal of Nutrition**, Bethesda. v. 129 (suppl.), n. 7, p. 1398S-1401S, 1999.

SANTOS, N. S. **Isolamento de *Lactobacillus acidophilus* de fezes de crianças alimentadas ao seio e de bezerros, visando a sua utilização como adjunto dietético**. 1984. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 1984.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. **Bazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 1, jan./mar., 2006.

SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.; BENNO, Y.; LEE, Y. K. Probiotics: how should they be defined? **Trends in Food Science & Technology**, v. 10. p. 107-110, 1999.

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

TESHIMA, E. Aspectos terapêuticos de probióticos, prebióticos e simbióticos. In: FERREIRA, C. L. L. F. (Ed.). **Prebióticos e probióticos: Atualização e prospecção**. Visconde do Rio Branco-MG: Suprema Gráfica e Editora, 2003. 206 p.

VIANA, G. A.; FURTADO, M. M.; MARTINS, J. M. Produção de queijo tipo Cottage por acidificação direta do leite com ácido láctico como coadjuvante no processo de fermentação. **Anais do XIX Congresso Nacional de Laticínios**, n. 327, v. 57, p. 1-7, 2002.

YBARRA, L. M.; COSTA, N. M. B.; GIBSON, R. G.; FERREIRA, C. L. L. F. Influência de probióticos e prebióticos na absorção de minerais. In: FERREIRA, C. L. L. F. (Ed.). **Prebióticos e probióticos: Atualização e prospecção**. Visconde do Rio Branco-MG: Suprema Gráfica e Editora, 2003. 206 p.

CAPÍTULO 2

ESTUDO DE SOBREVIVÊNCIA DE *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20 EM CONDIÇÕES DE SIMULAÇÃO DO TRATO GASTRO DIGESTÓRIO

1. INTRODUÇÃO

Probióticos podem ser definidos como microrganismos vivos presentes em certas concentrações nos alimentos que, quando ingeridos, exercem efeitos benéficos na saúde do hospedeiro. Membros do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* fazem parte da microbiota intestinal e têm sido usados tradicionalmente na produção dos produtos probióticos (MADUREIRA *et al.*, 2005).

No início do século passado, Metchnikoff introduziu a hipótese do efeito benéfico das bactérias por meio da teoria da longevidade dos caucasianos, cuja dieta era baseada na ingestão de leites fermentados. Segundo ele, os lactobacilos presentes nestes produtos criariam no intestino humano condições desfavoráveis a outros microrganismos que poderiam produzir um efeito tóxico ao hospedeiro (HOLZAPFEL *et al.*, 2002).

Aspectos de segurança, funcionalidade e tecnológicos são importantes na seleção de microrganismos probióticos (SAARELA *et al.*, 2000). Quanto à segurança, as estirpes probióticas destinadas a humanos devem ser de origem humana, uma vez que os efeitos na saúde podem ser

dependentes da estirpe. Sendo habitantes naturais do trato gastro digestório já estariam adaptadas às condições do trato. Devem ser isoladas de indivíduos saudáveis, não terem histórico de patogenicidade ou associação com doenças intestinais, não carregarem genes de resistência a antibióticos e não serem capazes de desconjugar sais biliares, já que estes são importantes na emulsificação, digestão e absorção de lipídeos (VAUGHAN *et al.*, 1999).

Quanto ao aspecto de funcionalidade, as estirpes probióticas devem ser tolerantes ao ácido presente do suco gástrico a fim de resistirem à passagem pelo estômago e à bile. Devem ter capacidade de aderir à superfície intestinal. Bactérias probióticas capazes de aderir à mucosa intestinal persistem mais no trato gastro digestório e assim possuem maiores possibilidades de apresentar efeitos metabólicos e imunomoduladores comparados àquelas que não conseguem aderir. A adesão fornece uma interação com a superfície da mucosa facilitando o contato com o tecido linfóide associado, mediando os efeitos imune local e sistêmico. Devem possuir atividade antagonística contra patógenos por produzirem substâncias que incluem ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, bacteriocinas, inibidores de adesão e outras substâncias antimicrobianas. Apresentam também efeitos anticarcinogênicos que são atribuídos à inibição de enzimas pro-carcinogênicas ou à estimulação do sistema imune do hospedeiro (TUOMOLA *et al.*, 2001).

Os aspectos tecnológicos a serem considerados na seleção de um probiótico incluem viabilidade durante o processo e estabilidade no produto durante a estocagem e boas propriedades sensoriais. Probióticos são freqüentemente usados em alimentos fermentados e a fermentação age para reter e otimizar a viabilidade microbiana e produtividade, enquanto, simultaneamente, preserva as propriedades probióticas. Durante a fermentação, vários produtos metabólicos aparecem no alimento, incluindo bacteriocinas, ácido lático, ácido acético, e conseqüentemente a redução do pH (TUOMOLA *et al.*, 2001).

A estirpe probiótica *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 foi isolada no Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de

Viçosa, de fezes de crianças recém-nascidas alimentadas exclusivamente com leite materno (SANTOS, 1984).

Estudos *in vitro*, em condições semelhantes às do trato gastro digestório, mostraram que *L. delbrueckii* UFV H2b20 é resistente à lisozima, em concentrações superiores à da saliva, resistente a pH semelhante ao do suco gástrico e tolerante a concentrações elevadas de sais biliares, sugerindo sobrevivência das células na passagem pelo trato gastro digestório. No estudo do comportamento dessa bactéria em presença de antibióticos de administração oral (ácido nalidíxico, colistina, neomicina, nitrofurantoína, rifampicina, sulfanamida e sulfazotrim) observou-se que o microrganismo apresenta resistência e possui largo espectro antimicrobiano (AGOSTINHO, 1988).

A resistência do *L. delbrueckii* UFV H2b20 à condições de estresse ambiental é um fator importante na viabilidade das células nos produtos probióticos, uma vez que condições adversas precisam ser superadas durante o processamento ou vida útil do produto. Estudos demonstram adaptação das células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 a condições de estresse e também tolerância cruzada a diferentes fatores de estresse (MONTEIRO, 1999; FURTADO, 2001).

A partir do isolamento do *L. delbrueckii* UFV H2b20, diversos trabalhos foram conduzidos no intuito de demonstrar suas características promissoras, que podem qualificá-lo como probiótico. Os resultados de estudos desenvolvidos geraram conhecimentos quanto à otimização da produção de células viáveis (LEITE, 2005), potencial probiótico do *L. delbrueckii* UFV H2b20 (SANTOS, 1984), capacidade de respostas às condições ambientais (MONTEIRO, 1999), e estímulo do sistema imunológico do hospedeiro (NEUMANN *et al.*, 1998).

As bactérias lácticas são submetidas a um desafio quando são expostas ao suco gástrico, enzimas digestivas e aos sais biliares, uma vez que devem sobreviver à passagem pelo trato gastro digestório para proporcionarem os efeitos benéficos à saúde humana.

O baixo pH do estômago e a ação antimicrobiana da pepsina são conhecidos por proporcionar efeito barreira contra a entrada de bactérias no trato intestinal. O pH do estômago, em geral, encontra-se entre 2,5 e 3,5.

(HOLZAPFEL *et al.*, 1998). A natureza do alimento afeta o tempo de trânsito no estômago. Alimentos líquidos são mais rápidos que os sólidos. Normalmente, os alimentos mantêm-se entre 2 e 4 horas no estômago. Não existem regras combinadas para análise de tolerância ácida para estirpes probióticas. Valores de pH de 1 a 5 têm sido usados para análise *in vitro* de tolerância ácida de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (CHARTERIS *et al.*, 1998).

O efeito do estresse ácido na fisiologia bacteriana não é conhecido em detalhes. Entretanto, sabe-se que os ácidos podem passar por difusão passiva através da membrana celular, entrarem na célula e dissociarem em prótons. O acúmulo intracelular de prótons pode reduzir o pH interno e afetar numerosos processos de transporte via membrana. A acidificação interna também reduz a atividade de enzimas sensíveis ao ácido e pode causar danos em sistemas protéicos e no DNA. O acúmulo no citoplasma de cargas aniônicas de ácidos orgânicos dissociados tem também efeito prejudicial na fisiologia celular (PRESSER *et al.*, 1997 citados por GUCHTE *et al.*, 2002). Em bactérias lácticas a tolerância ácida aumenta em dois estados fisiológicos: durante crescimento logarítmico e após entrar na fase estacionária. Numerosos estudos realizados mostram a indução de proteínas durante a adaptação ácida (HARTKE *et al.*, 1996 citados por GUCHTE *et al.*, 2002).

No caso de exposição das células a ácidos fortes, estes não são capazes de permearem por meio da membrana. Deste modo, exercem o efeito por desnaturação de enzimas presentes na superfície celular e redução do pH citoplasmático em virtude do aumento da permeabilidade a prótons. Os mecanismos de resposta ácida observados durante o crescimento a baixos pH são todos baseados na manutenção da homeostase ou na restauração do pH interno para próximo da neutralidade (BEALES, 2004).

O duodeno, no início do intestino delgado, também apresenta condições adversas às bactérias probióticas, em virtude da presença de sais biliares. Bile é uma secreção digestiva que exerce função na emulsificação e solubilização de lipídeos. Tem habilidade de afetar fosfolipídios e proteínas das membranas das células e causar distúrbios celulares. Altas

concentrações de sais biliares podem rapidamente dissolver os lipídeos da membrana resultando num extravasamento do conteúdo celular e morte da célula. Estímulos fisiológicos ou ambiental capazes de alterar as características das membranas, como a adaptação ácida, aumenta a osmolaridade ou induz a fase estacionária, tornando as células mais resistentes aos efeitos deletérios da bile. Pré-exposição em níveis subletais de um dado estresse permite às células adaptarem-se e protegerem-se contra subseqüentes exposições em doses letais do mesmo estresse. Pré-exposição a um estresse também pode conferir proteção contra outros estresses (BEGLEY *et al.*, 2005). A concentração de 0,15 – 0,3% de sais biliares tem sido recomendada como adequada para seleção de bactéria probiótica para uso em humano (GOLDIN e GOLBACH, 1992 citados por YANG HUANG e ADAMS, 2004). Durante adaptação à bile, proteínas também são sintetizadas (GUCHTE *et al.*, 2002).

Monteiro (1999) estudou o efeito do choque térmico sobre a resistência de *L. delbrueckii* UFV H2b20 a ácido clorídrico, onde pôde constatar que as células, cerca de 10^8 UFC.mL⁻¹, foram incapazes de resistir ao pH 2,5 por 2,5 horas, em caldo MRS 2% de glicose, sem uma pré-adaptação. O pré-tratamento a 50 °C por 30 minutos tornou as células mais tolerantes.

As propriedades físico-químicas dos alimentos têm influenciado a sobrevivência de estirpes probióticas durante o trânsito intestinal. A capacidade tamponante e o pH do meio carreador são fatores relevantes. Formulações de alimentos com pH entre 3,5 a 4,5, como iogurtes, queijos e leite fermentados têm alta capacidade tamponante e poderiam aumentar o pH do trato gástrico e, assim, aumentar a estabilidade da estirpe probiótica. Além da capacidade tamponante, há outros fatores que possivelmente poderiam estar envolvidos na sobrevivência do probiótico, como polissacarídeos extracelulares, teor de gordura e a matriz densa de queijos (GARDINER *et al.*, 1998). O leite tem aumentado a viabilidade de estirpes de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* sensíveis a ácido em testes de simulação do trato gastro digestório. O efeito protetor pode ser devido ao aumento do pH intestinal após a ingestão do leite (CHARTERIS *et al.*, 1998).

O efeito protetor oferecido pelo alimento às estirpes probióticas deve ser considerado, uma vez que estes podem aumentar a sobrevivência das bactérias no estômago, protegendo-as do efeito da pepsina e da acidez. Kos *et al.* (2000) estudaram o efeito do concentrado protéico de soro na viabilidade de *L. acidophilus* M92 e perceberam que a adição do concentrado protegeu as células ao baixo pH do suco gástrico simulado e até aumentou a tolerância a altas concentrações de sais biliares.

Os resultados dos estudos de Charalampopoulos *et al.* (2003) sugeriram que extratos de malte, trigo e cevada exerceram um efeito protetor na viabilidade de *L. plantarum*, *L. acidophilus* e *L. reuteri* sob condições ácidas.

A introdução de bactérias probióticas em produtos lácteos fermentados constitui uma alternativa tecnológica que atende às exigências do consumidor atual, cuja tendência é buscar produtos inovadores, diferenciados na textura, que promovam o bem-estar e tragam benefícios à saúde. O queijo tipo Cottage pode ser suplementado com bactérias probióticas. As células probióticas podem ser adicionadas ao *dressing*, líquido cremoso que envolve os grânulos do queijo.

Neste contexto, o presente trabalho objetivou desenvolver um queijo tipo Cottage simbiótico adicionado de *L. delbrueckii* UFV H2b20 e analisar a sobrevivência da estirpe probiótica em condições de simulação do trato gastro digestório.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido em duas etapas: o processo de produção do queijo tipo Cottage simbiótico foi realizada no Laticínios-Escola FUNARBE/UFV e a padronização das células e todas as análises microbiológicas foram efetuadas no Laboratório de Microbiologia Industrial do Departamento de Microbiologia, localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO, ambos situados na Universidade Federal de Viçosa.

2.1. Microrganismo

Utilizou-se neste estudo a bactéria *L. delbrueckii* UFV H2b20. Estoques da cultura foram preparados a partir da cultura congelada a -80 °C. Esta foi cultivada em leite desnatado reconstituído (LDR 10%) por um período de 24 h, a 37 °C. Em seguida foi transferida, respectivamente, para ágar MRS (VETEC®), LDR a 10 % e caldo MRS (VETEC®). Em cada etapa, as células foram incubadas a 37 °C durante 12 horas. Após ativação, uma alíquota da cultura foi adicionada em 50 mL de caldo MRS (VETEC®) e incubados nas mesmas condições citadas anteriormente. Transcorrido o período de incubação, 30 mL dessa cultura foram centrifugados a 5000 g durante 10 min a 4 °C em centrífuga Sorvall Instruments, modelo RC5C, rotor SS34. O sedimento formado foi ressuspendido em 10 mL de caldo

MRS estéril. Após a ressuspensão, 800 µL da cultura foram distribuídos em tubos de *Eppendorf* contendo 200 µL de glicerol. Em seguida, as células foram congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80 °C.

Em todas as etapas, foi verificada a pureza da cultura por meio da técnica da coloração de Gram (PELCZAR, 1980).

2.2. Produção do concentrado de células viáveis de *L. delbrueckii* UFV H2b20

Uma alíquota do estoque da cultura contendo *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi previamente ativada em leite em pó desnatado reconstituído a 10% e incubada a 37°C. Após a coagulação, entre 18 e 24 horas de incubação, a cultura foi transferida para soro de queijo Minas Frescal estabilizado e novamente incubada a 37°C por 12 horas. Foram realizadas três transferências para volumes graduais de soro, até que alcançasse o volume final necessário para a condução dos experimentos. Após 12 horas de incubação, alíquotas foram distribuídas em tubos GSA de 250 mL para concentração das células em centrífuga *Sorvall Instruments*, modelo RC5C, a 5.000 g durante 10 minutos a 4°C. O sedimento foi ressuspendido em soro estéril.

Após a produção do concentrado foram retiradas alíquotas para determinação do número de unidades formadoras de colônias do *L. delbrueckii* UFV H2b20. A técnica de microgotas foi adotada para avaliar o número de células viáveis (HERIGSTAD *et al.*, 2001).

2.3. Produção do queijo tipo Cottage simbiótico

O queijo Cottage foi fabricado no Laticínios-Escola FUNARBE/UFV. O leite foi desnatado e submetido à pasteurização lenta (65°C/30 minutos). Após a pasteurização do leite, procederam-se a fermentação, corte da massa, cozimento, lavagens, adição do *dressing* (leite desnatado, creme e sal), envase e estocagem. O fermento utilizado era composto de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e *Streptococcus thermophilus* (RHODIA RA073). O *dressing* foi submetido a uma redução parcial de gordura por adição da substância prebiótica inulina

(BENEO Raftiline GR) e conteve 4% de sal. O *dressing* foi pasteurizado e resfriado a 5 °C por 12 horas (VIANA et al., 2002). Após este processo, o concentrado de células probióticas de *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi adicionado à mistura e seguiu-se o envase e a refrigeração por 20 dias a 5 °C. O concentrado de células conteve em torno de 10^9 UFC.mL⁻¹.

2.4. Simulação das condições do trato gastro digestório

Um grama de queijo tipo Cottage simbiótico foi adicionado a 9 mL de solução estéril de tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 7,0, pH 3,5 e pH 2,5. O ajuste do pH foi realizado utilizando HCl 0,1 mol.L⁻¹ com auxílio de um medidor de pH (*Accumet mode 15/ Fisher Scientific*). Simultaneamente, foi também avaliado o efeito de sais biliares (Difco) no crescimento das células. As seguintes concentrações de sais biliares foram preparadas e testadas: 0%, 0.5% e 1%. A mistura foi incubada a 37 °C por 4 horas para avaliação dos estresses aplicados. Neste período, de 30 em 30 minutos, as células foram coletadas por centrifugação (centrífuga Sorval) a 6000 g por 6 minutos para análise de sobrevivência depois de submetidas à exposição a sais biliares. Em intervalos de 1 hora, o mesmo processo de centrifugação era realizado para análise de sobrevivência após exposição a condições ácidas. Em ambos os casos, o sedimento foi ressuspendido em 9 mL de tampão fosfato de sódio. A partir deste ponto, foram realizadas diluições seriadas em tampão fosfato 0,05 M para a contagem de sobreviventes em ágar MRS (Merck) adicionado de 30 µg/mL de ácido nalidíxico (Sigma) sob condições anaeróbicas a 37 °C por 48 horas. A técnica empregada para enumeração dos sobreviventes foi a de microgotas. Placas que continham 20-80 colônias por gota foram selecionadas e as unidades formadoras de colônias (UFC.mL⁻¹) foram contadas e os resultados expressos em log₁₀.

2.5. Análises estatísticas

O experimento foi conduzido em esquema fatorial com delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância, utilizando o programa SAS, versão 8.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Sobrevivência de *L. delbrueckii* UFV H2b20 sob condições ácidas

Na seleção de estirpes bacterianas para uso como adjunto dietético, os microrganismos devem sobreviver ao baixo pH do suco gástrico, à bile, entre outros fatores encontrados durante sua passagem pelo trato gastro digestório.

Neste trabalho, houve diferença ($p < 0,05$) na sobrevivência do *L. delbrueckii* UFV H2b20 quando exposto aos diferentes valores de pH (7,0, 3,5 e 2,5) após 5 dias de estocagem do queijo tipo Cottage simbiótico a 5 °C. Os resultados da Análise de Variância (ANOVA) estão demonstrados na Tabela 1. A média final da sobrevivência para *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi de 8,26, 8,08 e 7,20 log UFC.g⁻¹ para pH 7,0, 3,5 e 2,5, respectivamente após 5 dias de estocagem do queijo tipo Cottage. As células, quando expostas ao pH 2,5, sofreram maior redução decimal quando comparadas às outras condições ácidas (Tabela 2).

Após 15 dias de estocagem, houve interação entre intervalo de tempo de exposição às condições ácidas e pH ($p < 0,05$). O resumo da ANOVA para sobrevivência do *L. delbrueckii* UFV H2b20 quando exposto sob condições ácidas pode ser observado na Tabela 3. Percebeu-se que quando o pH do

Tabela 1 – Resumo da análise de variância para sobrevivência de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 quando exposto sob condições ácidas após 5 dias de estocagem do queijo tipo Cottage simbiótico

Fontes de Variação	GL	QM
Intervalo	4	0,3502
pH	2	4,8684*
Intervalo * pH	8	0,1919

* Significativo a 5% de probabilidade; QM = quadrado médio.

Tabela 2 – Teste Tukey para sobrevivência de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 quando exposto sob condições ácidas após 5 dias de estocagem do queijo tipo Cottage simbiótico

pH	Médias
7,0	8,26 a
3,5	8,08 a
2,5	7,20 b

Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si, pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 3 – Resumo da análise de variância para sobrevivência de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 quando exposto sob condições ácidas após 15 dias de estocagem do queijo tipo Cottage simbiótico

Fontes de Variação	GL	QM
Intervalo	4	1,5806
pH	2	12,6663
Intervalo * pH	8	1,6739*

* Significativo a 5% de probabilidade; QM = quadrado médio.

suco gástrico simulado foi de 2,5, ocorreu maior redução na sobrevivência, aproximadamente quatro ciclos logarítmicos, durante a exposição por 4 horas às condições ácidas. A sobrevivência das células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 pode ser observada na Figura 1.

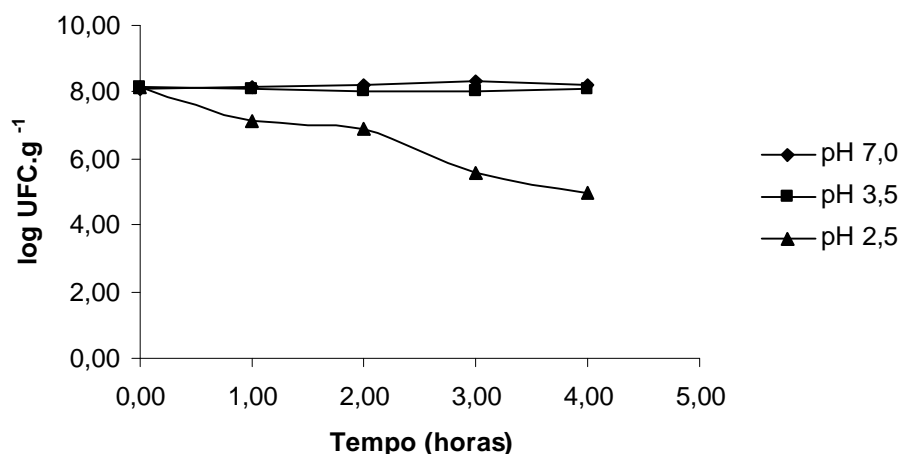


Figura 1 – Sobrevivência de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 quando exposto por 4 horas sob condições ácidas após 15 dias de estocagem do queijo tipo Cottage simbiótico.

Agostinho (1988) estudou a sensibilidade de *L. delbrueckii* UFV H2b20 ao ácido clorídrico durante uma, duas e três horas de exposição, a 37 °C, em leite acidificado, em diversas faixas de pH. A concentração inicial de células foi de 10⁶ UFC.mL⁻¹ e foi observado decréscimo de aproximadamente 1 ciclo log após uma, duas e três horas, nas faixas de pH de 3,21-3,00 e 2,90-2,73. Em faixa de pH de 2,60-2,40, o número de unidades viáveis decresceu para 10⁵ UFC.mL⁻¹ até uma hora, sendo que, após esse período, não foi detectada sobrevivência. Em faixa de pH 2,30 - 2,00 também não foram encontradas células viáveis.

Neste estudo, o pH do queijo tipo Cottage simbiótico pode ter provocado uma adaptação ácida do microrganismo contribuindo para maior sobrevivência do *L. delbrueckii* UFV H2b20 no alimento durante toda a vida de prateleira do produto. O efeito protetor também pode ser atribuído ao aumento do pH intestinal após a ingestão do alimento (GARDINER *et al.*, 1998).

Furtado (2001) observou o efeito do choque ácido de pH 3,5 por 30 minutos, ao tratamento em pH 2,5, por 2 h e 30 min, a 37 °C em *L. delbrueckii* UFV H2b20. Percebeu-se que o controle, não submetido a nenhum pré-tratamento, não sobreviveu a esse tratamento. No entanto, as células submetidas previamente ao choque ácido demonstraram sobrevivência em aproximadamente dois ciclos logarítmicos, quando comparados ao controle.

No presente trabalho, quando foi analisada a interação entre os tempos de estocagem, ou seja, após 5 dias e após 15 dias, não houve diferença ($p=0,05$) em relação a sobrevivência das células após exposição a diferentes valores de pH.

3.2. Sobrevivência de *L. delbrueckii* UFV H2b20 exposto a diferentes concentrações de sais biliares

Neste estudo não foi observada diferença ($p=0,05$) pelo teste Tukey entre a concentração de 0,5 % de sais biliares e de 1,0 % de sais quando as células foram expostas ao estresse após 5 dias de fabricação do queijo tipo Cottage simbiótico. As Tabelas 4 e 5 apresentam a Análise de Variância e o teste Tukey, respectivamente. A média final da sobrevivência, em $\log \text{UFC.g}^{-1}$, foi de 6,01, 6,32, 8,19 para 1,0% de sais, 0,5% e 0%, respectivamente após 5 dias de estocagem.

Tabela 4 – Resumo da análise de variância para sobrevivência de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 quando exposto na presença de sais biliares após 5 dias de estocagem do queijo tipo Cottage simbiótico

Fontes de Variação	GL	QM
Intervalo	8	0,3186
Sais biliares	2	37,4588*
Intervalo * pH	16	0,0902

* Significativo a 5% de probabilidade; QM = quadrado médio.

Tabela 5 – Teste Tukey para sobrevivência de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 quando exposto na presença de sais biliares após 5 dias de estocagem do queijo tipo Cottage simbiótico

Sais biliares	Médias
0,0 %	8,19 a
0,5 %	6,32 b
1,0 %	6,01 b

Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si, pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Quando as células foram expostas às concentrações de sais biliares após 15 dias de estocagem do queijo tipo Cottage simbiótico foi observado interação ($p < 0,05$) entre os intervalos e as concentrações de sais biliares (Tabela 6). A Figura 2 apresenta o comportamento das células após 4 horas de exposição ao estresse.

Agostinho (1988) estudou a sensibilidade de *L. delbrueckii* UFV H2b20 a 1% de sais biliares durante 30 minutos, 1, 2, 3 e 24 horas de exposição, a 37 °C, em leite desnatado e em caldo MRS. Observou-se após 24 horas de exposição uma redução decimal de 1,5 em leite desnatado, inferior a 2,0 reduções decimais no caldo MRS.

No presente estudo, a composição do queijo tipo Cottage simbiótico pode ter contribuído para a sobrevivência de *L. delbrueckii* UFV H2b20 durante toda a vida de prateleira. O queijo além de sua composição normal conteve alto teor de fibras (inulina) que pode ter apresentado um efeito protetor na viabilidade das células.

Michida *et al.* (2006) investigaram o efeito de extratos de cereais e de fibras de cereais na viabilidade do *Lactobacillus plantarum* sob condições simuladas do trato gastro digestório. Os resultados indicaram que células imobilizadas com as fibras de cereais de malte e cevada mostraram maior tolerância que as células livres. As adições de extratos de malte e cevada produziram maior efeito estabilizador nas células imobilizadas que nas células livres. Alguns fatores contribuíram para a melhoria da tolerância ao suco gástrico e aos sais biliares como a imobilização com as fibras de cereais e a composição dos extratos de cereais, principalmente em termos

Tabela 6 – Resumo da análise de variância para sobrevivência de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 quando exposto na presença de sais biliares após 15 dias de estocagem do queijo tipo Cottage simbiótico

Fontes de Variação	GL	QM
Intervalo	8	0,1971
Sais biliares	2	64,7135
Intervalo * pH	16	0,1643*

* Significativo a 5% de probabilidade; QM = quadrado médio.

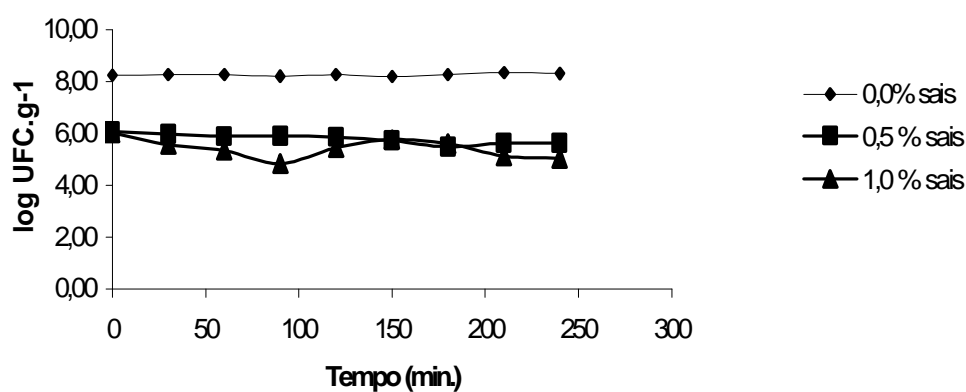


Figura 2 – Sobrevivência de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 quando exposto por 4 horas na presença de sais biliares após 15 dias de estocagem do queijo tipo Cottage simbiótico.

de açúcares solúveis em água. O açúcar tem efeito estabilizante e as células imobilizadas contribuem para a estabilidade do microrganismo em condições simuladas do trato gastro digestório.

Lian *et al.* (2003) estudaram a sobrevivência de *Bifidobacterium longum* B6 e *Bifidobacterium infantis* CCRC 14633 em condições simuladas do trato gastro digestório. As células foram microencapsuladas com gelatina, leite desnatado, goma arábica. Bifidobactérias microencapsuladas exibiram maior sobrevivência que as células puras quando expostas ao suco gástrico (pH 2,0) ou a 2,0% de bile. Estas substâncias carreadoras podem aumentar a sobrevivência de bifidobactérias durante a passagem através do estômago e facilitar a colonização do intestino.

A análise de variância comparando os tempos de estocagem, ou seja, após 5 dias e após 15 dias da produção demonstrou que a interação foi significativa ($p < 0,05$) (Tabela 7). O tempo de estocagem do queijo tipo Cottage simbiótico influenciou a sobrevivência das células na presença de sais biliares. Observando a Tabela 8, percebe-se que na concentração de 0,5% de sais biliares, houve maior sobrevivência de células no tempo 5, ou seja, no início da vida de prateleira do alimento. O mesmo foi observado para a concentração de 1,0% de sais biliares. Não houve diferença ($p > 0,05$) de sobrevivência de células dos produtos estocados em tempos diferentes, portanto as diferenças são de resistência ao tratamento com sais biliares. Mesmo havendo estatisticamente diferença entre as médias dos log na sobrevivência das células nos dois tempos de estocagem, esta diferença é menor que 1 ciclo log. As características do queijo tipo Cottage simbiótico, podem ter proporcionado uma certa resistência às células. O alimento e, ou seus constituintes têm demonstrado exercer efeito protetor em bactérias, de forma a diminuir a toxicidade dos sais biliares. Shimakawa et al. (2003) verificaram que a inibição de *Bifidobacterium breve* presente em leite fermentado devido à ação de ácidos biliares foi parcialmente aliviada quando proteína de soja foi adicionada ao meio, pois tem sido demonstrado que esta proteína liga-se aos ácidos biliares diminuindo a sua ação antimicrobiana. O encapsulamento de estirpes probióticas tem também aumentado a tolerância à ação dos sais biliares.

Tabela 7 – Resumo da análise de variância para sobrevivência de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 quando exposto na presença de sais biliares após 5 e 15 dias de estocagem do queijo tipo Cottage simbiótico

Fontes de Variação	GL	QM
Tempo	1	5,0068*
Intervalo	8	0,4835
Sais biliares	2	100,4225*
Intervalo*Sais	16	0,1805
Tempo*Intervalo	8	0,0356
Tempo*Sais	2	1,8682*
Tempo*Intervalo*Sais	16	0,0777

* significativo a 5% de probabilidade – QM: Quadrado médio

Tabela 8 – Médias do número de células sobreviventes de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 quando exposto em 0,5% e 1,0 % de sais biliares após 5 e 15 dias de vida de prateleira do queijo tipo Cottage simbiótico

Tempo (dias)	0,5% de sais	1,0% de sais	Controle*
5	6,32	6,01	8,19
15	5,79	5,41	8,26

* Controle = células não submetidas a sais biliares.

4. RESUMO E CONCLUSÃO

L. delbrueckii UFV H2b20, presente no queijo tipo Cottage simbiótico, foi submetido *in vitro*, a condições semelhantes às do trato gastro digestório, e sua sobrevivência foi avaliada em diferentes valores de pH e de concentrações de sais biliares. Observou-se que o microrganismo apresentou boa resistência a baixos valores de pH e a concentrações elevadas de sais biliares. O queijo tipo Cottage simbiótico exerceu efeito protetor ao *L. delbrueckii* UFV H2b20, possuindo características ideais para ser utilizado como alimento carreador das células probióticas. Os resultados do presente trabalho indicam que a estirpe *L. delbrueckii* UFV H2b20 sobreviveria às condições normais do trato gastro digestório quando adicionada em queijo tipo Cottage simbiótico apresentando, portanto características adequadas para a sua utilização como adjunto dietético.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINHO, S.M.M. **Comportamento do *L.acidophilus* UFV H2b20 sob condições do trato digestivo *in vitro* e efeito de métodos de preservação em sua atividade.** 1988. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 1988.

BEALES, N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. **Comprehensive Reviews in food Science and Food Safety**, v. 3, p. 1-20, 2004.

BEGLEY, M.; GAHAN, C. G. M., HILL, C. The interaction between bacteria and bile. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 625-651, 2005.

CHARALAMPOPOULOS, D.; PANDIELLA, S. S.; WEBB, C. Evaluation of the effect of malt, wheat and barley extracts on the viability of potentially probiotic lactic acid bacteria under acidic conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, p. 133-141, 2003.

CHARTERIS, W. P.; KELLY, P. M.; MORELLI, L.; COLLINS, J. K. Development and application of in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 759-768, 1998.

FURTADO, W. C. A. **Efeito de choques térmico e ácido na resistência de *Lactobacillus* UFV H2b20.** 2001. 35 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2001.

GARDINER, G.; ROSS, R. P.; COLLINS, J. K.; FITZGERALD, G.; STANTON, C. Development of a probiotic cheddar cheese containing human-derived *Lactobacillus paracasei* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 2192-2199, 1998.

GOLDIN, B. R.; GORBACH, S. L. **Probiotics for humans**. In: FULLER, R. (Ed.). **Probiotics**, the scientific basis. London: Chapman & Hall, 1992. p. 355-379.

GUCHTE, M.; SERROR, P.; CHERVAUX, C.; SMOKVINA, T.; EHRLICH, S. D.; MAGUIN, E. Stress response in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 82, p. 187-216, 2002.

HARTKE, A.; BOUCHÉ, S.; GIARD, J. C.; BENACHOR, A.; BOUTIBONNES, P.; AUFRAY, Y. The lactic acid stress response of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. **Current Microbiology**, v. 33, p. 194-199, 1996.

HERIGSTAD, B.; HAMILTON, M.; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, p. 121-129, 2001.

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

HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; SNEL, J.; SCHILLINGER, U.; HUIS VELT, J. H. J. Overview of gut flora and probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, p. 85-101, 1998.

KOS, B.; SUSKOVIC, J.; GORETA, J.; MATOSIC, S. Effect of protectors on the viability of *Lactobacillus acidophilus* M92 in simulated gastrointestinal conditions. **Food Technology and Biotechnology**, v. 38, p. 121-127, 2000.

LEITE, M. O. **Processos para o desenvolvimento de produtos lácteos probióticos com *Lactobacillus delbrueckii* UFVH2b20**. 2005. 87 f. Tese (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2005.

LIAN, W.; HSIAO, H.; CHOU, C. Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, p. 293-301, 2003.

MADUREIRA, A. R.; PEREIRA, C. I.; TRUSZKOWSKA, K.; GOMES, A. M.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Survival of probiotic bacteria in a whey cheese vector submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 921-927, 2005.

MICHIDA, H.; TAMALAMPUDI, S.; PANDIELLA, S. S.; WEBB, C.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Effect of cereal extracts and cereal fiber on viability of *Lactobacillus plantarum* under gastrointestinal tract conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 28, p. 73-78, 2006.

MONTEIRO, R. C. B. **Resposta ao estresse em *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20**. 1999. 59 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa- MG, 1999.

NEUMANN, E.; OLIVEIRA, M. A.; CABRAL, C. M.; MOURA, L. N.; NICOLI, J. R.; VIEIRA, E. C.; CARA, D. C.; PODOPRIGORA, G. I.; VIEIRA, L. Q. Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germfree mice. . **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, p. 1565-1573, 1998.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiology**, v. 1, p. 566, 1980.

PRESSER, K. A.; RATKOWSKY, D. A.; ROSS, T. Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 2355-2360, 1997.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDEN, R.; MATTO, J.; MATTILA-SANDHOLM. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v. 84, p. 197-215, 2000.

SANTOS, N. S. **Isolamento de *Lactobacillus acidophilus* de fezes de crianças alimentadas ao seio e de bezerros, visando a sua utilização como adjunto dietético**. 1984. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 1984.

SHIMAKAWA, Y.; MATSUBARA, S.; YUKI, N.; IKEDA, M.; ISHIKAWA, F. Evaluation of *Bifidobacterium breve* Yakult-fermented soymilk as a probiotic food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, p. 131-136, 2003.

TUOMOLA, E.; CRITTENDEN, R.; PLAYNE, M.; ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 73 (suppl.), p. 393S-8S, 2001.

VAUGHAN, E. E.; MOLLET, B. Probiotics in the new millennium. **Nahrung**, v. 3, p. 148-153, 1999.

VIANA, G. A.; FURTADO, M. M.; MARTINS, J. M. Produção de queijo tipo Cottage por acidificação direta do leite com ácido láctico como coadjuvante no processo de fermentação. **Anais do XIX Congresso Nacional de Laticínios**, n. 327, v. 57, p.1-7, 2002.

YANG HUANG; ADAMS, M. C. In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, p. 253-260, 2004.

3. CONCLUSÃO GERAL

O queijo tipo Cottage simbiótico produzido apresentou quantidades adequadas de células probióticas de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20, níveis acima dos recomendados pela comunidade científica. O teor de inulina encontrada no queijo foi suficiente para caracterizá-lo como prebiótico e exercer efeitos benéficos ao consumidor.

As células do *L. delbrueckii* UFV H2b20 exibiram boa sobrevivência às condições simuladas do trato gastro digestório. As características do alimento podem ter oferecido proteção ao microrganismo durante a exposição na presença de baixo pH e altas concentrações de sais biliares.

A presença de células probióticas de *L. delbrueckii* UFV H2b20 e de substância prebiótica inulina (BENEO GR) no alimento, não influenciou as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais do queijo tipo Cottage simbiótico. O queijo simbiótico obteve boa aceitação pelos provadores.

O queijo tipo Cottage simbiótico produzido apresenta características promissoras como alimento funcional e com fortes perspectivas para comercialização.